

POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2007
TOM 53
NUMER 3

Charakterystyka owomukoidu – jednego
z ważniejszych alergenów pokarmowych
Udział tlenu azotu w regulacji ekspresji genów
Rola szlaku JNK w rodzinnych postaciach
choroby Parkinsona



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed
www.postepybiochemii.pl

<http://rcin.org.pl>

NucliSENS™ system

Przełom w ekstrakcji kwasów nukleinowych

AUTOMATYCZNA EKSTRAKCJA MAGNETYCZNA



NucliSENS™
— easyMAG

PÓŁAUTOMATYCZNA EKSTRAKCJA MAGNETYCZNA



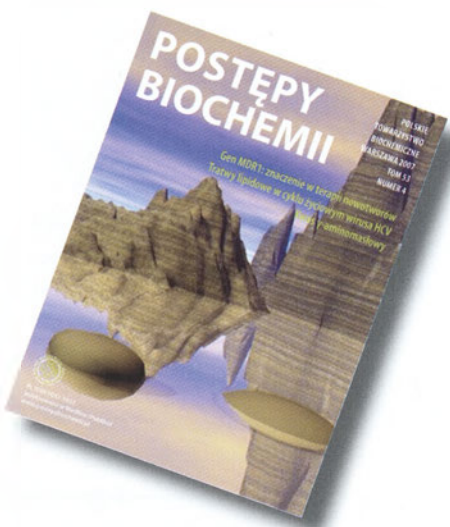
NucliSENS™
— miniMAG

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:

Gen MDR1 (ABCB1): znaczenie w terapii i rozwoju nowotworów

Mariusz Panczyk, Aleksandra Sałagacka, Marek Mirowski

Rola tratw lipidowych w cyklu życiowym wirusa zapalenia wątroby typu C

Martyna Grek, Jacek Bartkowiak, Małgorzata Sidorkiewicz

Kwas γ -aminomasłowy

Antoni Kowalski, Elżbieta Rębas, Ludmiła Żylińska

WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

Polskie publikacje z lat 2000-2007 wchodzące w skład współczynnika H dla biologii molekularnej i biochemii

Andrzej Pilec

199

Wiadomości krajowe

pod red. Teresy Wesołowskiej

201

Wspomnienie o Profesorze Zygmuncie Wasylewskim

Sylvia Kędracka-Krok

209

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Charakterystyka owomuknidu – jednego z ważniejszych alergenów pokarmowych

Anna Winiarska-Mieczan, Małgorzata Kwiecień

212

Białko HAX-1: wielofunkcyjny czynnik wpływający na apoptozę, migrację komórek, endocytozę i transport mRNA

Maria Szwarz, Elżbieta Sarnowska, Ewa A. Grzybowska

218

Nowe oblicze białek antyapoptotycznych. I. Białko Mel 1

Jolanta Bednarek, Józefa Węsierska-Gądek, Zofia M. Kiliańska

228

Nowe oblicze białek antyapoptotycznych. II. Surwiwina

Józefa Węsierska-Gądek, Jolanta Bednarek, Zofia M. Kiliańska

239

Udział tlenu azotu w regulacji ekspresji genów

Katarzyna Oszejca, Janusz Szemraj, Jacek Bartkowiak

254

Biosynteza tlenu azotu w roślinach

Urszula Małolepsza

263

Wtórne transportery metali ciężkich u roślin

Magdalena Migocka, Ewa Nowojska, Grażyna Kłobus

272

Alkaloidy roślin z rodziny psiankowatych (*Solanaceae*)

Jolanta Jerzykiewicz

280

5- α -alkilflorezorcynole pełnych ziaren zbóż i pełnoziarnistych produktów spożywczych jako biomarkery zdrowej diety

Mariola Kulawinek, Arkadiusz Kozubek

287

FORUM MŁODYCH BIOCHEMIKÓW

Rola szlaku JNK w rodzinnych postaciach choroby Parkinsona

Marek Jankowski

297

Rysunek na okładce:

Front cover image „Egg” by Linda Bucklin, <http://www.lindabucklin.com>, with permission.

ADVANCES IN BIOCHEMISTRY VOL. 53, NO. 3, 2007

Index H in Biochemistry and Molecular Biology	199
Events/Opinions/Comments	201
In memoriam of Professor Zygmunt Wasylewski	209

REVIEWS

Avian egg's white ovomucoid as food allergen for human	212
HAX-1 protein: multifunctional factor involved in apoptosis, cell migration, endocytosis and mRNA transport	218
New face of antiapoptotic proteins. I. Protein Mcl-1	228
New face of antiapoptotic proteins. II. Survivin	239
Regulation of gene expression by nitric oxide	254
Nitric oxide production in plants	263
H ⁺ -coupled heavy metal transport in plants	272
Alkaloids of Solanaceae (nightshade plants)	280
5-H-alkylresorcinols of whole grain cereals and whole grain cereal products as biomarkers of healthy food	287
The role of JNK pathway in familial Parkinson's disease	297

KILKA SŁÓW OD REDAKTORA

Szanowni Państwo,

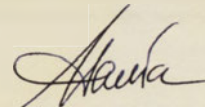
Przy okazji trzeciego numeru „Postępów Biochemii”, który trafia do Państwa rąk w tym roku, serdecznie zapraszam nie tylko do lektury czasopisma, ale do podejmowania trudu pisania artykułów przeglądowych i zachęcam do ich publikowania na łamach naszego kwartalnika. Oferujemy fachową pomoc w ocenie artykułów, podejmowanie szybkiej decyzji o przyjęciu pracy do druku oraz wysoką jakość wydruku. Aby przyspieszyć prace redakcyjne, a tym samym podjęcie decyzji, namawiam do korzystania z najnowszych numerów czasopisma oraz wskazówek dla autorów, w celu ścisłego naśladowania stylu czasopisma. Wskazówki dla autorów można bez problemów wydrukować ze strony internetowej „Postępów Biochemii”. W przypadku wątpliwości proszę przysyłać pytania na adres mojej poczty internetowej (s.pikula@nencki.gov.pl).

By pomóc we właściwym planowaniu Państwa publikacji i wyborze odpowiedniego czasu, w którym najwygodniej będzie Państwu przesłać swoją propozycję do redakcji, zamieszczam tabelę zawierającą harmonogram pracy naszej redakcji nad poszczególnymi numerami „Postępów Biochemii”. Daty podane w tabeli pozwolą zorientować się, kiedy można spodziewać się decyzji redakcyjnej, kiedy prześlemy autorom złożoną elektronicznie wersję artykułu w celu dokonania korekty autorskiej i kiedy artykuł zostanie wydrukowany.

Harmonogram prac redakcji „Postępów Biochemii” w 2007/8 roku

Miesiące:	Tom/nr:	Skład:	Korekta autorska:	Druk:	Początek dystrybucji:
Październik–Grudzień	53/4	15-10-2007	30-10-2007	20-11-2007	20-12-2007
Styczeń–Marzec	54/1	20-01-2008	1-02-2008	1-03-2008	30-03-2008
Kwiecień–Czerwiec	54/2	20-04-2008	10-05-2008	1-06-2008	30-06-2008
Lipiec–Wrzesień	54/3	15-07-2008	1-08-2008	30-08-2008	30-09-2008
Październik–Grudzień	54/4	15-10-2008	30-10-2008	20-11-2008	20-12-2008

Zycząc miłej lektury numeru trzeciego, jak zwykle ponawiam moją gorącą prośbę o kierowanie Państwa opinii i uwag na temat zawartości naszego czasopisma i naszej pracy, na adres poczty elektronicznej s.pikula@nencki.gov.pl. Uwagi Państwa pomagają redakcji w codziennej pracy nad udoskonalaniem „Postępów Biochemii”. Zapraszam do częstego odwiedzania naszej strony internetowej pod adresem www.postepybiochemii.pl.



Sławomir Pikula

PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII

OLYMPUS

Your Vision, Our Future

MERCK

Polska Sieć Mitochondrialna
www.mitonet.pl

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

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

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

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

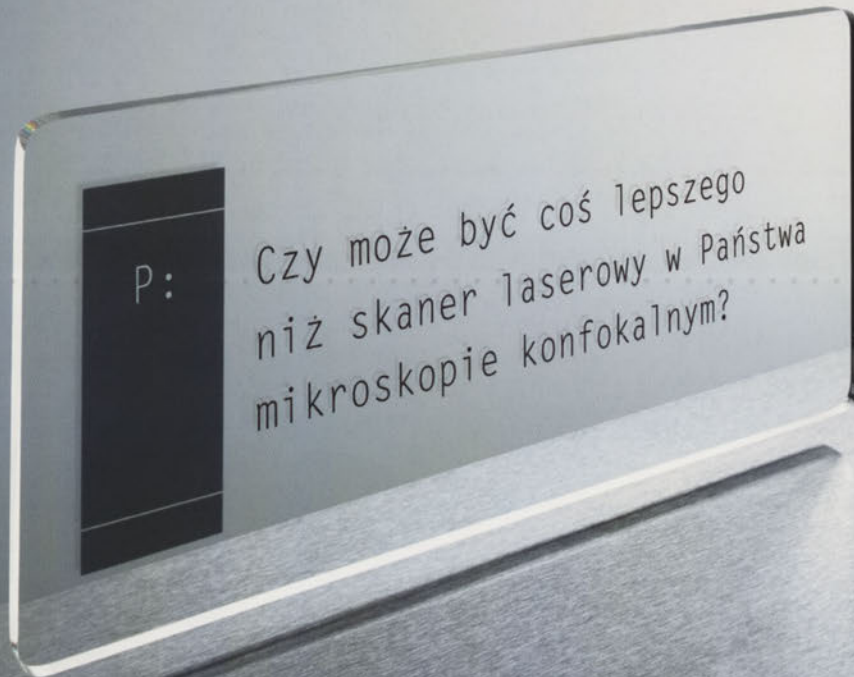
Skład i łamanie: Małgorzata Basaj; e-mail: biochem@nencki.gov.pl

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

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

Wydawca: Polskie Towarzystwo Biochemiczne; ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, tel/fax (022) 6582099, e-mail: ptbioch@nencki.gov.pl, http://www.ptbioch.edu.pl

Kwartalnik „Postępy Biochemii” jest wydawany z pomocą finansową Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. „Postępy Biochemii” są indeksowane w Medline, IndexCopernicus i Agrolibrex. Nakład 1000 egz.



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 pobudzania 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 FluoView 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. 022 366-00-77, Faks 022 831-04-53
mikroskopy@olympus.pl
www.olympus-europa.com

Polimerazy do Hot-Start PCR

Nowość!

- Chemicznie zmodyfikowana polimeraza hot-start zapewnia wydajny i szybki start reakcji PCR.
- Wysoce wydajna amplifikacja złożonych kompleksów matrycowego DNA.
- Krótki czas aktywacji: tylko 4 minuty!
- Wysoka specyficzność PCR: zredukowanie do minimum tworzenie dimerów przez primery oraz mispriming.
- Podwyższona czułość reakcji PCR.
- Dogodna pokojowa temperatura przygotowywania PCR dzięki dodaniu do reszt aminokwasowych specyficznych, termolabilnych grup blokujących.
- Produkty reakcji zawierają końce 3'-dA.

Zastosowanie:

- Hot-start PCR,
- high throughput hot-start PCR (Taq DNA TrueStart™),
- RT-PCR,
- real-time PCR,
- multiplex PCR,
- amplifikacja DNA typu „low copy”,
- generacja produktów PCR do klonowania TA.

Taq DNA TrueStart™

EP0611	1 x 100 u (5u/μl)
EP0612	1 x 500 u (5u/μl)
EP0613	5 x 500 u (5u/μl)

Taq DNA Hot Start

EP0601	1 x 100 u (5u/μl)
EP0602	1 x 500 u (5u/μl)
EP0603	5 x 500 u (5u/μl)

abe

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



Polskie publikacje z lat 2000–2007 wchodzące w skład współczynnika H dla biologii molekularnej i biochemii

Andrzej Pilc

Instytut Farmakologii PAN w Krakowie i Collegium Medicum UJ

W 2005 roku amerykański fizyk J. E. Hirsch przedstawił w PNAS (102: 16569–16572) współczynnik H jako szczególnie przydatny do określania klasy naukowej badaczy w wielu różnych dyscyplinach nauki. W tym samym roku praca Hirscha została szerzej opisana w Forum Akademickim w artykule P. Misiaka (9, 57–59).

Współczynnik H jest równy liczbie publikacji cytowanych co najmniej h razy (na przykład, współczynnik H równy 20 oznacza, że dwudziesta z kolei publikacja badacza, jeżeli jego publikacje były uszeregowane w zależności od liczby uzyskanych cytowań, cytowana była nie mniej niż 20 razy). Współczynnik H nadaje się do porównywania nie tylko pojedynczych naukowców, ale ośrodków i dziedzin naukowych. Co ważne, szybkość jego wyznaczenia jest mierzona w sekundach.

W niniejszym opracowaniu przedstawiono dane na temat współczynnika H dla prac z biologii molekularnej i biochemii. Poszukiwania (w dniu 20.07.2007 r.) przeprowadzono korzystając z bazy ISI Web of Knowledge. Baza ta zidentyfikowała 5686 publikacji z wymienionych dyscyplin nauki, których autorzy posiadają polską afiliację. Prace te cytowane były w sumie 28720 razy, co daje średnio 5,05 cytowań na publikację. Współczynnik H dla tych prac wynosi 47, co oznacza, że czterdziesta siódma publikacja uzyskała co najmniej 47 cytowań; ponieważ prace nr 45–47 (patrz spis publikacji na końcu artykułu) były cytowane 49 razy, a prace nr 48 i 49 mają po 47 cytowań, także i te prace zostały zamieszczone na liście. Oznacza to, że jedna na 116 publikacji (z 5686 publikacji) zalicza się do prac określających

współczynnik H. Wypada dodać, że biologia molekularna i biochemia są na trzecim miejscu w kraju pod względem liczby opublikowanych w tym okresie prac. Na pierwszym jest chemia fizyczna z 7867 pracami (ale niższym współczynnikiem H, równym 39).

Wydaje się, że spośród nauk biologiczno-medycznych współczynnik H jest najwyższy właśnie dla biochemii i biologii molekularnej. Spośród 5686 prac najczęściej publikowano w *Acta Biochim Polon* (603 prace); kolejne miejsca zajęły: *Folia Histochem Cytobiol* (408 prac), *Cell Mol Biol Lett* (290 prac), *FEBS J* (169 prac), *J Neurochem* (163 prace), *J Biol Chem* (159 prac) oraz *J Peptide Sci* (142 prace). Najwięcej prac wchodzących w skład współczynnika H opublikowali badacze z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej (MIBMiK) z Warszawy (12 publikacji, co stanowi 24,5% z 49 prac wymienionych na liście), drugie miejsce zajmuje Uniwersytet Warszawski – 10 publikacji (20,4%), a trzecie Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie (6 prac, 12,2%). Po trzy prace (po 6,1%) pochodzą z: Uniwersytetu Jagiellońskiego, Uniwersytetu Toruńskiego, Uniwersytetu Medycznego w Bydgoszczy, Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu oraz Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie; dwie publikacje (4,1%) zostały opublikowane przez badaczy z CBMiM PAN w Łodzi.

Widać wyraźnie, że kilka ośrodków badawczych w kraju dostarcza niemal wszystkich publikacji wchodzących w skład współczynnika H w tych dziedzinach nauki, z czego 57,1% trzy pierwsze ośrodki. Dwadzieścia sześć publikacji powstało w placówkach badawczych PAN, 24 w placówkach uczelnianych, a 5 w instytutach resortowych. Geograficznie dominuje Warszawa (31 prac), 6 powstało w

Poznaniu, 5 w Łodzi, 4 w Krakowie, po 3 w Toruniu i w Bydgoszczy, 2 w Gdańsku.

Naukowcy, którzy opublikowali najwięcej takich prac, to Sławomir Filipek oraz Janusz Bujnicki z MIBMiK (po 6 prac). Cztery publikacje są autorstwa Leszka Rychlewskiego (obecnie z BioInfoBank). Po 2 publikacje mają: Artur Słupianek, Tomasz Skórski, Grażyna Hoser z Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie, Małgorzata Krabownik z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Paweł Jaruga z Collegium Medicum w Bydgoszczy oraz Alicja Wawrzynow, Maciej Żylicz i Michał Kurowski z MIBMiK.

58% prac powstało przy znaczącym lub dominującym (ponad 50%) udziale partnerów zagranicznych. Autorzy krajowi (nazwiska podane tłustym drukiem w spisie publikacji poniżej) dominują (60–100% udziału) w 14 publikacjach. Należy zauważyć, że niektóre z tych publikacji wejdą również w skład współczynnika H wyliczonego dla innych dyscyplin nauki. Poniżej zamieszczono listę publikacji w kolejności cytowań; liczba cytowań została wytluszczona i jest umieszczona na końcu danych dotyczących publikacji.

Spis prac z dziedziny biochemii i biologii molekularnej, opublikowanych w okresie styczeń 2000–lipiec 2007 i wchodzących w skład współczynnika H, których niektórzy autorzy posiadają polską afiliację

1. Liang Y, Fotiadis D, **Filipek S**, Saperstein DA, Palczewski K, Engel A (2003) Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. Dept Ophthalmol, University of Washington, Seattle, USA; Warsaw Univ, Int Inst Mol & Cell Biol, Warsaw, Poland; Warsaw Univ, Fac Chem, Warsaw, Poland, *J Biol Chem* 278: 21655–21662 – 174
2. Friml J, Benkova E, Blilou I, **Wisniewska J**, Hamann T, Ljung K *et al* (2002) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. Max-Delbruck-

- Laboratorium, Max-Planck-Gesellschaft, Koln, Germany; Inst Gen & Mol Biol, Dept Biotechnol, Torun, Poland, Cell 108: 661-673 – 138
3. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, **Karbownik M**, Calvo JR (2000) Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. Dept Cell Struct Biol, Univ Texas Health Sci Center, San Antonio, USA; Med Univ Lodz, Inst Endocrinol, Lodz, Poland, Biol Signals Recept 9: 137-159 – 126
 4. **Janowski R**, **Kozak M**, **Jankowska E**, **Grzonka Z**, Grubb A, Abrahamson M, **Jaskolski M** (2001) Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. Dept Crystall, Faculty Chemistry, A. Mickiewicz University, Poznan, Poland; Univ Gdansk, Dept Organ Chem, Gdansk, Poland, Nat Struct Biol 8: 316-320 – 122
 5. Dizdaroglu M, **Jaruga P**, Birincioglu M, Rodriguez H (2002) Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. Chem Sci Technol Lab, Nat Inst Stand Technol, Gaithersburg, USA; Med Univ, Dept Clin Biochem, Bydgoszcz, Poland, Free Radic Biol Med 32: 1102-1115 – 119
 6. Kurreck J, **Wyszko E**, Gillen C, Erdmann VA (2002) Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. Freie Universitat Berlin, Institut Chemie/Biochemie, Berlin, Germany; Polish Acad Sci, Inst Bioorgan Chem, Poznan, Poland, Nucleic Acids Res 30: 1911-1918 – 110
 7. Puntervoll P, Linding R, Gemund C, Chabanis-Davidson S, Mattingsdal M, Cameron S, **Wyrwicz L**, **Rychlewski L** (2003) ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. Dept Molec Biol, Univ Bergen, Norway; BioInfoBank Inst, Poznan, Poland, Nucleic Acids Res 31: 3625-3630 – 102
 8. Lundstrom J, **Rychlewski L**, **Bujnicki J**, Elofsson A (2001) Pcons: a neural-network-based consensus predictor that improves fold recognition. Stockholm Bioinformatics Center, Stockholm Univ, Stockholm, Sweden; Int Inst Molec Cell Biol, Warsaw, Poland, Protein Sci 10: 2354-2362 – 101
 9. **Slupianek A**, Schmutte C, Tomblin G, **Nieborowska-Skorska M**, Hoser G, **Nowicki MO**, **Skorski T** (2001) BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. Center for Biotechnology, College Sci Technol, Temple University, Philadelphia, USA; Med Ctr Postgrad Educ, Warsaw, Poland, Mol Cell 8: 795-806 – 100
 10. Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, Bhagwat AS, Bickle TA, Bitinaite J, **Piekarczyk A**, **Szybalski W** (2003) A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. New England Biolabs, Beverly, USA; Warsaw Univ, Inst Microbiol, Warsaw, Poland, Nucleic Acids Res 31: 1805-1812 – 96
 11. Cohen H, Levy RJ, Gao J, Fishbein I, Kousaev V, **Sosnowski S**, **Slomkowski S**, **Golomb G** (2000) Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles. Faculty of Medicine, The Hebrew University, Jerusalem, Israel; Polish Acad Sci CBMiM, Lodz, Gene Ther 7: 1896-1905 – 94
 12. **Slominski A**, Wortsman J, Pisarchik A, **Zbytek B**, Linton EA, **Mazurkiewicz JE**, Wei ET (2001) Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. Univ Tennessee Health Sci Center, Memphis, USA; Med Univ Gdansk, Dept Histol Immunol, Gdansk, Poland, FASEB J 15: 1678-1693 – 84
 13. Mirzadegan T, Benko G, **Filipek S**, Palczewski K (2003) Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. Roche Bioscience, Inflammatory Disease Unit, Palo Alto, USA; Int Inst Molec Cell Biol, Warsaw, Poland; Dept Chem, Warsaw Univ, Warsaw, Poland, Biochemistry 42: 2759-2767 – 82
 14. **Sarno S**, Reddy H, Meggio F, Ruzzene M, Davies SP, Donella-Deana A, **Shugar D** (2001) Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 (casein kinase-2). Dept Biol Chem, Univ Padua, Italy; Polish Acad Sci, Inst Biochem Biophys, Warsaw, Poland, FEBS Lett 496: 44-48 – 81
 15. Vaze MB, Pelliccioli A, Lee SE, Ira G, Liberi G, Arbel-Eden A, **Haber JE** (2002) Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase. Brandeis University, Waltham, USA; Copernicus Univ, Inst Gen Mol Biol, Torun, Poland, Mol Cell 10: 373-385 – 79
 16. Grunweller A, **Wyszko E**, Bieber B, Jahnel R, Erdmann VA, Kurreck J (2003) Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. Freie Universitat Berlin, Berlin, Germany; Polish Acad Sci, Inst Bioorgan Chem, Poznan, Poland, Nucleic Acids Res 31: 3185-3193 – 78
 17. **Sanak M**, **Pierzchalska M**, **Bazan-Socha S**, **Szczeklik A** (2000) Enhanced expression of the leukotriene C(4) synthase due to overactive transcription of an allelic variant associated with aspirin-intolerant asthma. Dept Med, Jagiellonian University Medical School, Cracow, Poland, Am J Respir Cell Mol Biol 23: 290-296 – 77
 18. **Niedzwiecka A**, Marcotrigiano J, **Stepinski J**, **Jankowska-Anyszka M**, **Wyslouch-Cieszyńska A**, **Dadlez M**, **Mak P**, **Darzynkiewicz E**, **Stolarski R** (2002) Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. Dept Biophys, Inst Exp Phys, Warsaw University, Warsaw; Warsaw Univ, Fac Chem, Warsaw, Poland; Polish Acad Sci, Inst Biochem Biophys, Warsaw; Jagiellonian Univ, Inst Mol Biol Biotechnol, Krakow, Poland, J Mol Biol 319: 615-635 – 75
 19. **Olinski R**, **Gackowski D**, **Fokinski M**, **Rozalski R**, **Roszkowski K**, **Jaruga P** (2002) Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. Dept Clin Biochem, Rydygier Medical University, Bydgoszcz, Poland, Free Radic Biol Med 33: 192-200 – 74
 20. Takagi Y, Warashina M, **Stec WJ**, Yoshinari K, Taira K (2001) Recent advances in the elucidation of the mechanisms of action of ribozymes. Gene Discovery Research Center, Nat Inst Advanc Industr Sci Technol (AIST), Tsukuba Science City, Japan; Polish Acad Sci, CBMiM Lodz, Poland, Nucleic Acids Res 29: 1815-1834 – 72
 21. **Grzybowska EA**, **Wilczynska A**, **Siedlecki JA** (2001) Regulatory functions of 3'UTRs. Dept Molec Biol, Cancer Center Institute, Roentgena 5, 02-781 Warsaw, Poland, Biochem Biophys Res Commun 288: 291-295 – 71
 22. **Bujnicki JM**, Elofsson A, Fischer D, **Rychlewski L** (2001) LiveBench-1: continuous benchmarking of protein structure prediction servers. Bioinformatics Lab, Int Inst Molec Cell Biol, Warsaw, Poland, Protein Sci 10: 352-361 – 70
 23. Fotiadis D, Liang Y, **Filipek S**, Saperstein DA, Engel A, Palczewski K (2004) The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. Muller Inst Microsc, Biozentrum, Univ Basel, Basel, Switzerland; Int Inst Molec Cell Biology, Warsaw; Univ Warsaw, Poland, FEBS Lett 564: 281-288 – 66
 24. **Filipek S**, **Krzysko KA**, Fotiadis D, Liang Y, Saperstein DA, Engel A, Palczewski K (2004) A concept for G protein activation by G protein-coupled receptor dimers: the transducin/rhodopsin interface. Int Inst Molec Cell Biol, Warsaw, Poland; Univ Warsaw, Fac Chem, Warsaw, Poland, Photochem Photobiol Sci 3: 628-638 – 65
 25. **Kurowski MA**, **Bujnicki JM** (2003) Gene-Silico protein structure prediction meta-server. Int Inst Molec Cell Biol, Warsaw, Poland, Nucleic Acids Res 31: 3305-3307 – 64
 26. **Jaroszewski L**, **Rychlewski L**, **Godzik A** (2000) Improving the quality of twilight-zone alignments. Burnham Institute, La Jolla, USA; Int Inst Molec Cell Biol, Warsaw, Poland, Protein Sci 9: 1487-1496 – 64
 27. Forsyth WR, **Antosiewicz JM**, Robertson AD (2002) Empirical relationships between protein structure and carboxyl pKa values in proteins. Dept Biochem, Univ Iowa, Iowa City, USA; Warsaw Univ, Dept Biophys, Warsaw, Poland, Proteins 48: 388-403 – 62
 28. Park PS, **Filipek S**, Wells JW, Palczewski K (2004) Oligomerization of G protein-coupled receptors: past, present, and future. Dept Ophthalm, Univ Washington, Seattle, USA; Int Inst Molec Cell Biol, Warsaw, Poland, Biochemistry 43: 15643-15656 – 60
 29. **Zylicz M**, King FW, **Wawrzynow A** (2001) Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. Dept Molec Biol, Int Inst Molec Cell Biol, Warsaw; Polish Acad

- Sci, Inst Biochem Biophys, Warsaw, Poland, EMBO J 20: 4634-38 – 59
30. Erdmann VA, **Barciszewska MZ**, Szymanski M, Hochberg A, de Groot N, **Barciszewski J** (2001) The non-coding RNAs as riboregulators. Inst Biochem, Freie Universität Berlin, 14195 Berlin, Germany; Polish Acad Sci, Inst Bioorgan Chem, Poznan, Poland, Nucleic Acids Res 29: 189-193 – 59
 31. Bomsztyk K, Denisenko O, **Ostrowski J** (2004) hnRNP K: one protein multiple processes. Dept Med, Univ Washington, Seattle, USA; Postgrad Educ Canc Ctr, Warsaw, Poland, Bioessays 26: 629-638 – 57
 32. **Slupianek A**, Hoser G, **Majsterek I**, **Bronisz A**, **Malecki M**, **Blasiak J**, **Skorski T** (2002) Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G(2)/M phase, and protection from apoptosis. Temple University, Philadelphia, USA; Med Ctr Postgrad Educ, Warsaw, Poland; Univ Lodz, Dept Mol Genet, Lodz, Poland, Mol Cell Biol 22: 4189-4201 – 57
 33. Godthelp BC, Wiegant WW, Duijn-Goedhart A, Schärer OD, van Buul PP, Kanaar R, **Zdzienicka MZ** (2002) Mammalian Rad51C contributes to DNA cross-link resistance, sister chromatid cohesion and genomic stability. Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; Rzydygier Univ Med Sci, Dept Mol Cell Genet, Bydgoszcz, Poland, Nucleic Acids Res 30: 2172-2182 – 57
 34. Langfort J, Ploug T, Ihlemann J, Holm C, **Galbo H** (2000) Stimulation of hormone-sensitive lipase activity by contractions in rat skeletal muscle. Dept Appl Physiol, Polish Acad Sci, Warsaw, Poland, Biochem J 351: 207-214 – 57
 35. **Wojcik C**, DeMartino GN (2003) Intracellular localization of proteasomes. University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA; Warsaw Univ, Dept Histol Embriol, Warsaw, Poland, Int J Biochem Cell Biol 35: 579-589 – 55
 36. Walther M, **Plochocka P**, Fischer B, Helm H, Uhd JP (2002) Collective vibrational modes in biological molecules investigated by terahertz time-domain spectroscopy. Albert-Ludwigs Universität Freiburg, Germany; Univ Warsaw, Dept Expt Phys, Warsaw, Poland, Biopolymers 67: 310-313 – 55
 37. Boulton M, **Rożanowska M**, **Rożanowski B** (2001) Retinal photodamage. Dept Optometry Vision Sci, Cardiff University, Cardiff, UK; Jagiellonian Univ, Inst Biol, Krakow, Poland; Pedagog Acad, Inst Biol, Krakow, Poland, J Photochem Photobiol B 64: 144-161 – 55
 38. **Meller J**, Elber R (2001) Linear programming optimization and a double statistical filter for protein threading protocols. Dept Comput Sci, Cornell University, Ithaca, New York 14853, USA; Copernicus Univ, Torun, Poland, Proteins 45: 241-261 – 53
 39. **Racki WJ**, Becam AM, Nasr F, Herbert CJ (2000) Cbk1p, a protein similar to the human myotonic dystrophy kinase, is essential for normal morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. CNRS, l'Université Pierre et Marie Curie, Gif-sur-Yvette, France; Polish Acad Sci, Inst Biochem Biophys, Warsaw, Poland, EMBO J 19: 4524-4532 – 53
 40. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, **Czarnocki Z** (2003) Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. Univ Texas Health Sci Center, San Antonio, USA; Warsaw Univ, Dept Chem, Warsaw, Poland, Acta Biochim Polon 50: 1129-1146 – 52
 41. **Kosinski J**, Cymerman IA, **Feder M**, **Kuroski MA**, **Sasin JM**, **Bujnicki JM** (2003) A "Frankenstein's monster" approach to comparative modeling: merging the finest fragments of Fold-Recognition models and iterative model refinement aided by 3D structure evaluation. Bioinformatics Lab, Int Inst Molec Cell Biol, Warsaw, Poland, Proteins 53 (Suppl 6), 369-379 – 52
 42. **Filipek S**, Teller DC, Palczewski K, Stenkamp R (2003) The crystallographic model of rhodopsin and its use in studies of other G protein-coupled receptors. Univ Washington, Seattle, Washington; Int Inst Molec Cell Biol, Warsaw; Univ Warsaw, Fac Chem, Warsaw, Poland, Annu Rev Biophys Biomol Struct 32: 375-397 – 50
 43. **Dzwołak W**, Ravindra R, Lendermann J, Winter R (2003) Aggregation of bovine insulin probed by DSC/PPC calorimetry and FTIR spectroscopy. High-Press Res Center, Polish Acad Sci, Warsaw, Poland, Biochemistry 42: 11347-11355 – 49
 44. **Jozkowicz A**, Huk I, Nigisch A, Weigel G, Dietrich W, Motterlini R, **Dulak J** (2003) Heme oxygenase and angiogenic activity of endothelial cells: stimulation by carbon monoxide and inhibition by tin protoporphyrin-IX. Univ Vienna, Austria; Jagiellonian Univ, Fac Biotechnol, Krakow, Poland, Antioxid Redox Signal 5: 155-162 – 49
 45. Bakiri L, Matsuo K, **Wisniewska M**, Wagner EF, Yaniv M (2002) Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers. CNRS, Institut Pasteur, Paris, France; Polish Acad Sci, Nencki Inst Expt Biol, Warsaw, Poland, Mol Cell Biol 22: 4952-4964 – 48
 46. Kushnirov VV, Kryndushkin DS, **Boguta M**, Smirnov VN, Ter Avanesyan MD (2000) Chaperones that cure yeast artificial [PSI⁺] and their prion-specific effects. Inst Exp Cardiol, Moscow, Russia; Polish Acad Sci, Inst Biochem Biophys, Warsaw, Poland, Curr Biol 10: 1443-1446 – 48
 47. **Wysocki R**, Chery CC, **Wawrzycka D**, Van Hulle M, Cornelis R, Thevelein JM, Tamas MJ (2001) The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimite in *Saccharomyces cerevisiae*. Inst Microbiol, Wrocław Univ, Wrocław, Poland, Mol Microbiol 40: 1391-1401 – 48
 48. King FW, **Wawrzynow A**, Hohfeld J, **Zylicz M** (2001) Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53. Dept Molec Biol, Int Inst Molec Cell Biol, Warsaw, Poland; Polish Acad Sci, Inst Biochem Biophys, Warsaw, Poland, EMBO J 20: 6297-6305 – 47
 49. **Karbownik M**, **Lewinski A**, Reiter RJ (2001) Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. Univ Texas Health Sci Center, San Antonio, TX, USA; Med Univ Lodz, Lodz, Poland, Int J Biochem Cell Biol 33: 735-753 – 47

WIADOMOŚCI KRAJOWE

Stanowisko zarządu Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej w sprawie proponowanych przez Rząd RP zmian prawa dotyczącego fundacji w Polsce. W pierwszych dniach lipca b.r. Zarząd Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w osobach profesorów Macieja Żylicza, Włodzimierza Boleckiego i dr Tomasza Perkowskiego przedstawił stanowisko FNP w sprawie projektu nowej ustawy o fundacjach, przyjętego przez Radę Ministrów 29 maja b.r. i przekazanego do Sejmu (nr druku 1890). FNP jest członkiem Forum

Darczyńców w Polsce i podziela stanowisko Forum w kwestii zwiększenia restrykcyjności organów Państwa wobec fundacji utrudniających im w kraju prowadzenie działalności, do której zostały powołane. Szczególne zaniepokojenie Fundacji budzi art. 31 projektu RM. Na jego mocy rząd chce zobowiązać fundacje, których fundatorem jest Skarb Państwa (bądź w powstaniu których współuczestniczył), do wprowadzenia zmian w statutach, dających Ministrowi Skarbu Państwa uprawnienia do dowolnej modyfi-

kacji tych statutów, ze zmianą celów fundacji włącznie. Minister Skarbu Państwa chce w ten sposób uzyskać nieograniczone prawo odwoływania i powoływania członków organów wewnętrznych tych organizacji.

Według Zarządu FNP art. 31 projektowanej ustawy ma na celu w istocie nie tyle zwiększenie kontroli państwa nad fundacjami, co uzyskanie, nieograniczonej postanowieniami statutów władzy nad tymi fundacjami. Może to spowodować nie tylko utratę

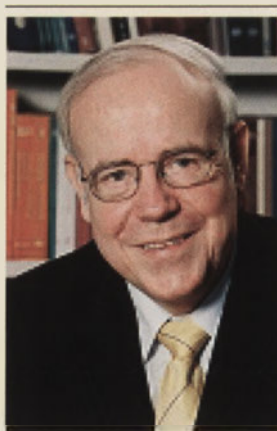
niezależności fundacji stworzonych z udziałem środków publicznych, ale przyczynić się do powstania nieprzejrzystej, sprzyjającej korupcji struktury „fundacji rządowej”, w której zarówno zarządzanie, jak i kontrola pozostają w tych samych rękach. W efekcie uchwalenia ustawy, zawierającej art. 31, władzę w takich fundacjach mogą przejąć politycy. Tym samym instytucje, które ze swej istoty są apolityczne zostaną upolitycznione. Paradoksalnie, uzasadnieniem dla wprowadzenia nowej ustawy jest chęć zapobieżenia takim właśnie patologiom.

Projekt nowej ustawy o fundacjach wprowadza różnicowanie fundacji ze względu na pochodzenie środków, jakie otrzymały na realizację swoich celów statutowych, a jest to niezgodne z gwarantowaną przez Konstytucję RP zasadą równości. Zastrzeżenia dotyczące możliwej niekonstytucyjności projektu ustawy zgłosiło m.in. Rządowe Centrum Legislacji. Zarząd FNP w swoim stanowisku podkreślił, że finansowanie nauki wymaga istnienia niezależnej, niebudżetowej i apolitycznej instytucji odpowiadającej charakterem podobnym organizacjom w krajach zachodnich. Dotychczas fundacje założone z udziałem środków Skarbu Państwa działają tak samo jak inne fundacje w oparciu o ustawę o fundacjach i nadane im, zgodnie z wolą fundatora, statuty. Autorzy stanowiska podają, że FNP działa od 1991 r. FNP otrzymała wtedy 95 mln zł na realizację misji wspierania nauki. Mądrze inwestowane środki pozwoliły na powiększenie posiadanego kapitału do prawie 500 mln zł w 2007 r., przy jednoczesnym przekazaniu wsparcia naukowcom w wysokości 300 mln zł! Wieloletni dorobek FNP może być obecnie zagrożony. FNP podlega wielostopniowej kontroli. Organ nadzorczy FNP, Rada Fundacji, co roku zleca renomowanej firmie audytorskiej dokonanie kompleksowej kontroli księgowej, a wyniki, raporty finansowe i merytoryczne ze swej działalności Fundacja przedstawia zarówno Ministrowi Nauki i Szkolnictwa Wyższego, jak również, jako organizacja pożytku publicznego, Ministrowi Pracy i Spraw Społecznych. Raporty te Fundacja zamieszcza również na swoich stronach internetowych, gdzie publikuje Raport Roczny. Przejrzystość działania FNP

jest jednym z najważniejszych instrumentów budowania wiarygodności, zarówno w Polsce, jak i wobec partnerów zagranicznych, wśród których są m.in. tak szanowane w świecie nauki organizacje, jak Deutsche Forschungsgemeinschaft, Alexander von Humboldt Stiftung, Max Planck Gesellschaft, Research Council of Norway, National Science Foundation (USA), czy National Institutes of Health (USA).

Zarząd FNP wyraża nadzieję, że art. 31 projektu ustawy o fundacjach zostanie przez środowisko naukowe kraju uznany za wyraźną próbę naruszenia autonomii jednej z najważniejszych instytucji działających w Polsce na rzecz nauki, a także wyznaczającej standardy działania, na podobieństwo najważniejszych instytucji finansujących naukę w Europie i na świecie. Według Zarządu FNP art. 31 projektu ustawy o fundacjach przeczy idei społeczeństwa obywatelskiego, w którym obywatele solidarnie przejmują część obowiązków związanych z funkcjonowaniem Państwa i społeczeństwa jako wspólnoty. A na tym opiera się misja FNP, która tylko dzięki swej niezależności i statusowi organizacji pozarządowej może sprawnie i skutecznie wspomagać finansowanie nauki w Polsce, w sposób niemożliwy do osiągnięcia przez organy władzy państwowej (opracowano na podstawie i z wykorzystaniem cytatów z oryginału stanowiska FNP).

Międzynarodowa debata na temat efektywnego finansowania nauki odbyła się w końcu czerwca w Bibliotece Uniwersytetu Warszawskiego.

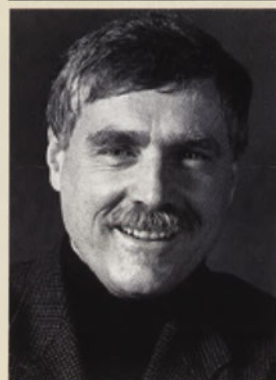


Fotografia 1. Prof. Ernst-Ludwig Winnacker.

Na pytanie „Jak efektywnie finansować naukę?” red. Marka Czyży z telewizyjnej Trójki (debatę transmitowała TV3), w dyskusji odpowiadali goście debaty, osobowości ze świata nauki europejskiej i polskiej: **prof. Ernst-Ludwig Winnacker** (Fot. 1), wieloletni prezes Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), a obecnie Sekretarz Generalny European Research Council (ERC), pierwszej paneuropejskiej organizacji wspierającej badania naukowe; **prof. Dieter Imboden** (Fot. 2),

prezes Research Council of the National Science Foundation (SNF) oraz wiceprezes EUROHORCS (European Heads of Research Councils), nieformalnego stowarzyszenia skupiającego szefów narodowych instytucji odpowiedzialnych za finansowanie badań w Europie; **prof. Michał Seweryński**, Minister Nauki i Szkolnictwa Wyższego RP oraz **prof. Maciej Żylicz** (Fot. 3), prezes FNP. Za pośrednictwem telewizji w debacie uczestniczył również **dr Wilhelm Krull**, prezes Fundacji Volkswagena, największej niezależnej organizacji „non-profit”, wspierającej badania naukowe w Niemczech. W trakcie dyskusji, gościom udało się zaprezentować i porównać

różnorodne doświadczenia odnoszące się do zasad finansowania nauki zarówno na szczeblu krajowym, jak i ogólnoeuropejskim. Uczestnicy de-



Fotografia 2. Prof. Dieter Imboden.



Fotografia 3. Prof. Maciej Żylicz.

baty odnieśli się do zachodzących obecnie w Europie zmian w podejściu do finansowania nauki. Doskonałym przykładem tych zmian jest Europejska Rada ds. Badań Naukowych (European Research Council). Organizacja ta oddaje całkowicie inicjatywę samym naukowcom, tak aby tematyka prowadzonych badań nie była rezultatem decyzji politycznych, lecz była inspirowana przez środowisko naukowe. Dyskutowano również o istotnej roli fundacji, które elastycznie i skutecznie wspomagają finansowanie nauki w sposób niemożliwy do osiągnięcia przez instytucje państwowe. Zarówno dr Krull, postępując się przykładem Fundacji Volkswagena, jak i pozostali zagraniczni goście, niejednokrotnie podkreślali, jak ważna jest autonomia i niezależność tych organizacji. Inicjując debatę, autorzy programu mają nadzieję, że jest to początek dyskusji, która z czasem przerozodzi się w międzynarodowe forum, służące wymianie myśli i doświadczeń na temat najskuteczniejszego systemu finansowania nauki (według PAP Nauka w Polsce).

Lublin – Miasto Wiedzy. Prof.

dr hab. Zdzisław Targoński (Fot. 4), rektor Akademii Rolniczej w Lublinie, wraz z pozostałymi rektorami wyższych publicznych uczelni Lublina, podpisał dokument uruchamiający realizację projektu Lublin – Miasto Wiedzy. Celem tego projektu jest utworzenie sieci współpracy pomiędzy szkołami wyższymi, jednostkami naukowymi, samorządem terytorialnym i przedsiębiorcami, a także przyciągnięcie do Lublina rzesz studentów nie tylko z kraju, ale i z zagranicy. Uroczystość podpisania umowy utworzenia konsorcjum odbyła się w auli Collegium Humanicum UMCS. Dokument podpisali: prof. Józef Kuczmazewski, rektor Politechniki Lubelskiej, ks. prof. Stanisław Wilk, rektor KUL, prof. Wiesław Andrzej Kamiński, rektor UMCS, dr Adam Wasilewski, prezydent Lublina, prof. Zdzisław Targoński, rektor AR, prof. Andrzej Książek, rektor AM oraz prof. Józef Horabik, p.o. dyrektora In-



Fotografia 4. Prof. Zdzisław Targoński.

stytutu Agrofizyki PAN w Lublinie. Z dokumentu wynika, że projekt ma charakter regionalny, a jego realizacja ma podnieść funkcje metropolitarne miasta, a także wpłynąć na zwiększenie poziomu innowacyjności całego regionu. Realizacja projektu ma kosztować około 900 tys. zł. Trzy czwarte tej kwoty pochodzi z funduszy Unii Europejskiej, a reszta z budżetu Państwa. Efektem programu ma być promowanie Lublina jako ważnego ośrodka akademickiego, integracja środowiska naukowego, rozszerzenie współpracy z przedsiębiorcami, zwiększenie transferu wiedzy. W Lublinie powstanie eksploratorium wraz z parkiem nauki (centrum interaktywnej edukacji i prezentacji wiedzy prawdopodobnie na terenach Parku Ludowego) oraz ośrodek Eko-tech będący najnowocześniejszym laboratorium w Polsce, służącym rolnictwu, produkcji żywności i ochronie środowiska; lubelskie uczelnie będą ściślej ze sobą współdziałać, tworząc m.in. międzyuczelniany Wydział Biotechnologii (wg informacji zawartej na stronie www. AR w Lublinie).

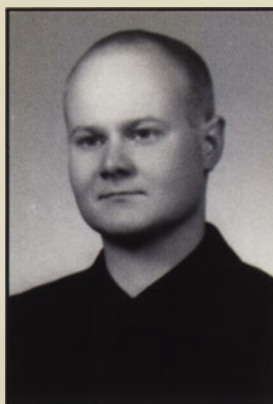
Stypendium National Institutes

of Health (Bethesda, USA) otrzymał dr med. Marek Masiuk (32 lata, Fot. 5), asystent w Zakładzie Patomorfologii Katedry Patologii Wydziału Lekarskiego Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie. Dr Masiuk otrzymał 2-letnie stypendium, które umożliwi mu prowadzenie badań w Laboratorium Immunopatologii

w Narodowym Instytucie Alergii i Chorób Zakaźnych w Rockville (istnieje możliwość przedłużenia pobytu o rok). Badania będą dotyczyć mechanizmów progresji chłoniaków strefy brzeżnej śledziony u myszy do chłoniaków rozlanych z dużych komórek B (chłoniaki o niskim i wysokim stopniu złośliwości). Laboratorium w Rockville jest jednym z najlepszych ośrodków zajmujących się układem chłonnym u myszy. Dr

Masiuk, związany ze środowiskiem biochemicznym Szczecina, traktuje uzyskanie przez siebie stypendium naukowego NIH jako sukces tego środowiska.

Dr M. Masiuk jest absolwentem Wydziału Lekarskiego Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie (2000 r., dyplom z wyróżnieniem, średnia ocen 4,81). Stopień doktora nauk medycznych uzyskał 21.09.2004 r. na podstawie wyróżnionej Summa cum laude rozprawy „Ocena ekspresji nukleoliny i jej wewnątrzrodowej dystrybucji w estrogeno-ujemnych i estrogeno-dodatnich rakach sutka u kobiet przy pomocy laserowego cytometru skaningowego”. Specjalizację II stopnia z patomorfologii uzyskał w dniu 24.04.2007 r. Podczas studiów był stypendystą Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej (lata 1997/98 do 1999/2000). W latach 1997–2000 był wyróżniany i nagradzany za prezentacje wyników swoich badań podczas sesji Studenckich Towarzystw Naukowych. Otrzymał też nagrodę w konkursie „Najwszechstronniejszy Student Pomorskiej Akademii Medycznej” w roku akademickim 1999/2000 oraz nagrody zespołowe (I-go stopnia) Rektora PAM w Szczecinie za publikacje w latach 2004 i 2005. W roku akademickim 2000/2001 dr Masiuk był opiekunem Studen-



Fotografia 5. Dr Marek Masiuk.

ckiego Koła Naukowego przy Zakładzie Patomorfologii PAM, zaś w latach 2002–2003 kierownikiem projektu „Ocena ekspresji nukleoliny i jej wewnątrzkomórkowej dystrybucji w estrogeno-dodatnich i estrogeno-ujemnych rakach sutka u kobiet” finansowanego przez KBN. Główne kierunki badań i zainteresowań naukowych dr Masiuka obejmują m.in. znalezienie związku pomiędzy poziomem syntezy nukleoliny, białka c-myc i receptora estrogenowego a rozwojem raka sutka u kobiet, zastosowania laserowej cytometrii skaningowej i analizy obrazu do oceny poziomu i rozmieszczenia receptora estrogenowego α w rakach sutka, różnice molekularne pomiędzy rakiem przewodowym i zrazikowym

sutka, zastosowanie metod cytometrycznych w biologii molekularnej.

Dr M. Masiuk posiada w swoim dorobku 12 oryginalnych publikacji w czasopismach recenzowanych o zasięgu międzynarodowym, a także bogaty dorobek publikacyjny w innych czasopismach recenzowanych i materiałach konferencyjnych. Jest aktywnym członkiem towarzystw naukowych, w tym Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (od 1997 r.), Polskiego Towarzystwa Patologów (od 2002 r.) i Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki (od 2005 r.). Jest żonaty z dr med. Magdaleną Bańkiewicz-Masiuk, adiunktem w Zakładzie Patologii Ogólnej PAM, specjalizującą się w dermatologii i chorobach wenerycznych. Poza zainteresowaniami zawodowymi bez reszty zajmują Go: turystyka, narciarstwo, rośliny domowe i stare mikroskopy.

Stypendia zagraniczne FNP dla młodych doktorów (Program KOLUMB). W rozstrzygniętej w czerwcu b.r. osiemnastej edycji konkursu 15 młodych naukowców otrzymało roczne stypendia na badania w zagranicznych placówkach naukowych. W dziedzinie nauk matematyczno-przyrodniczych stypendia otrzymali m.in.: **dr Marcin Binkowski** z Zakładu Komputerowych Systemów Biomedycznych Uniwersytetu Śląskiego – staż w Institute of Orthopaedics & Musculoskeletal Science, University College London (Wielka Brytania) w celu opracowania nowej innowacyjnej metody badania mikrostruktury tkanki kostnej do oceny stopnia jej mineralizacji z wykorzystaniem ilościowej tomografii wysokiej rozdzielczości; **dr Tomasz Dziezic** z Kliniki Neurologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego – staż w Institut für Neuropathologie, Georg-August-Universität Göttingen (Niemcy) w celu określenia roli białka tau i beta-amyloidu w uszkodzeniu neuronów u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym; **dr Krzysztof Giannopoulos**

(Fot. 6) z Katedry i Zakładu Immunologii Klinicznej Akademii Medycznej w Lublinie – staż w Labor für Tumorimmunologie, Universitätsklinikum Ulm (Niemcy) poświęcony identyfikacji nowych celów immunoterapii chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową; **dr Bartosz Karaszewski** (Fot. 7) z Kliniki Neurologii Dorosłych Akademii Medycznej w Gdańsku – staż w Division of Clinical Neurosciences, Brain Imaging Research Centre, University of Edinburgh (Wielka Brytania) w celu wyjaśnienia udziału określonych białek mitochondrialnych, reakcji zapalnych i temperatury tkanki nerwowej w zjawisku neuroprotekcji w ostrej fazie udaru niedokrwiennego mózgu; **dr Małgorzata Pilot** z Muzeum i Instytutu Zoologii PAN w Warszawie – staż w School of Biological and Biomedical Sciences, University of Durham (Wielka Brytania) w celu przeprowadzenia badań porównawczych nad wpływem czynników ekologicznych i behawioralnych na genetyczną strukturę populacji u mobilnych ssaków lądowych i morskich: wilka i orki; **dr Jarosław Zalewski** z Instytutu Kardiologii Collegium Medicum



Fotografia 7. Dr Bartosz Karaszewski.

(Belgia) w celu określenia związku pomiędzy wielkością strefy o nieprawidłowej reperfuzji, mierzoną za pomocą rezonansu magnetycznego, a właściwościami skrzepu u pacjentów z zawałem serca, leczonych metodą angioplastyki wieńcowej.

Stypendium finansowane z przekazanych FNP środków funduszu „Maria Skłodowska-Curie Joint Fund II” otrzymał **dr Piotr Kwiatkowski** (Fot. 8) z Instytutu Chemii Organicznej PAN w Warszawie w celu odbycia rocznego stażu w Department of Chemistry, Princeton University (USA) poświęconego badaniom asymetrycznych reakcji kaskadowych wobec organokatalizatorów oraz ich wykorzystaniu w syntezie produktów naturalnych. Informacje o stypendiach można uzyskać u koordynatora programu, Krystyny Frąk, tel. 022 845-95-11, e-mail: krystyna.frak@fnp.org.pl. Laureaci programu KOLUMB, po powrocie do kraju, mogą się ubiegać o grant wspomagający dla stypendystów zagranicznych FNP, a także o subwencję w programie POWROT/HOMING.

Polskie Towarzystwo Biochemiczne przyznało nagrodę im. Jakuba Karola Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną (lub zespół ściśle ze sobą powiązanych prac) z zakresu biochemii, a wykonaną w pracowni na terenie Polski w roku 2006. Laureatami nagrody są: Grzegorz Kudła, Leszek Lipiński, Fanny Caffin, Aleksandra Helwak i Maciej Zylicz za pracę „High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian



Fotografia 6. Dr Krzysztof Giannopoulos.

w Krakowskim Szpitalu Specjalistycznym im. Jana Pawła II – staż w Department of Cardiovascular Medicine, Katholieke Universiteit Leuven

cells” opublikowaną w PLoS Biol., 4(6): e180 (933-942).

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przyznał **nagrodę im. Bolesława Skarżyńskiego** za najlepszy artykuł opublikowany w kwartalniku „Postępy Biochemii” w 2006 roku: Jolancie Skalskiej, Grażynie Dębskiej-Vielhaber, Marcie Głąb, Boguszowi Kulawiakowi, Dominice Malińskiej, Izabeli Koszeli-Piotrowskiej, Piotrowi Bednarczykowi, Krzysztofowi Dołowemu i Adamowi Szewczykowi za pracę „Mitochondrialne kanały jonowe”, *Postępy Biochemii* 52 (2): 137-144.

Polskie Towarzystwo Biochemiczne – Sekcja Kwasów Nukleinowych oraz Sigma-Aldrich Polska przyznały nagrodę za najlepszą pracę doświadczalną lub teoretyczną z zakresu chemii i biochemii kwasów nukleinowych, wykonaną głównie w Polsce, za 2006 rok: Bartoszowi Brzezisz, Marcinowi Schmidtowi, Izabeli Makałowskiej, Arturowi Jarmałowskiemu, Joannie Pieńkowskiej



Fotografia 8. Dr Piotr Kwiatkowski.

i Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej; praca „Identification of human tRNA: m5C methyltransferase catalysing intron-dependent m5C formation in the first position of the anticodon of the pre-tRNA Leu(CAA)” została opublikowana w *Nucleic Acids Research* 34(20), 6034-6043.

II edycja konkursu o nagrodę im. Artura Rojszczaka została w końcu czerwca rozstrzygnięta. Nagroda przyznawana jest młodemu uczonemu, który, obok wybitnych osiągnięć naukowych wyróżnia się humani-

styczna postawą, szerokimi horyzontami i umiejętnością przekraczania granic swojej specjalizacji naukowej. Na rozstrzygnięcie konkursu zaproszono troje nominowanych naukowców, dr Małgorzatę Łagisz, dr Sebastiana Kłoska i dr Zbigniewa Chanieckiego.

Dr Małgorzata Łagisz uzyskała stopień doktora w UJ. Zastosowała techniki molekularne i modelowanie komputerowe do określenia wpływu substancji chemicznych na populację bezkręgowców lądowych. Obecnie na Uniwersytecie w Newcastle (Wielka Brytania) realizuje grant Marii Curie Intra-European Fellowship (ESF) „Adaptation, migration and diversity in populations of *Tribolium castaneum*, a pest insect (AMADIN)”. Była twórczynią odbywających się do dziś Obozów Atrakcyjnych Konwentyki (Warsztaty Technik Prezentacji Naukowych w Zaborku). Ma też osiągnięcia w zakresie jeździectwa, fotografii, sportów walki. Odbyła kilka ekstremalnych podróży na Północ i Wschód.

Dr Sebastian Kłosek z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi swoją karierę naukową rozpoczął w Japonii. Czteroletnie stypendium rządu japońskiego umożliwiło mu pracę w zespole japońskich naukowców zajmujących się chorobami nowotworowymi głowy i szyi. Odkrył m.in. nowy mechanizm funkcjonowania receptora c-Met, związanego z przerzutowaniem oraz nieznaną wcześniej funkcję białka CD151. Wyniki jego badań zdobyły uznanie na kongresie chirurgów szczękowo-twarzowych (6th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, 49th Annual Meeting of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons). Podczas pobytu w Japonii na międzynarodowych festiwalach kultury, ale także w szkołach i przedszkolach japońskich przedsta-

wiał – w języku japońskim, którym biegle włada – historię, język, zabytki, kuchnię, a także piosenki i tańce polskie. Czynn timer uprawia malarstwo.

Dr inż. Zbigniew Chaniecki (Fot. 9) z Politechniki Łódzkiej, zaprezentował swoje prace dotyczące zastosowania tomografii w monitorowaniu i diagnozowaniu stanów dynamicznych w silosach, a także do wykrywania stanów awaryjnych procesów składowania i transportu materiałów sypkich. Jego wynalazki w tej dziedzinie są niestety nie opatentowane; uzyskały złote medale na 6-tej Międzynarodowej Wystawie Wynalazków „Innowacje



Fotografia 9. Dr Zbigniew Chaniecki.

2005” w Gdańsku, na 54-tej Światowej Wystawie Innowacji „Eureka 2005” w Brukseli oraz na Międzynarodowych Targach Wynalazczości 2006 w Seulu. Jednak nie one zadecydowały o przyznaniu właśnie dr Chanieckiemu Nagrody im. Artura Rojszczaka. Uznanie zdobyła jego praca z niepełnosprawnym studentem informatyki Politechniki Łódzkiej, Piotrem Wojtczakim. Dr Chaniecki od kilku lat dojeżdża do domu studenta, umożliwiając mu realizację indywidualnego toku studiów informatycznych. Unieruchomiony na wózku student korzysta ze specjalistycznego sprzętu komputerowego. Obsługuje komputer przy pomocy myszki nagłownej; ruchy głowy przekładane są na pozycję kursora myszki na ekranie monitora, a dmuchnięcia w specjalny ustnik realizują funkcje klawiszy myszki; tekst wprowadza do komputera przy pomocy klawiatury ekranowej sterowanej myszką, natomiast rysuje z użyciem odpowiednich programów graficznych. Dr Chaniecki jest przekonany, że wiedza i umiejętności Piotra pozwolą mu znaleźć pracę i uzyskać względną samodzielność życiową (Forum Akademickie).

SUPERHELISA 2007 – Ogólnopolski Konkurs Wiedzy Biochemicznej Studentów Wydziałów Lekarskich (czwarta edycja), zorganizowany przez Katedrę i Zakład Biochemii I Wydziału Lekarskiego AM w Warszawie, odbył się w dniach 21–22 maja.

Po raz pierwszy konkurs został zorganizowany przez Zakład Biochemii i Chemii Pomorskiej AM w 2004 r., a w kolejnych latach przez Katedrę i Zakład Biochemii AM w Poznaniu i Zakład Biochemii Collegium Medicum w Bydgoszczy. Konkurs składa się z trzech etapów. W pierwszym etapie uczestnicy odpowiadają na 100 pytań, w czasie nie dłuższym niż 100 minut. W drugim etapie uczestnicy w ciągu 50 minut pisemnie opracowują zagadnienia wynikające z 5 pytań przekrojowych. W trzecim etapie 10 studentów (finałowa grupa) odpowiada na 3 takie same pytania (wylosowane uprzednio przez jednego z uczestników) w czasie nie przekraczającym 15 minut. Wszystkie pytania Konkursu są wybierane z puli pytań przesłanych wcześniej do organizatora konkursu przez kierowników Zakładów Biochemii uczelni biorących udział. W IV edycji Konkursu uczestniczyło 13 zespołów, po 3 osoby w każdym zespole, z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Collegium Medicum UJ w Krakowie, Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach, Akademii Medycznej w Gdańsku, Akademii Medycznej w Warszawie (I i II Wydziału Lekarskiego), Collegium Medicum w Bydgoszczy, Akademii Medycznej we Wrocławiu, Akademii Medycznej w Lublinie (I i II Wydziału Lekarskiego), Uniwersytetu Wojskowo-Medycznego w Łodzi i Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie.

Laureatami IV edycji Konkursu SUPERHELISA 2007 w klasyfikacji indywidualnej zostali: Katarzyna Puźniakowska z UM w Poznaniu (I miejsce), Malwina Pietrzykowska z UM w Łodzi (II miejsce) i Kamil Kurza ze ŚIAM w Zabrze (III miejsce). W klasyfikacji zespołowej, podobnie jak w latach ubiegłych, I miejsce zajęli studenci Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, II miejsce studenci z AM w Gdańsku, a III miejsce z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Dzięki pomocy Prorektora ds. Dydaktyki, prof. dr hab. Piotra Zaborowskie-



Fotografia 10.

go oraz firm Merck i Sigma-Aldrich Laureaci otrzymali nagrody (Fot. 10), a wszyscy uczestnicy Konkursu, upominki (opracowano na podstawie materiałów przygotowanych przez prof. Annę Barańczyk-Kuźmę).

W roku 2006 już po raz 13 młodzi naukowcy ubiegali się o **Krajową Nagrodę Naukową z Zakresu Genetyki Roślin im. Stefana Barbackiego, ustanowioną przez Radę Naukową Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu**. Kapituła Nagrody przyznała dwie nagrody: nagrodę I stopnia dr Danucie Babuli z Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu za „Wkład w rozwój genomiki porównawczej na poziomie organizacji i funkcjonowania genomu *Brassica oleracea* L. i *Arabidopsis thaliana* L. Heynh” oraz nagrodę II stopnia dr Witoldowi Wachowiakowi z Instytutu Dendrologii Polskiej Akademii Nauk w Kórniku za „Badania dotyczące procesów hybrydyzacji i introgresji w naturalnych populacjach *Pinus mugo*, *Pinus sylvestris* i *Pinus uliginosa* oraz w roju mieszańcowym tych gatunków” (Sekretarz Kapituły Nagrody).

Prof. Zofia Żukowska (Fot. 11), kierując międzynarodowym zespołem na **Georgetown University w Waszyngtonie**, bada mechanizmy odpowiedzialne za nadwagę. Wcześniej wykazano, że o ile pod wpływem krótkotrwałego stresu można schudnąć, to przewlekły stres prowadzi do wzrostu masy ciała. Zespół kierowany przez prof. Żukowską podjął badania myszy karmionych odpowiednikami typowego „śmieciowego jedzenia” i poddawanych stresowi (przez godzinę dziennie trzymano je w płytkiej wodzie albo zamykano w jednej klatce z agresywnymi osobnikami). Okazało się, że takie postępowanie w krótkim czasie prowadzi do otyłości oraz rozwoju cukrzycy i nadciśnienia. Wykazano, że istnieje związek pomiędzy wydzie-

laniem pod wpływem stresu neuro-peptydu Y (NPY), a zwiększonym gromadzeniem się tłuszczu w tkankach. Musi temu towarzyszyć przewlekły stres i dieta bogata w cukry i tłuszcze. NPY jest neuroprzekaznikiem wydzielanym w rdzeniu przedłużonym, podwzgorzu i autonomicznym układzie nerwowym (szczególnie w neuronach noradrenergicznych). Jest regulatorem rytmu dobowego organizmu, odpowiada na stres, funkcji seksualnych oraz łaknienia (wzmaga apetyt). Hormon ten wzmacnia działanie noradrenaliny (związa naczynia krwionośne), reguluje także odpowiedź układu odpornościowego na zakażenia, aktywując lub hamując komórki układu odpornościowego. Uwalnianie NPY wzrasta po wysiłku fizycznym, pod wpływem stresu lub drażnienia impulsami elektrycznymi o wysokiej częstotliwości. Grupa badawcza prof. Żukowskiej odkryła, że zablokowanie



Fotografia 11. Prof. Zofia Żukowska.

receptorów NPY zapobiega odkładaniu tłuszczu i prowadzi do szybkiego chudnięcia już w dwa tygodnie po podaniu blokera neuropeptydu. Wyniki przeprowadzonych w waszyngtońskim laboratorium doświadczeń wskazują, że można oddziaływać na poziom tkanki tłuszczowej; przynajmniej w przypadku myszy. U ludzi, narażonych na przedłużające się stresy, podobnie jak u myszy, zaczyna zwiększać się masa ciała wskutek niezauważalnie zmienianej diety na wysokokaloryczną. Profesor Żukowska ma nadzieję, że wyniki badań pozwolą na opracowanie narzędzi umożliwiających leczenie tzw. zespołu metabolicznego u ludzi (nadciśnienie, cukrzyca, otyłość, powikłania naczyniowe). Obserwowane złagodzenie zaburzeń tolerancji glukozy, insulinooporności, nadciśnienia tętniczego krwi i chorób zapalnych po zredukowaniu otyłości brzusznej u myszy pozwala, Jej zdaniem, pozytywnie myśleć o powodzeniu wprowadzania nowych technik regulujących masę ciała u ludzi w stresie. Zdaniem prof. Żukowskiej badania u ludzi zostaną wdrożone w ciągu dwóch lat.

Prof. Zofia Żukowska jest absolwentką AM w Warszawie. W roku 1979 uzyskała stopień doktora nauk medycznych. W latach 1978–1980 wy-

kładala i prowadziła badania w Klinice Chorób Wewnętrznych, Nadciśnienia Tętniczego i Angiologii na macierzystej uczelni, a od 1980 do 1986 roku aktywnie współpracowała z Amerykańskim Narodowym Instytutem Zdrowia (NIH). Od 1991 r. przebywa w Waszyngtonie na Georgetown University, gdzie pełni funkcję kierowniczkę Wydziału Fizjologii i Biofizyki. Skupia się nad poznaniem roli NPY m.in. w otyłości, angiogenezie, nadciśnieniu tętniczym i arteriosklerozie. Prof. Żukowska jest członkiem American Physiological Society, Council for High Blood Pressure Research, Council on Atherosclerosis Society for Hypertension, Polskiej Akademii Nauk i Society for Neuroscience (według PAP, Nauka w Polsce).

Prof. Bogusław Buszewski prezydentem stowarzyszenia Societas Humboldtiana Polonorum (SHP), skupiającego byłych stypendystów prestiżowej Fundacji im. A. von Humboldta. Funkcję przewodniczącego ZG Polskiego Oddziału Stypendystów Humbolta będzie pełnił przez 3 lata. Fundacja von Humboldta jest jedną z najważniejszych fundacji stypendialnych w Europie. Dzięki niej ponad 1200 polskich naukowców miało możliwość skorzystania z długoterminowych stypendiów, które umożliwiły im prowadzenie prac badawczych w niemieckich uczelniach i instytucjach. Sam Buszewski także był stypendystą fundacji, dzięki stypendium pracował na Uniwersytecie w Tübingen w Niemczech.

Profesor B. Buszewski urodził się w 1951 roku. Ukończył studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W roku 1999 uzyskał tytuł profesora chemii. W latach 1974-1976 pracował jako asystent w Zakładzie Chemii Fizycznej UMCS, a później, do roku 1994, w Zakładzie Fizyki Chemicznej i Fizykochemicznych Metod Rozdzielania. W tym czasie rozpoczął też formowanie własnej grupy badawczej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika i objął funkcję kierownika Zakładu Chemii Środowiska i Ekoanalitiky (obecnie Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky). W swojej karierze Bogusław Buszewski prowadził także badania na uniwersytetach w Niemczech, USA, Japonii, Wielkiej

Brytanii, Republice Południowej Afryki, Holandii i Tajwanie. Do głównych zainteresowań naukowych Buszewskiego należą analiza środowiskowa, chromatografia i techniki pokrewne, spektroskopia, fazy stacjonarne, charakterystyka powierzchni, adsorpcja, analiza terenowa, utylizacja odpadów i ścieków, chemometria i modelowanie molekularne. Jest wiceprzewodniczącym Komitetu Chemii Analitycznej PAN oraz członkiem Rad Naukowych 19 krajowych i międzynarodowych czasopism. Pełni też funkcję przewodniczącego Central European Group for Separation Sciences (CEGSS). Należy do Steering Committee w Division of Environmental Chemistry w Federation of European Chemical Societies (FECS) oraz European Associations of Separation Sciences (EuASS). Jest on współautorem 12 monografii, licznych patentów, wykładów oraz ponad 200 artykułów. Należy do grona najczęściej cytowanych chemików w Polsce (ponad 1500 cytowań). Był wielokrotnie odznaczany przez wiele krajowych i międzynarodowych organizacji.

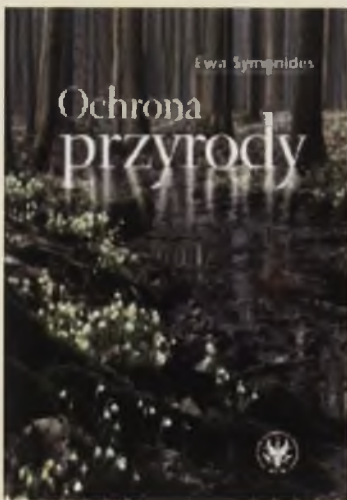
VI Ogólnopolską Konferencję Naukową „BIOLOGIA KWITNIENIA ROŚLIN I ALERGIE PYŁKOWE” zorganizują w Lublinie, w dniach 8-9 listopada b.r. Katedra Botaniki AR w Lublinie, Lubelskie Towarzystwo Naukowe, PAN Oddział Lubelski, Komisja Medycyny Wsi, Polskie Towarzystwo Botaniczne, Polskie Towarzystwo Nauk Ogrodniczych, Ośrodek Badania Alergenów Środowiskowych. Pracami organizacyjnymi kieruje prof. Elżbieta Weryszko-Chmielewska. Program Konferencji obejmuje: wpływ czynników zewnętrznych na przebieg kwitnienia roślin, nowe aspekty badań nad zapyleniem i zapłodnieniem roślin, budowę nektarników i nektarowanie roślin, budowę osmoforów i emisję substancji zapachowych, przebieg pylenia i wydajność pyłkową roślin owadopylnych, rolę owadów w procesie zapylenia roślin oraz monitoring zawartości pyłku alergogenego w atmosferze. Konferencja odbędzie się w siedzibie Lubelskiego Towarzystwa Naukowego w Lublinie, Plac Litewski 2 (Pałac Czartoryskich) oraz w Centrum Kongresowym AR, ul. Akademicka 15.

Konkurs Fundacji HASCO-LEK – Edycja 2007. Fundacja HASCO-LEK z

siedzibą we Wrocławiu zaprasza do udziału w II edycji konkursu na najlepsze prace doktorskie i magisterskie obejmujące nowe odkrycia i innowacje w dyscyplinach farmaceutycznych i pokrewnych. Celem konkursu jest wyłonienie najlepszych prac doktorskich i magisterskich, a także promocja ich autorów oraz dokonanych przez nich odkryć z zakresu farmacji, biotechnologii, medycyny, chemii i innymi pokrewnych dziedzin w aspekcie ich zastosowań w przemyśle farmaceutycznym lub przemysłach pokrewnych. Zgłoszenia pracy doktorskiej lub magisterskiej powinien dokonać autor pracy lub wyjątkowo promotor, dziekan wydziału uczelni lub dyrektor instytutu naukowego za zgodą autora.

Warunkiem uczestnictwa w konkursie jest przesłanie na adres Fundacji „Hasco-Lek” (ul. Żmigrodzka 242 E, 51-131 Wrocław) następujących dokumentów: wydrukowanego egzemplarza pracy, elektronicznej wersji pracy na płycie CD, kopii oceny pracy dokonanej przez recenzentów, zaświadczenia z uczelni lub instytutu naukowego potwierdzającego, że praca została ukończona i obroniona, karty zgłoszeniowej do udziału w konkursie (do pobrania na www.hasco-lek.pl/fundacja), zgody na przetwarzanie i publikację danych osobowych oraz oświadczenia uczestnika konkursu (www.hasco-lek.pl/fundacja). Do wymienionych dokumentów należy dołączyć pisemną rekomendację pracy udzieloną przez promotora lub rektora, dziekana, organizację branżową, redakcję czasopism branżowych lub inne podmioty, związane ze środowiskiem medycznym, farmaceutycznym i pokrewnym. Organizator może odrzucić zgłoszenie udziału w konkursie i nie przyznać nagrody w razie stwierdzenia braku formalnych zgłoszenia. Termin nadsyłania zgłoszeń upływa dnia 30 listopada 2007 r. Rozstrzygnięcie konkursu nastąpi do dnia 29 lutego 2008 r. Dla zwycięzców konkursu na najlepszą pracę doktorską Organizator ufundował nagrody: I – 6000 zł, II – 4000 zł, III – 3000 zł. Dla zwycięzców konkursu na najlepszą pracę magisterską Organizator ufundował nagrody: I – 4000 zł, II – 3000 zł, III – 2000 zł.

Wyboru najlepszych prac dokona Komisja Konkursowa, w której skład wędą profesorowie wyższych uczelni oraz przedstawiciele Zarządu i Rady Fundacji. Z chwilą otrzymania nagrody przez zwycięzcę na Organizatora przechodzą majątkowe prawa autorskie i pokrewne do nagrodzonej pracy. Szczegółowe warunki uczestnictwa w konkursie i wyłaniania jego zwycięzców określa Regulamin Konkursu (pełna jego treść jest dostępna na stronie www.hasco-lek.pl/fundacja oraz w siedzibie Organizatora). Informacje o konkursie można uzyskać w godzinach od 7 do 15 po numerami telefonów: 071 3271961 lub 071 3271963 oraz drogą mailową: ahamkalo@hasco-lek.pl i erudkowska@hasco-lek.pl.



III Edycję Konkursu Popularyzator Nauki organizuje serwis **Nauka w Polsce** Polskiej Agencji Prasowej oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Celem konkursu jest promowanie ludzi nauki, zespołów naukowych, dziennikarzy i redakcji, wyróżniających się w popularyzacji nauki polskiej w społeczeństwie. Konkurs rozgrywany jest w dwóch kategoriach: naukowiec lub instytucja naukowa oraz dziennikarz lub redakcja. Zgłoszenia kandydatów – z opisem ich dokonań – należy kierować **do końca października 2007 roku** na adres e-mail: naukawpolsce@pap.pl.

KSIĄŻKI NADEŚLANE

Ewa Symonides, Ochrona przyrody. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, wyd. 1, 2007 r., cena 56 zł. Podręcznik ochrony przyrody, odnoszący się do realiów prawnych i przyrodniczych Polski, na który czekają od lat studenci wielu kierunków przyrodniczych, ochrony środowiska i uczelni rolniczych, a także coraz szersze grono zawodowych służb

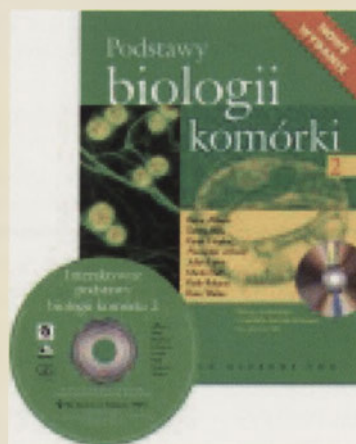
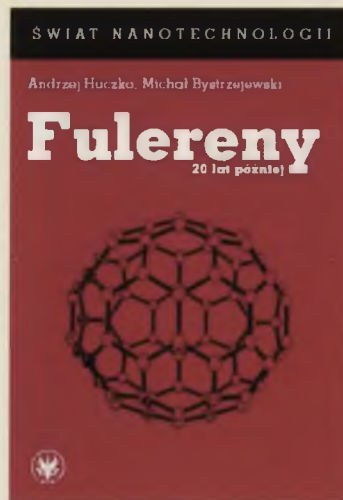
ochrony przyrody oraz działacze ekologicznych. Jest to zarazem znakomita pomoc dla twórców nowego prawodawstwa i planów przestrzennego zagospodarowania kraju. Autorka, prof. Ewa Symonides, jest doświadczonym nauczycielem akademickim, a jednocześnie dysponuje doskonałą znajomością tej problematyki od strony praktycznej, nabytą na stanowisku Głównego Konserwatora Przyrody, a przedtem przewodniczącej Państwowej Rady Ochrony Przyrody. Książka zaopatrzona jest w bogaty materiał ilustracyjny oraz płytę CD, na której zgromadzone najważniejsze akty prawne regulujące kwestie ochrony przyrody w naszym kraju.

Andrzej Huczko, Michał Bystrzejewski, Fulereny – 20 lat później. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, wyd. 1, 2007 r., cena 42 zł. Obszerne podsumowanie dotychczasowego stanu wiedzy na temat nowych nanostruktur węglowych oraz perspektyw rozwoju nanotechnologii. Książka ta adresowana jest do studentów uniwersytetów i uczelni politechnicznych na kierunkach fizycznych, chemicznych, elektronicznych oraz inżynierii materiałowej, a także pracowników wyższych uczelni oraz instytutów naukowo-badawczych. Zainteresuje również z pewnością osoby śledzące najnowsze trendy w fizykochemii ciała stałego, elektronice i inżynierii materiałowej. Napisana żywym, przystępnym językiem od pierwszego do dwunastego rozdziału przykuwa uwagę czytelnika, prezentując historię najważniejszych odkryć w tej dziedzinie od 1985 roku, kiedy świat dowiedział się

o istnieniu tej allotropowej odmiany węgla, a następnie omawiając metody otrzymywania fulerenów, mechanizmy ich powstawania, właściwości fizyko-chemiczne oraz różnorodne prototypowe i perspektywiczne zastosowania z uwzględnieniem zarejestrowanych dotychczas patentów. Dużo uwagi poświęcono bogatej (nieomal 2700 cytowań) literaturze przedmiotu, ułatwiającej zainteresowanemu czytelnikowi dotarcie do bardziej szczegółowych informacji źródłowych.

Bruce Alberts, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter – Podstawy Biologii Komórki. Tłumaczenie: pod red. Przemysława Wojtaszka i Hanny Kmity. PWN, wyd. 2 zmienione, 2007 r., cena 168 zł. Znakomite wprowadzenie w skomplikowane zagadnienia budowy i funkcjonowania komórek.

Obecne wydanie, oprócz uzupełnienia tekstu o najnowsze odkrycia naukowe, zawiera nowe rozdziały poświęcone ewolucji genów i genomów oraz molekularnym mechanizmom podziałów komórkowych i molekularnym podstawom dziedziczenia. Nowością jest omówienie sekwencji genomu człowieka, a także opisanie nowoczesnych technik i metod badawczych. W podręczniku położono akcent na przejrzystość. Tekst jest krótki, natomiast wiodącą rolę spełniają liczne wielobarwne poglądowe rysunki; niektóre zgromadzone na dwustronicowych panelach problemowych. Każdy rozdział zawiera: streszczenie, hasła kluczowe i pytania towarzyszące tekstowi – odpowiedzi są na końcu książki. Do książki dołączoną płytę CD-ROM z licznymi animacjami, schematami i fotografiami.



pod redakcją Teresy Wesołowskiej

Zygmunt Wasylewski urodził się 13 czerwca 1942 roku w Chrzanowie. Tam też ukończył szkołę podstawową i w 1956 roku podjął naukę w Technikum Mechanicznym, którą po roku kontynuował w Technikum Koksochemicznym w Chorzowie, gdzie uzyskał świadectwo dojrzałości. W latach 1962-1968 studiował chemię na Wydziale Matematyczno-Fizyczno-Chemicznym Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Pracę magisterską wykonał pod kierunkiem profesora W. Ostrowskiego w Międzywydziałowej Katedrze Chemii Fizjologicznej krakowskiej Akademii Medycznej. W pracy, zatytułowanej „Wyznaczanie parametrów cząsteczkowych fosfomonoestery metodą sączenia molekularnego”, Zygmunt Wasylewski przedstawił wyznaczone eksperymentalnie wartości efektywnego promienia Stokesa, współczynnika dyfuzji oraz masy cząsteczkowej fosfomonoestery. Następnie przez rok mgr Wasylewski pracował na stanowisku asystenta naukowo-technicznego w Zakładzie Koloidów Katedry Chemii Fizycznej Wydziału Mat-Fiz-Chem. UJ. W 1969 roku rozpoczął pracę w kierowanym przez profesora Reifera Zakładzie Biochemii Roślin rodzącego się właśnie (1970 rok) Instytutu Biologii Molekularnej UJ. Tematyka badawcza tego Zakładu nie pokrywała się jednak z zainteresowaniami młodego magistra, który w 1971 roku przeniósł się do kierowanego przez prof. Marię Sarnicką-Keller Zakładu Biochemii Zwierząt tegoż Instytutu. Już w dwa lata później mgr Wasylewski obronił doktorat pt. „Własności molekularne różnorodnych form kwaśnych fosfatów z wątroby i leukocytów”, którego promotorem był prof. A. Koj. W pracy tej, posługując się z wyczuciem technikami chromatograficznymi, elektroforetycznymi oraz stosując ultrawirowanie w gradiencie gęstości, mgr Wasylewski określił stopień oligomeryzacji cząsteczek badanych fosfatów oraz geometrię ułożenia białkowych podjednostek, a także wykazał podobieństwo strukturalne kwaśnych fosfatów wyizolowanych z różnych



tkanek. W dalszej pracy zainteresowania naukowe doktora Zygmunta Wasylewskiego koncentrowały się wokół oddziaływań białek modelowych z niejonowymi i jonowymi detergentami, w tym w szczególności z detergentami kationowymi. W badaniach tych posługiwał się szeregiem zaawansowanych metod fizykochemicznych takich jak: techniki spektroskopii w podczerwieni, Ramana, EPR, techniki hydrodynamiczne jak filtracja żelowa, ultrawirowanie czy dializa równowagowa. Samodzielność i zaangażowanie zaowocowały obfitością publikacji i tytułem doktora habilitowanego uzyskanym w ciągu zaledwie sześciu lat (1979 rok).

Nowy rozdział w życiu naukowym doktora Wasylewskiego otworzył wyjazd na roczne (1979/80) stypendium do San Antonio (Texas University), gdzie zainteresował się zastosowaniem metody spektroskopii fluorescencji w badaniach struktury, własności i dynamiki białek. Trzeba podkreślić, że metody te pozwalają w łatwy sposób badać białka w roztworach wodnych, stanowiąc tym samym (obok NMR) niezbędne uzupełnienie dla metod krystalograficznych. Docenta Wasylewskiego (tytuł docenta uzyskał w 1981 roku) można zaliczyć w poczet pionierów wdrażania technik fluorymetrycznych do biochemii białek. Obiektem „fluorescencyjnych” dociekań doc. Wasylewskiego były w tym okresie enzymy, takie jak, rodanaza, sulfotransferaza tiosiarczanu, heksokinaza drożdżowa, dehydrogenaza alkoholowa, metaloproteinaza, kinaza fosfoglicerianu, a także ludzki inhibitor reszt tryptofanowych. Rezultatem tych prac były powstałe m.in. przy współpracy z prof. Horowitzem artykuły, dotyczące indukowanych temperaturą i wiązaniem liganda zmian konformacyjnych białek w roztworze. Dalszemu rozwojowi w tej dziedzinie sprzyjała też współpraca doc. Wasylewskiego z prof. Efftingiem z Mississippi University (1986/87 roczny i w 1991 roku 3 miesięczny pobyt w charakterze *visiting*

professor). W 1986 roku doc. Wasylewski wraz z kierowanym przez siebie zespołem badawczym opracował technikę rozkładu złożonych widm emisji fluorescencji białek wielo-tryptofanowych za pomocą wygaszania fluorescencji (FQRS – ang. *fluorescence-quenching-resolved-spectroscopy*). Technika ta jest dziś szeroko stosowana i znalazła swoje miejsce w renomowanych podręcznikach z zakresu spektroskopii fluorescencji.

W 1989 roku doc. Wasylewski uzyskał tytuł profesora biochemii, a w 1991 roku, istniejąca już od początku lat 80-tych, kierowana przez Niego grupa badawcza (Pracownia Fizykochemii Biopolimerów działająca w obrębie Zakładu Biochemii Zwierząt) została przekształcona w Zakład Biochemii Fizycznej. Zaplecze aparaturowe, wtedy jeszcze pracowni prof. Wasylewskiego, było stosunkowo bogate, a to dzięki niespotykanym zdolnościom konstruktorskim, uporowi i entuzjazmowi profesora Wasylewskiego, który projektował urządzenia, szukał wykonawców dla podzespołów projektowanej aparatury daleko poza murami Uniwersytetu, a następnie często własnoręcznie skręcał i montował poszczególne elementy. Trzeba tu przypomnieć, że możliwości pozyskiwania funduszy na zakup specjalistycznego sprzętu przez środowiska naukowe były wówczas niemal żadne, ale w momencie, kiedy sytuacja nieco się poprawiła, czyli mniej więcej w połowie lat 90-tych, Profesor niezwłocznie rozpoczął starania o zakup wysokiej klasy aparatury pomiarowej.

Początkowo zainteresowania badawcze prof. Wasylewskiego skupiały się na wykorzystaniu metody FQRS i innych technik fluorescencyjnych do badania dynamiki molekularnej białek (m.in. parwalbuminy, melityny) w roztworze, ale też w modelowych układach błon biologicznych i w micelach. Zajmował się On wówczas badaniem mechanizmów wygaszania fluorescencji, efektu *red edge* oraz jakościową i ilościową analizą widm emisji fluorescencji. Jednak nieco później wykrystalizował się główny obszar tematyczny Zakładu Biochemii Fizycznej, który dotyczył wpływu wiązania funkcjonalnych ligandów przez bakteryjne białka

regulatorowe na strukturę, dynamikę i funkcję tychże białek. Obiektami badawczymi prof. Wasylewskiego były białka regulujące procesy transkrypcji *E. coli* tzn.: represor operonu tryptofanu (TrpR), represor tetracykliny (TetR) oraz białko wiążące cAMP (CRP).

Koordynowane przez prof. Wasylewskiego badania nad represorem tryptofanu z wykorzystaniem zmodyfikowanego białka pozbawionego zupełnie reszt tryptofanowych pozwoliły na określenie charakteru mikrootoczenia L-tryptofanu lokującego się w białku, a także wykazały znaczące zmiany w obszarze kieszeni wiążącej L-tryptofan pod wpływem wiązania się kompleksu TrpR-L-tryptofan do DNA. W badaniach tych wykorzystano technikę FQRS, a także stacjonarne i rozdzielcze w czasie pomiary emisji fluorescencji tryptofanu, jak również pomiary dichroizmu kołowego. Prowadzone równolegle badania represora tetracykliny z wykorzystaniem tych samych metod pomiarowych i mutantów białkowych zawierających pojedyncze reszty tryptofanu umożliwiły poznanie dynamiki konformacyjnej domeny białka odpowiedzialnej za oddziaływanie z DNA oraz charakterystykę zmian strukturalnych domen TetR zachodzących w wyniku interakcji białka z tetracykliną lub operatorowymi fragmentami DNA. Z kolei zastosowanie metody zatrzymanego przepływu (ang. *stopped-flow*) z detekcją fluorescencyjną pozwoliło na scharakteryzowanie kinetycznego mechanizmu oddziaływania białka TetR z DNA, a także na kinetyczny opis procesu indukcji ekspresji genów kodujących białka oporności pod wpływem wiązania tetracykliny, jak również na określenie roli jonów magnezu w procesie indukcji. Zastosowanie metody izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego (ITC) umożliwiło poznanie termodynamiki oddziaływania TetR – tetracyklina, natomiast na podstawie danych uzyskanych techniką różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) zaproponowano model procesu termicznej denaturacji TetR i scharakteryzowano wpływ tetracykliny na stabilność białka.

Najobszerniejszą i prawdopodobnie najcenniejszą część dorobku naukowego prof. Wasylewskiego stanowią prace dotyczące białka CRP. Przygoda z CRP rozpoczęła się, można by rzec

niewinnie, od charakterystyki własności fluorescencyjnych białka. Ale już nieco późniejsze, niełatwe kinetyczne badania z wykorzystaniem techniki zatrzymanego przepływu pozwoliły poznać stabilność oraz kinetykę zwijania i rozwijania białka, zaś dzięki zastosowaniu selektywnego fluorescencyjnego znakowania reszt cysteiny możliwe stało się zaproponowanie szczegółowego mechanizmu denaturacji chemicznej białka CRP. Urzeczywistnienie pomysłów Profesora dotyczących dalszych badań nad funkcją i strukturą białka CRP wymagało wprowadzenia wielu mutacji punktowych w „newralgicznych” obszarach białka. Realizacja tego ostatniego celu była tyleż wyzwaniem, ileż pociągającą perspektywą. Dzięki niezłomności Profesora w dążeniu do wytyczonego celu, w obrębie Zakładu Biochemii Fizycznej powstała jedna z pierwszych w Instytucie Biologii Molekularnej pracownia biologii molekularnej, w której metodą *overlap extension PCR* wprowadzano mutacje, weryfikując je następnie poprzez sekwencjonowanie DNA. Intensywność badań prowadzonych nad wieloma mutantami białka CRP wymogła konieczność modyfikacji technik hodowli bakteryjnych i oczyszczania białek. Efektem tego było wprowadzenie do procedur laboratoryjnych zaawansowanych metod chromatografii powinowactwa oraz automatyzacja preparatyki białka, możliwa dzięki wykorzystaniu biofermentora i specjalistycznego układu chromatograficznego. Zastosowanie mutantów pozwoliło na monitorowanie, wywołanych oddziaływaniem z ligandem, zmian allosterycznych w CRP, dzięki czemu opisany został szczegółowy kinetyczny mechanizm wiązania cAMP. Jednocześnie prowadzone były wszechstronne badania strukturalne (z użyciem DLS, FRET, wygaszania fluorescencji, stacjonarnych i rozdzielczych w czasie pomiarów emisji i anizotropii fluorescencji) mające na celu opisanie zmian konformacyjnych w białku wywołanych jego oddziaływaniem z cAMP i DNA. Z kolei badania termodynamiki tworzenia kompleksu CRP-cAMP przeprowadzone zostały z wykorzystaniem metod mikrokalorymetrycznych (ITC, DSC). Ponieważ struktura krystalograficzna białka CRP nieskompleksowanego z ligandem nie jest do tej pory znana w środowisku naukowym toczyła się dyskusja na temat symetrii strukturalnej podjednostek homodimeru. W kontek-

ście powstałego problemu badawczego zrodził się nowy nietuzinkowy pomysł prof. Wasylewskiego dotyczący konstrukcji heterodimeru białka CRP posiadającego tylko jedną resztę tryptofanu. Wyniki badań kinetyki wiązania cAMP monitorowanej przez transfer energii fluorescencyjnym przyłączonym do reszty cysteiny, znajdującej się w tej samej co Trp lub drugiej podjednostce białka, wykazały symetrię konformacyjną podjednostek białka CRP.

Uwieńczenie pracy z CRP stanowił projekt mający na celu zbadanie wzajemnych oddziaływań pomiędzy elementami całego kompleksu transkrypcyjnego *E. coli* z wykorzystaniem wybranych fragmentów promotorowych DNA. Realizacja tego trudnego projektu wymagała rekonstrukcji polimerazy RNA z oczyszczonych rekombinowanych podjednostek białkowych. Tworzenie kompleksu transkrypcyjnego, w skład którego, obok polimerazy RNA wchodził kompleks CRP-cAMP, monitorowano przez pomiary anizotropii fluorescencji znakowanych fluorescencyjnie odcinków DNA. W efekcie określono wpływ CRP na specyficzne i niespecyficzne interakcje RNAP-DNA. Ponadto zastosowanie spektroskopii fluorescencyjnej rozdzielczej w czasie (FRET, anizotropia fluorescencji) umożliwiło badanie dynamiki konformacyjnej kompleksów transkrypcyjnych.

Profesora Wasylewskiego fascynowały odkrycia techniczne w dziedzinie biochemii fizycznej i inżynierii molekularnej, którymi przecież koniec wieku XX eksplodował. Nie tylko podążał za nimi, aktualizując swoją wiedzę, ale wykorzystywał je praktycznie jako użyteczne narzędzia w codziennej pracy. Talent konstruktorski Profesora, ale i pragmatyczny rys Jego osobowości ujawniły się po raz kolejny w momencie, gdy wkraczając na zupełnie nowe obszary tematyki naukowej, rozpoczął On badania nad wzajemnymi relacjami ludzkich receptorów neuroprzekazników w błonach plazmatycznych. Przypuszczenia na temat ich heterodimeryzacji udało się po raz pierwszy potwierdzić eksperymentalnie właśnie dzięki Niemu, a należy podkreślić, że konkurencja w tej dziedzinie nauki jest ogromna. Planowane eksperymenty miały polegać na pomiarze czasów życia fluorescencji białek fluorescen-

cyjnych związanych z receptorami w pojedynczej żywej komórce i wymagały zastosowania skomplikowanej aparatury, na zakup której nie było jednak środków. Potrzeba odpowiedzi na postawione pytanie była dla Profesora tak paląca, że korzystając z dostępnych w laboratorium podzespołów stworzył funkcjonalny układ pomiarowy.

Ostatni rok życia prof. Wasylewskiego wypełniły głównie prace nad konkretyzowaniem dwóch zupełnie nowych projektów naukowych. Jeden z nich dotyczył ludzkiego białka regulatorowego Ying-Yang1 i stanowił pewną analogię i rozszerzenie badań prowadzonych na bakteryjnym białku CRP, drugi zaś miał polegać na zastosowaniu metod genomiki i proteomiki do badania wpływu leków przeciwdepresyjnych na profil białkowy komórki nerwowej. Etap ten zakończył się pełnym sukcesem manifestującym się pozyskaniem środków finansowych potrzebnych na realizację zamierzonych zadań.

Prof. Wasylewski był kierownikiem czterech 3-letnich projektów badawczych i jest autorem lub współautorem ponad 60-ciu publikacji naukowych. W 1991 roku został odznaczony Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski, a w 2002 roku uzyskał tytuł profesora zwyczajnego. Był też członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, a od początku lat 90-tych wielokrotnie był członkiem sekcji biologii molekularnej, biochemii i biofizyki Komitetu Badań Naukowych.

Drugim bardzo ważnym aspektem aktywności zawodowej profesora Wasylewskiego była praca dydaktyczna. Jako asystent prowadził zajęcia laboratoryjne w ramach pracowni specjalistycznej z biochemii. Później, już jako adiunkt (1973 rok) – również z analizy instrumentalnej w biochemii. W 1980 roku doc. Wasylewski rozpoczął wykłady z biochemii fizycznej, które ściśle harmonizowały z prowadzonymi przez pracowników Jego Pracowni zajęciami laboratoryjnymi. Po ukształtowaniu się pracowni biologii molekularnej, w 1998 roku, wprowadził kurs inżynierii białka, który obejmował zarówno ćwiczenia, jak i wykłady. Szczególnie ten ostatni kurs cieszy się dużym zainteresowaniem studentów, gdyż w całościowy sposób ujmuje zagadnienie otrzymywania mutantów białkowych,

począwszy od manipulacji na poziomie DNA, przez izolację białka aż po określenie jego podstawowych własności strukturalnych i sprawdzenie aktywności biologicznej. Wraz z wprowadzeniem specjalizacji biochemii na kierunku Biotechnologii powstały dwa wysoce zaawansowane kursy: biochemia fizyczna II i inżynieria białka II. Prof. Wasylewski był promotorem 13 prac doktorskich i kilkudziesięciu prac magisterskich, był też recenzentem wielu prac naukowych i projektów badawczych.

Prof. Wasylewski był zawsze życzliwy studentom, zawsze miał dla nich czas i co rzadkie, pojawiających się w zakładzie młodych ludzi obdarzał wielkim kredytem zaufania. Potrafił przyciągać studentów na wiele sposobów; w jednych rozbudzał żywe zainteresowanie tematyką lub metodyką, innych зараżał naukowym entuzjazmem, a jeszcze innych ujmował swoją otwartością i urokiem osobistym. Pewna studentka zapytana przez Profesora, czym chciałaby się zajmować w swojej pracy magisterskiej odpowiedziała – „Ja to bym chciała sklonować Mozarta”, na co Profesor odpowiedział – „A my to właśnie robimy”. Ta anegdota pokazuje jedną ważną cechę profesora Wasylewskiego: był On wizjonerem, wytyczał sobie cele, które dla innych mogły pozostawać jedynie w sferze marzeń i bez kompleksów dążył do ich realizacji. Lubił otaczać się młodymi ludźmi, którzy byli w stanie podzielać Jego entuzjazm i optymizm.

Analizując Jego rozwój naukowy widać wyraźnie ewolucję tematyki, która stawała się coraz bardziej złożona, ale też coraz bardziej ważka, bardziej interesująca i jednocześnie coraz trudniejsza. Życie zawodowe profesora Wasylewskiego nierozłącznie splecione było z życiem Instytutu Biologii Molekularnej (Wydział BiNoZ UJ). W latach 1981–1984 pełnił funkcję Zastępcy Dyrektora Instytutu ds. dydaktyki, a w latach 1997–2003 funkcję kierownika studiów doktoranckich. Był współtwórcą kierunku Biotechnologia i brał udział w procesie wyodrębnienia się Wydziału Biotechnologii UJ (2002 rok). Kilkakrotnie podejmował wysiłki zmierzające do utworzenia kierunku studiów Biochemii, będąc głęboko przekonany o potrzebie wzmocnienia kondycji swojej ukochanej dyscypliny nauki. Starania


te niestety zakończyły się niepowodzeniem i pozostały niespełnionym marzeniem Profesora.

Prof. Wasylewski był człowiekiem, któremu leżało na sercu dobro kraju, o czym świadczyć może Jego zaangażowanie w działalność opozycyjną w okresie stanu wojennego i później. Był On jednym z sześciu członków uniwersyteckiej Tajnej Komisji Zakładowej Solidarności. Komisja ta, złożona z rekomendowanych członków oficjalnej struktury Solidarności była wyrazem sprzeciwu ludzi nauki wobec *sponiewierania*, którego doświadczali od „ludzi systemu”. Działała ona w latach 1982–1988, a jej głównymi zadaniami było: przełamanie monopolu informacji „systemu” poprzez kolportaż prasy podziemnej, pomoc represjonowanym naukowcom, a także kontrola wewnętrzna władz uczelni poprzez opiniowanie kandydatów na ważne stanowiska. Działalność Komisji wiązała się z poważnym ryzykiem, czego jej członkowie byli świadomi, ale poczucie obowiązku wobec Uczelni i wobec kraju, a przede wszystkim poczucie godności kazały im to ryzyko podejmować. Co ciekawe, przez pewien czas spotkania Komisji odbywały się w mieszkaniu prof. Wasylewskiego. Później powstała Tajna Komisja Międzyuczelniana, w której prof. Wasylewski był reprezentantem UJ. Te ważne fakty z życia Uniwersytetu wciąż czekają na opisanie, podobnie jak inne, nie zawsze chlubne, szczegóły z tamtego trudnego okresu, ale, co brzmi obiecująco, stały się one w ostatnim czasie obiektem badań specjalnej Komisji Senackiej UJ.

Prof. Wasylewski był człowiekiem niezwykle energicznym, wiecznie młodym duchem, ale również bardzo sprawnym fizycznie. Jego pasją było narciarstwo i był rzeczywiście świetnym narciarzem, o czym mogli się przekonać naocznie uczestnicy dorocznej instytutowej szkoły zimowej. Był wyjątkowym człowiekiem łączącym w sobie wydawałoby się sprzeczne cechy pragmatyka i idealisty. Zapatrzony w przyszłość, pogodny, rodzinny, po prostu ludzki, odszedł nagle, w kwiecie wieku, pograżając w żalu współpracowników i przyjaciół.


Sylwia Kędracka-Krok

Zakład Biochemii Fizycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, Kraków

Anna Winiarska-Mieczan 

Małgorzata Kwiecień

Instytut Źywnienia Zwierząt, Akademia Rolnicza w Lublinie

 Instytut Źywnienia Zwierząt, Akademia Rolnicza w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-635 Lublin; tel.: (081) 445 67 44, e-mail: amieczan@poczta.onet.pl

Artykuł otrzymano 9 stycznia 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 22 marca 2007 r.

Słowa kluczowe: alergia pokarmowa, owomukoïd, budowa, mechanizm działania

Wykaz skrótów: OM – ang. *avian ovomucoid first domain*; OMBWS – ang. *ovomucoid domains from black-winged stilt*; OMCHI – ang. *chicken ovomucoid*; OMCHI-1 – ang. *chicken ovomucoid first domain*; OMCHI-2 – ang. *chicken ovomucoid second domain*; OMCHI-3 – ang. *chicken ovomucoid third domain*; OMJPQ-1 – ang. *japanese quail ovomucoid first domain*; OMJPQ-2 – ang. *japanese quail ovomucoid second domain*; OMJPQ-3 – ang. *japanese quail ovomucoid third domain*; OMTKY-3 – ang. *turkey ovomucoid third domain*

STRESZCZENIE

Jaja kurze zaliczane sà do najwaŹniejszych alergenów pokarmowych człowieka. Cztery najczêściej uczulajàce białka zawarte w jaju to: owomukoïd (Gal d1), owoalbumina (Gal d2), owotransferyna (Gal d3) oraz lizozym (Gal d4). Owomukoïd jest jednym z waŹniejszych alergenów wystêpujących w białku jaja kurzego. Jest to glikoproteina zbudowana ze 186 aminokwasów, o masie molekularnej 28000 Da oraz punkcie izoelektrycznym równym 4,1. Czàsteczka owomukoïdu zbudowana jest z trzech homologicznych domen, ułożonych liniowo i połączonych wiàzaniem peptydowymi, które pełnią funkcję inhibitorów proteaz serynowych. Domeny w owomukoïdach wszystkich gatunków ptaków zawierają sześć reszt cysteiny, zlokalizowanych w podobnych miejscach, tworzące trzy mostki dwusiarczkowe Cys-Cys między domenami w białku. Owomukoïd posiada wàłciwoœci antybakteryjne wynikajàce ze zdolnoœci hamowania bakteryjnych enzymów proteolitycznych niezbêdnych do ich rozwoju. Liczne badania wskazujà, że owomukoïd jest termostabilny.

WPROWADZENIE

Terminem alergii pokarmowej okreœla siê niepoŹądane reakcje po spoŹyciu pokarmów, u podłóŹa których leŹà mechanizmy immunologiczne. Choroby alergiczne stanowią jeden z najwaŹniejszych problemów współczesnej medycyny. W ostatnich latach nastąpił gwałtowny wzrost zapadalnoœci na te choroby, co spowodowane moŹe być wieloma czynnikami: zwiêkszeniem spoŹycia niektórych produktów spoŹywczych (np. egzotycznych owoców), wykorzystywaniem do przygotowania posiłków przetworzonej Źywnoœci czy zwiêkszenia kontaktu z różnego rodzaju chemikaliami (kosmetyki, konserwanty, œrodki ochrony roœlin). Problem dotyczy zarówno dzieci, jak i dorosłych [1]. Choroby alergiczne, okreœlane mianem epidemii XXI wieku, wystêpujã przede wszystkim w krajach rozwiniętych.

Ludzie mogã nabywaç nadwraŹliwoœç na alergeny pokarmowe trzema drogami [2]. Najczêściej dochodzi do ich przenikania wraz ze spoŹywanym pokarmem. Drugà drogã jest przenikanie alergenów drogami oddechowymi, trzeciã natomiast, spotykana przede wszystkim u dorosłych, jest kontakt ze skórã. Warunkiem koniecznym do rozwoju choroby alergicznej jest genetyczna skłonoœç do nadmiernego wytwarzania przeciwciał z grupy IgE.

Manifestacja kliniczna alergii pokarmowej moŹe być bardzo różnorodna, zależy ona zarówno od rodzaju alergenu, jak i od osobniczej reakcji organizmu na antygen [3]. Wykazano, że poczàtek i manifestacja chorób alergicznych sã zwiãzane z wiekiem człowieka. Proces rozwoju schorzeń alergicznych oraz sekwencjê powstawania i manifestacji uczuleń u dzieci przedstawia tzw. marsz alergiczny [2]. Pierwsze zetknięcie organizmu z alergenem powoduje wytworzenie swoistych przeciwciał z grupy IgE. Kolejny kontakt z alergenem wywołuje juŹ objawy choroby. U niemowląt najczêściej dochodzi do reakcji ze strony przewodu pokarmowego, nastêpnie pojawiajã siê zmiany na skórze, natomiast kolejnym etapem (u dzieci kilkulatnich) jest wystêpowanie chorób ukłãdu oddechowego (np. astma) oraz spojówek i œluzówki nosa.

W 1995 roku eksperci œwiatowej Organizacji Zdrowia i Organizacji Narodów Zjednoczonych ds. WyŹywnienia i Rolnictwa sklasyfikowali osiem grup produktów spoŹywczych, których alergeny najczêściej wywołujã alergie pokarmowe u ludzi na całym œwiecie. Listê tã potwierdziła Codex Alimentarius Commission w 1999 r. Zyskała ona miano „Wielkiej ósemki” [4]. Najczêstszymi alergenami sã białka: mleka, jaj, orzechów ziemnych, pozostałych orzechów, ryb, skorupiaków, soi oraz pszenicy [3,5].

Jaja sã produktami stanowiącymi istotny skłãdnik diety człowieka. W skłãd jaja wchodzi: białko (56–61%), Źółtko (27–32%) oraz skorupka (ok. 8–11%).

Głównym składnikiem białka jaja jest woda (ok. 88%) i część białkowa (ok. 10%). Składnikami żółtka są: woda – 50%, lipidy – 34% i białka – 16% [6]. Z licznych badań wynika, że większość czynników wywołujących alergię znajduje się w białku jaja. Głównymi alergenami białka są: owomukoid (Gal d1), owoalbumina (Gal d2), owotransferyna (Gal d3) oraz lizozym (Gal d4) [7-12]. W żółtku natomiast występuje a-liwityna, która może uczulać drogą wziewną poprzez oddziaływanie cząstek alergenu na śluzówkę układu oddechowego [6].

Celem pracy było zebranie informacji na temat budowy i właściwości alergizujących owomukoidu występującego w białku jaj najczęściej spożywanych przez człowieka. Przeanalizowano także sposoby inaktywacji tego alergenu.

BUDOWA OWOMUKOIDU BIAŁKA JAJA PTAKÓW

Owomukoid jest to glikoproteina zawierająca 20–25% węglowodanów. W skład cząsteczki wchodzi trzy łańcuchy polipeptydowe ułożone liniowo i połączone wiązaniami peptydowymi, pełniące rolę inhibitorów proteaz serynowych. Budowę typowego owomukoidu przedstawiono na przykładzie owomukoidu białka jaja kurzego OMCHI (Ryc. 1). Inhibitory wchodzące w skład owomukoidu należą do rodziny Kazala. Inhibitory z tej grupy wykazują aktywność w stosunku do trypsyny, chymotrypsyny i trombiny oraz innych enzymów proteolitycznych [13]. Są to związki krótkołańcuchowe, zawierające zwykle 50–60 reszt aminokwasowych, w których skład wchodzi najczęściej 6 reszt cysteiny [14,15]. Struktura cząsteczki jest „utrwalona” przez 3 wiązania dwusiarczkowe, które występują w pozycjach: CysI-CysV, CysII-CysIV i CysIII-CysVI. Mostek dwusiarczkowy CysI-CysV powoduje powstanie pierwszego koła (A-ring), mostek CysII-CysIV oddziela koło A od koła B (ang. B-ring), natomiast mostek CysIII-CysVI sprawia, że powstaje 3 koło (ang. C-ring) (Ryc. 2). Owomukoid stanowi około 10% masy peptydów białka jaja [16]. Posiada zwykle 7 centrów aktywnych, których umiejscowienie jest charakterystyczne dla gatunku ptaków (Tab. 1). Chemiczną charakterystykę owomukoidu przedstawiono w tabeli 2.

Owomukoid większości ptaków, a także inne glikoproteiny, zawierają w swym składzie galabiozę (α -D-galaktoza 1,4 D-galaktoza) [17-19].

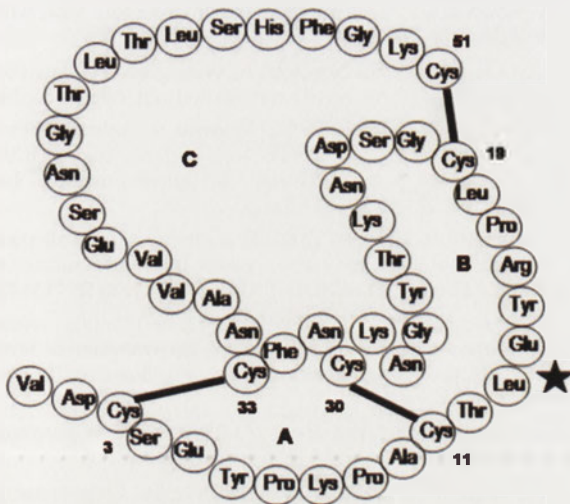
W białku jaja kurzego (*Gallus gallus*) stwierdzono obecność owomukoidu OMCHI, który zbudowany jest ze 186 reszt aminokwasowych [9]. Owomukoid ten jest cząsteczką o masie molekularnej równej 28 000 Da i punkcie izoelektrycznym równym 4,1 [16]. Struktura owomukoidu „utrwalona” jest przez 9 wiązań dwusiarczkowych, występujących w pozycjach: Cys5-Cys44, Cys22-Cys41, Cys30-Cys62, Cys70-Cys109, Cys87-Cys106, Cys95-Cys127, Cys138-Cys168, Cys146-Cys165 oraz Cys154-Cys186; miejsca aktywne zaś przy: Lys24, Arg89 oraz Ala103 [9,20]. W owomukoidzie tym stwierdzono obecność inhibitora z rodziny Kazala, występującego w trzech izomerycznych formach: OMCHI-1, OMCHI-2 oraz OMCHI-3, zbudowanych – odpowiednio – z 60, 60 i 51 reszt aminokwasowych. Tworzą one trzy podwójne domeny o właściwościach podobnych do białek globularnych. Inhibitory OMCHI wykazują aktywność antytrypsynową, antychymotrypsynową oraz antyelastynową [16]. Owomukoid jest glikoproteina, której cząsteczka zbudowana jest z 20–25% reszt węglowodanowych. Domeny I (OMCHI-1) i II (OMCHI-2) zawierają w sumie cztery łańcuchy węglowodanowe, natomiast domena III (OMCHI-3) zawiera jeden długi łańcuch węglowodanowy [16].

Znacznie rzadziej spożywane są przez ludzi jaja innych gatunków ptaków: przepiórki japońskiej (*Coturnix coturnix japonica*), strusia afrykańskiego (*Struthio camelus*), gęsi domowej (*Anser anser domestica*), kaczki domowej (*Anas domestica*), indyka (*Meleagris gallopavo*) czy gołębia (*Streptopelia risoria*).

Ponieważ przypuszcza się, że w owomukoidach trzecia domena jest odpowiedzialna za większość reakcji immunologicznych organizmu człowieka [16,21,22], badania struktury inhibitorów wchodzących w skład większości owomukoidów skupiły się głównie na tym fragmencie. Trzecia domena owomukoidu białka jaja strusia zbudowana jest z 51 reszt aminokwasowych, miejsce aktywne znajduje się w

	Ala	Glu	Val ³	Asp	Cys	Ser	Arg	Phe	Pro	Asn	Ala	Thr	Asp	Lys	Glu	Gly	16			
Lys	Asp	Val	Leu	Val	Cys	Asn	Lys	Asp	Leu	Arg	Pro	Ile	Cys	Gly	Thr	Asp	Gly	Val	Thr	36
Tyr	Thr	Asn	Asp	Cys	Leu	Leu	Cys	Ala	Tyr	Ser	Ile	Glu	Phe	Gly	Thr	Asn	Ile	Ser	Lys	56
Glu	His	Asp	Gly	Glu	Cys ²	Lys	Glu	Thr	Val	Pro	Met ⁶⁸	Asn	Cys	Ser	Ser	Tyr	Ala	Asn	Thr	76
Thr	Ser	Glu	Asp	Gly	Lys	Val	Met	Val	Leu	Cys	Asn	Arg	Ala	Phe	Asn	Pro	Val	Cys	Gly	96
Thr	Asp	Gly	Val	Thr	Tyr	Asp	Asn	Glu	Cys	Leu	Leu	Cys	Ala	His	Lys	Val	Glu	Gln	Gly	116
Ala	Ser	Val	Asp	Lys	Arg	His	Asp	Gly	Gly	Cys ²⁷	Arg	Lys	Glu	Leu	Ala	Ala	Val	Ser	Val ³⁶	136
Asp	Cys	Ser	Glu	Tyr	Pro	Lys	Pro	Asp	Cys	Thr	Ala	Glu	Asp	Arg	Pro	Leu	Cys	Gly	Ser	156
Asp	Asn	Lys	Thr	Tyr	Gly	Asn	Lys	Cys	Asn	Phe	Cys	Asn	Ala	Val	Val	Glu	Ser	Asn	Gly	176
Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	His	Phe	Gly	Lys	Cys ⁶⁶											186

Rycina 1. Sekwencja aminokwasów w owomukoidzie białka jaja kurzego; pogrubioną czcionką zapisano sekwencję w inhibitorze OMCHI-1: Val3-Cys62, OMCHI-2: Met68-Cys127, OMCHI-3: Val136-Cys186, na podstawie [9], zmodyfikowane.



Rycina 3. Inhibitor OMTKY-3 występujący w białku jaja indyka, na podstawie [13], zmodyfikowane.

gdzie E oznacza enzym, I oznacza inhibitor o nienaruszonym miejscu aktywnym, L jest to wolny, nonkowalentny półprodukt, C – stabilny, nieaktywny kompleks enzymu z inhibitorem w stosunku 1 : 1, X oraz L* – dwa półprodukty modyfikacji inhibitora, I* jest to zmodyfikowany inhibitor, w którym miejsca aktywne uległy hydrolizie. W wyniku hamowania enzymów powstaje bardzo stabilny kompleks połączony za pomocą miejsc aktywnych w inhibitorze oraz w enzymie.

Owomukoid jest uważany za czynnik alergizujący dla człowieka [16,30,31]. Jest to alergen, który ulega trawieniu, dzięki czemu jest dobrze tolerowany po spożyciu, natomiast wywołuje pokrzywkę kontaktową po zetknięciu jaja ze skórą [32]. Alergia na białko jaja kurzego zazwyczaj zaczyna się we wczesnym dzieciństwie, noworodek może się uczulić wskutek obecności antygenów w mleku matki. Badania wykazały możliwość wewnątrzmacicznego uczulenia płodu alergenami pokarmowymi [33].

U podłoża nadwrażliwości na owomukoid leży przede wszystkim reakcja antygeny z przeciwciałami IgE, w mniejszym stopniu natomiast z przeciwciałami IgG [6,16,21,31,32]. Kontakt organizmu z owomukoidem prowadzi do wzrostu wytwarzania IgE, co jest przyczyną wystąpienia reakcji alergicznej. Substancje alergizujące aktywują limfocyty Th2, czego skutkiem jest wytwarzanie cytokin. Cytokiny wpływają na zwiększone wytwarzanie IgE przez limfocyt B. Następnie, IgE wiąże się na powierzchni komórek tucznych i granulocytów zasadochłonnych, co prowadzi do degradacji komórki i uwolnienia m.in. histaminy, odpowiedzialnej za powstawanie objawów alergicznych u człowieka. Reakcja typu Th1 z kolei hamuje wytwarzanie IgE [34]. W owomukoidzie stwierdzono obecność siedmiu epitopów odpowiedzialnych za reakcję immunologiczną z paratopami IgE [31]. Zostały one zlokalizowane w łańcuchu polipeptydowym w miejscu reszt aminokwasowych: 40–52, 56–66, 71–75, 81–91, 161–174 oraz 179–186.

Budowa owomukoidu sugeruje, że długi łańcuch węglowodanowy występujący w domenie III może pełnić funkcję determinanta antygenicznego w owomukoidzie, skierowanego przeciwko IgE [32]. Badania Zhang i Mine [22] potwierdziły silne alergizujące właściwości domeny III w owomukoidzie białka jaja kurzego oraz związku łańcucha węglowodanowego z tymi właściwościami. Uważa się, że to właśnie łańcuch węglowodanowy, wchodzący w skład alergizujących glikoprotein, jest przyczyną immunologicznej reakcji krzyżowej z innymi alergenami [31].

Wykazano, że pomiędzy alergenami jaj różnych gatunków ptaków istnieje reakcja krzyżowa [35]. Zjawisko to występuje, gdy przeciwciała IgE wytworzone pierwotnie w kierunku jednego alergenu rozpoznają podobne białko pochodzące z innego źródła. Oddziaływanie między takimi białkami może spowodować reakcję alergiczną. Jeżeli antygeny posiadają epitopy identyczne lub bardzo podobne, przeciwciała IgE nie rozpoznają różnic pomiędzy nimi. Zauważono, że jeśli homologia sekwencji reszt aminokwasowych w epitopach wynosi mniej niż 50%, immunologiczna reakcja krzyżowa występuje rzadko, natomiast jeśli przekracza 70% – istnieje wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia takiej reakcji [36]. Antygeny reagujące krzyżowo z białkiem jaja kury wykryto w białku jaja indyka, gęsi, kaczki i mewy, a także we krwi kury [37]. Stwierdzono istnienie zespołu drób-jajko, który łączy uczulenie na żółtko jaja z uczuleniem na mięso drobiowe oraz uczuleniem wziewnym na ptasie pióra [31]. Owomukoid wyizolowany z białka jaja gołębia wywołuje reakcję krzyżową z antygenem grupowym krwi P1 człowieka. Zjawiska tego nie stwierdzono w przypadku owomukoidu znajdującego się w białku jaja kurzego [27]. Ponadto wiadomo, że obecność IgE skierowanych przeciwko alergenom jaja kurzego wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju innych chorób atopowych, takich jak astma, alergie na inne pokarmy, zapalenie skóry [38]. Wyższe miana IgE przeciwko owomukoidowi są stwierdzane u osób chorych szczególnie źle znoszących kontakt z jajkiem, zarówno bezpośredni, jak i bezdotykowy. Jednocześnie udowodniono, że u dzieci nie tylko poziom IgE jest odpowiedzialny za predyspozycje do uczulenia, należy wziąć również pod uwagę inne zaburzenia immunologiczne [3]. Wykazano także, że dzieci, w surowicy których istnieją IgE swoiste dla epitopów sekwencyjnych owomukoidu, wykazują większą skłonność do przetrwania alergii na jaja w porównaniu do dzieci posiadających fragmenty niesekwencyjne, które znacznie częściej wyrastają z uczulenia [30].

SPOSOBY ELIMINOWANIA AKTYWNOŚCI OWOMUKOIDU

Przeprowadzono szereg doświadczeń mających na celu określenie wpływu różnych czynników fizycznych i chemicznych na alergenność owomukoidu. Ograniczanie immunogennych właściwości owomukoidu sprowadza się przede wszystkim do inaktywowania aktywności antytrypsynowej tego związku [31,39].

Badania wskazują na termostabilny charakter owomukoidu [14,28,38,39]. Jednocześnie wykazano, że odczyn pH jaja wpływa zasadniczo na odporność na temperaturę aktyw-

ności antytrypsynowej owomukoidu [31,39]. Wartość pH wzrasta wraz z długością okresu przechowywania jaj. Obróbka termiczna jaj świeżych (pH 7,6) okazała się bardziej efektywna niż jaj przechowywanych dłużej [39-40].

Yang i wsp. [41] badali wpływ naświetlania roztworu owomukoidu w temperaturze pokojowej, używając lamp kobaltowych ⁶⁰Co jako źródła światła, na biochemiczne właściwości tego związku. Podczas procesu roztwór był nasycony tlenem, azotem lub tlenkiem azotu. Autorzy ci stwierdzili istotne obniżenie aktywności antytrypsynowej owomukoidu podczas naświetlania w obecności azotu. Kato i Matsuda [20] w doświadczeniu polegającym na inkubowaniu owomukoidu jaja kurzego i przepiórki japońskiej w obecności glukozy w temp. 50°C przy wilgotności względnej równej 65%, wykazali, że redukcja wolnych grup aminowych oraz guanidynowych w owomukoidzie powoduje obniżenie aktywności proteolitycznej inhibitora.

Mechaniczne usunięcie owomukoidu z białka jaja kurzego spowodowało zdecydowane obniżenie immunogennych właściwości tego pokarmu [31]. Prowadzone są również badania mające na celu inaktywację aktywności antytrypsynowej owomukoidu za pomocą modyfikacji genetycznych jaja [16,42].

PODSUMOWANIE

Jaja są produktami stanowiącymi istotny składnik diety człowieka. Jednocześnie produkty te należą do najczęstszych alergenów pokarmowych. Z licznych badań wynika, że większość czynników wywołujących alergię znajduje się w części białkowej jaja [43-45]. Jednym z najważniejszych alergenów jest owomukoid (Gal d1), glikoproteina zawierająca 20-25% węglowodanów. W skład cząsteczki wchodzi trzy niezależne izomeryczne łańcuchy inhibitorów proteaz serynowych ułożone liniowo, połączone wiązaniami peptydowymi. Inhibitory wchodzące w skład owomukoidu należą do rodziny Kazala. Inhibitory z tej grupy wykazują aktywność w stosunku do trypsyny, chymotrypsyny, trombiny oraz innych enzymów proteolitycznych. Wykazano, że pomiędzy białkami jaj różnych gatunków ptaków istnieje immunologiczna reakcja krzyżowa. Przeprowadzono wiele doświadczeń mających na celu określenie wpływu różnych czynników fizycznych i chemicznych na alergenicność owomukoidu. Należy zwrócić uwagę na fakt, że dotychczas nie udało się wyeliminować właściwości alergizujących owomukoidu, a jedynie je ograniczyć.

PIŚMIENNICTWO

1. Eigenmann PA (2004) Breaking frontiers for better early allergy diagnosis. *Allergy* 59: 895-896
2. Rudzki E (2005) Alergia pokarmowa. Część II – Ryby. *Post Dermatol Alergol* 4: 174-178
3. Latham F, Merino F, Lang A, Garvey J, Thomson MA, Walker-Smith JA, Davies SE, Phillips AD, Murch SH (2003) A consistent pattern of minor immunodeficiency and subtle enteropathy in children with multiple food allergy. *J Pediatr* 143: 39-47
4. Report of the FAO (1995) Technical Consultation on Food Allergies. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy
5. Host A, Andrae S, Charkin S, Diaz-Vazquez C, Dreborg S, Eigenmann PA, Friedrichs F, Grinstead P, Lack G, Meylan G, Miglioranza P, Muraro A, Nieto A, Niggemann B, Pascual C, Pouech MG, Rance F, Rietschel E, Wickman M (2003) Allergy testing in children: why, who, when and how? *Allergy* 58: 559-569
6. Poulsen LK, Hansen TK, Norgaard A, Vestergaard H, Skov PS, Bindslev-Jensen C (2001) Allergens from fish and egg. *Allergy* 56: 39-42
7. Aabin B, Poulsen LK, Ebbenhøj K, Nørgaard A, Frøkiær H, Bindslev-Jensen C, Barkholt V (1996) Identification of IgE-binding egg white proteins: comparison of results obtained by different methods. *Int Arch Allergy Immunol* 109: 50-57
8. Fu TJ, Abbott UR, Hatzos C (2002) Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid – a comparative study. *J Agric Food Chem* 50: 7154-7160
9. Kato I, Schrode J, Kohr WJ, Laskowski M Jr (1987) Chicken ovomucoid: determination of its amino acid sequence, determination of the trypsin reactive site, and preparation of all three of its domains. *Biochemistry* 26: 193-201
10. Murch S (2005) Diet, immunity, and autistic spectrum disorders. *J Pediatr* 146: 582-584
11. Guérin-Dubiard C, Pasco M, Mollé D, Désert C, Croguennec T, Nau F (2006) Proteomic analysis of hen egg white. *J Agric Food Chem* 54: 3901-3910
12. Saxena I, Tayyab S (1997) Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. *Cell Mol Life Sci* 53: 13-23
13. Lu SM, Qasim MA, Anderson S, Apostol I, Ardelt W, Bigler T, Chiang YW, Cook J, James MNG, Kato I, Kelly C, Kohr W, Komiyama T, Lin TY, Ogawa M, Otlewski J, Park SJ, Qasim S, Ranjbar M, Tashiro M, Warne N, Whatley H, Wieczorek A, Wieczorek M, Wilusz T, Wynn R, Zhang W, Laskowski M Jr (2001) Predicting the reactivity of proteins from their sequence alone: Kazal family of protein inhibitors of serine proteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1410-1415
14. DeKoster GT, Robertson AD (1997) Thermodynamics of unfolding for Kazal-type serine protease inhibitors: entropic stabilization of ovomucoid first domain by glycosylation. *Biochemistry* 36: 2323-2331
15. Nirmala X, Kodrik D, Zurovec M, Sehnal F (2001) Insect silk contains both a Kunitz type and a unique Kazal-type proteinase inhibitors. *Eur J Biochem* 268: 2064-2073
16. Kovacs-Nolan J, Zhang JW, Hayakawa S, Mine Y (2000) Immunochemical and structural analysis of pepsin-digested egg white ovomucoid. *J Agric Food Chem* 48: 6261-6266
17. Rahal-Sekkal M, Sekkal N, Kleb DC, Bleckmann P (2003) Structures and energies of D-galactose and galabiose conformers as calculated by ab initio and semiempirical methods. *J Comput Chem* 24: 806-818
18. Suzuki N, Khoo KH, Chen CM, Chen HC, Lee YC (2003) N-Glycan structures of pigeon IgG: a major serum glycoprotein containing Gala1-4Gal termini. *J Biol Chem* 278: 46293-46306
19. Suzuki N, Laskowski M, Lee YC (2004) Phylogenetic expression of Gala1-4Gal on avian glycoproteins: glycan differentiation inscribed in the early history of modern birds. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9023-9028
20. Kato Y, Matsuda T (1997) Glycation of proteinous inhibitors: loss in trypsin inhibitory activity by the blocking of arginine and lysine residues at their reactive sites. *J Agric Food Chem* 45: 3826-3831
21. Zhang JW, Mine Y (1998) Characterization of IgE and IgG epitopes on ovomucoid using egg-white-allergic patients' sera. *Biochem Biophys Res Comm* 253: 124-127
22. Zhang JW, Mine Y (1999) Characterization of residues in human IgE and IgG binding site by chemical modification of ovomucoid third domain. *Biochem Biophys Res Comm* 161: 610-613
23. Laskowski M Jr, Kato I, Ardelt W, Cook J, Denton A, Empie MW, Kohr WJ, Park SJ, Parks K, Schatzley BL, Schoenberger OL, Tashiro M, Vichot G, Whatley HE, Wieczorek A, Wieczorek M (1987) Ovomucoid third domains from 100 avian species: isolation, sequences, and hypervariability of enzyme-inhibitor contact residues. *Biochemistry* 26: 202-221
24. Krezel AM, Darba P, Robertson AD, Fejzo J, Macura S, Markley JL (1994) Solution structure of turkey ovomucoid third domain as determined from nuclear magnetic resonance data. *J Mol Biol* 23: 203-214

25. Yi Z, Vitek O, Qasim MA, Lu SM, Lu W, Ranjbar M, Li J, Laskowski MC, Bailey-Kellogg Ch, Laskowski M Jr (2006) Functional evolution within a protein superfamily. *Proteins* 63: 697-708
26. Lerrer B, Gilboa-Garber N (2001) Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* PA-III lectin with quail egg white glycoproteins. *Can J Microbiol* 47: 1095-1100
27. François-Gerard C, Gerday C, Beeley JG (1979) Turtle-dove ovomucoid, a glycoprotein proteinase inhibitor with P1-blood-group antigen activity. *Biochem J* 177: 679-685
28. Takahashi K, Kitao S, Tashiro M, Asao T, Kanamori M (1994) Inhibitory specificity against various trypsin and stability of ovomucoid from Japanese quail egg white. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 40: 593-601
29. Leontowicz H, Kulasek G (1998) Naturalne pokarmowe inhibitory enzymów trawiennych. *Medycyna Wet* 54: 159-165
30. Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, Wopfner N, Mari A (2004) Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy* 59: 243-371
31. Mine Y, Zhang JW (2001) The allergenicity of ovomucoid and the effect of its elimination from hen's egg white. *J Sci Food Agric* 15: 1540-1546
32. Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Itoh S, Kawasaki N, Kawanishi T, Hayakawa T, Kohno Y, Urisu A, Sawada JI (2005) Kinetic analysis of pepsin digestion of chicken egg white ovomucoid and allergenic potential of pepsin fragments. *Int Arch Allergy Immunol* 136: 23-32
33. Piotrowska-Jastrzębska JD (2005) Zapobieganie alergii u dzieci cz.I. *Por Farm* 5: 2-5
34. Sybilski AJ, Doboszyńska A (2005) Przewidywanie rozwoju alergii u dzieci na podstawie pomiaru całkowitego IgE we krwi pępowinowej. *Alergoprofil* 2: 18-26
35. Holen E, Elsayed S (1990) Characterization of four major allergens of hen egg-white by IEF/SDS-PAGE combined with electrophoretic transfer and IgE immunoautoradiography. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 91: 136-141
36. Aalberse RC (2000) Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 106: 228-238
37. Anibarro B, Seoane FJ, Vila C, Lombardero M (2000) Allergy to eggs from duck and goose without sensitization to hen egg proteins. *J Allergy Clin Immunol* 105: 834-836
38. Davis PJ, Williams SC (1998) Protein modification by thermal processing. *Allergy* 53(Suppl.): 102-105
39. Van der Plancken I, Van Remoortere M, Van Loey A, Hendrickx ME (2004) Trypsin inhibition activity of heat-denatured ovomucoid: a kinetic study. *Biotechnol Prog* 20: 82-86
40. Waheed A, Salhuddin A (1975) Isolation and characterization of a variant of ovomucoid. *Biochem J* 147: 139-144
41. Yang J-S, Kim J.-H, Matsuhashi S, Kume T (1996) Change in carbohydrates of chicken and quail ovomucoids by gamma radiation. *Radiat Phys Chem* 48: 731-735
42. Rupa P, Mine Y (2006) Engineered recombinant ovomucoid third domain can desensitize Balb/c mice of egg allergy. *Allergy* 61: 836-842
43. Stevens L (1991) Egg white proteins. *Comp Biochem Physiol B* 100: 1-9
44. Miguel M, Manso MA, Lopez-Fandino R, Ramos M (2005) Comparative study of egg white proteins from different species by chromatographic and electrophoretic methods. *Eur Food Res Technol* 221: 542-546
45. Li-Chan E, Nakai S (1989) Biochemical basis for the properties of egg white. *Crit Rev Poultry Biol* 2: 21-58

Avian egg's white ovomucoid as food-allergen for human

Anna Winiarska-Mieczan[✉], Małgorzata Kwiecień

Institute of Animal Nutrition, University of Agriculture in Lublin, 13 Akademicka St., 20-635 Lublin, Poland

[✉]e-mail: amieczan@poczta.onet.pl

Key words: food allergy, ovomucoid, structure, mechanism of action

ABSTRACT

Hen eggs are considered as the most common reason of a food allergy in humans. The most important allergens of egg white proteins are as follows: ovomucoid, lysozyme, ovalbumin and ovomucin. Ovomucoid is a Kazal-type protease inhibitor which accounts for about 10% of avian egg white protein. It is a glycoprotein containing 20 through 25% carbohydrates. The molecule of ovomucoid is composed of three homologous domains. All avian ovomucoid domains contain six cysteines in similar location that form three intradomain disulfide bonds. Ovomucoid (Gal d1) is one of the major allergen in hen's egg. It is a glycoprotein comprising 186 amino acids, and it has a molecular weight of 28000 Da and an isoelectric point of 4.1. Ovomucoid has antibacterial activity resulting from its ability to inhibit bacterial proteolytic enzymes crucial for microbial growth. Many studies reveal that ovomucoid is a thermo stable molecule.

Białko HAX-1: wielofunkcyjny czynnik wpływający na apoptozę, migrację komórek, endocytozę i transport mRNA

Maria Szwarc

Elżbieta Sarnowska

Ewa A. Grzybowska[✉]

Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytut, Warszawa

[✉]Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytut, ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa, e-mail: ewag@coi.waw.pl, tel.: (022) 546 23 68

Artykuł otrzymano 8 lutego 2007 r.

Artykuł zaakceptowano 20 kwietnia 2007 r.

Słowa kluczowe: HAX-1, apoptoza, migracja komórek, endocytoza, potranskrypcyjna regulacja ekspresji

Wykaz skrótów: TCR (ang. *T-cell receptor*) – receptory obecne na powierzchni limfocytów T; BCR (ang. *B-cell receptor*) – receptory obecne na powierzchni limfocytów B; 3'UTR (ang. *3' untranslated region*) – region nie ulegający translacji na 3' końcu transkryptu; Arp2/3 (ang. *actin-related protein complex*) – kompleks białkowy regulujący reorganizację filamentów aktynowych i przebudowę cytoszkieletu; białka ABC (ang. *ATP-binding cassette*) – białka transportujące zawierające domenę wiążącą ATP; MDR (ang. *multidrug resistance*) – rodzaj transporterów ABC odpowiedzialny za oporność wielolekową; BSEP (ang. *bile salt export pump*) – obecne w hepatocytach transportery ABC przenoszące kwasy żółciowe; białka PML – struktury jądrowe zawierające białko PML (ang. *promyelocytic leukemia protein*, białko białaczki promielocytowej), odgrywają rolę w kontroli transkrypcji i magazynowaniu określonych białek; VDAC (ang. *voltage-dependent anion channel*) – kanał anionowy regulowany przez zmiany potencjału błonowego; ANT (ang. *adenine nucleotide translocase*) – translokaza nukleotydów adeninowych

STRESZCZENIE

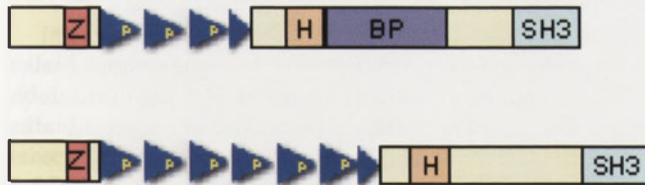
Białko HAX-1, opisane po raz pierwszy w 1997 roku, ma własności antyapoptotyczne, wpływa na migrację komórek, endocytozę i, prawdopodobnie, na transport mRNA. Budowa domenowa białka HAX-1 wskazuje na jego podobieństwo do białek z rodziny Bcl-2, choć brak bezpośredniej homologii. Wykazano, że białko HAX-1 jest substratem proteazy Omi/HtrA2, odpowiedzialnej za degradację kaspaz, oraz jest inhibitorem kaspazy-9, co powoduje, że białko to jest bardzo istotnym regulatorem apoptozy. Odkryto szereg oddziaływań białka HAX-1, zarówno z białkami uczestniczącymi w apoptozie, jak i zaangażowanymi w proces migracji oraz tworzenie cytoszkieletu. Inne badania dowodzą wiązania się tego białka do 3' końców niektórych transkryptów, co sugeruje, że HAX-1 uczestniczy w regulacji ekspresji określonych mRNA. Pewne dane wskazują na to, że regulacja ta może polegać na kontrolowaniu transportu transkryptów w komórce. Wielofunkcyjność białka HAX-1 i jego zaangażowanie w procesy kluczowe dla stanu komórki sugerują, że białko to może uczestniczyć w procesie nowotworowym i powstawaniu przerzutów (wykazano, że gen kodujący białko HAX-1 ulega nadeskpresji w niektórych nowotworach). Wiadomo także, że brak lub nadeskpresja genu kodującego białko HAX-1 jest przyczyną pewnych chorób dziedzicznych oraz chorób o charakterze systemowym (choroba Kostmanna, łuszczyca, twardzina układowa). Dokładne zbadanie wszystkich funkcji tego białka może się zatem okazać bardzo istotne z punktu widzenia medycyny.

ODKRYCIE BIAŁKA HAX-1

Związanie się antygeny z kompleksem receptorów limfocytów T (TCR) lub limfocytów B (BCR) prowadzi do aktywacji tych komórek oraz ich proliferacji. Efektem tego procesu jest powstanie klonów limfocytów B – wydzielających określone przeciwciała – lub limfocytów T, wypełniających swoje funkcje pomocnicze lub cytotoksyczne. Innym skutkiem aktywacji receptorów limfocytów może być wywołanie, na drodze apoptozy, śmierci komórek rozpoznających swoje swoiste antygeny. Mechanizmy prowadzące do aktywacji procesu proliferacji lub śmierci komórki po przekazaniu sygnałów od receptorów do komórki nie zostały jeszcze w pełni poznane. Pierwszą odpowiedzią na związanie się antygeny z receptorem jest natychmiastowa aktywacja niereceptorowych kinaz tyrozynowych, jak Syk, oraz kinaz należących do rodziny Src (Lyn, Fyn, Lck, i Blk). Prowadzi to do fosforylacji wielu wewnątrzkomórkowych białek, między innymi: fosfolipazy C γ 1 i C γ 2, kinazy fosfatydyloinozytolu-3 oraz białka aktywującego GTPazę Ras. Fosforylacja reszt tyrozyny jest mechanizmem powszechnie wykorzystywanym do regulacji procesów biologicznych, nie tylko proliferacji i indukcji śmierci komórki, jak ma to miejsce w limfocytach, ale także w takich zjawiskach, jak migracja i różnicowanie. Końcowym etapem przekazywania sygnału od receptorów jest indukcja ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne, takich jak *c-myc* czy *c-fos*, które decydować będą o dalszych losach komórki [1].

Jednym z białek, które podlega fosforylacji przez kinazy tyrozynowe tuż po aktywacji receptorów limfocytów B i T, jest HS1 (ang. *hematopoietic specific protein 1*) [2,3]. W limfocytach B HS1 jest fosforylowane przez współpracujące ze sobą kinazy Lyn i Syk, a w limfocytach T – przez kinazy Fyn i Zap-70. Białko to występuje tylko w komórkach hematopoetycznych i, pomimo że posiada sygnał lokalizacji jądrowej, umiejscawia się głównie w cytoplazmie w nieaktywowanych limfocytach B. Pod wpływem fosforylacji ulega ono jednak przemieszczeniu do jądra komórkowego, przekazując dalej sygnał od aktywowanych receptorów [4]. HS1 może być także fosforylowane przez kinazę serynowo-treoninową CK2, która *in vitro* wzmagają fosforylację tego białka przez kinazy tyrozynowe [5].

HS1 zawiera na końcu aminowym zasadowy motyw oraz powtarzającą się trzy i pół raza sekwencję, zwaną powtórzeniem kortaktynowym lub HS1 (ang. *cortactin or HS1 repeat*), składającą się z 37 reszt aminokwasowych. Ta powtarzająca się sekwencja wykazuje podobieństwo do motywów wiążących DNA



Rycina 1. Porównanie budowy białka HS1 i kortaktyny. Objaśnienia skrótów: Z – motyw zasadowy, P – powtórzenie kortaktynowe/HS1, H – kwasna α -helisa, BP – region bogaty w prolinę, SH3 – domena o homologii do Src. Obecność większej ilości powtórzeń P w kortaktynie zapewnia większe powinowactwo do filamentów aktynowych.

o budowie helisa-pętla-helisa, występujących w prokaryotycznych białkach regulatorowych. Prawdopodobnie także cała sekwencja powtórzeń tworzy strukturę typu helisa-pętla-helisa (Ryc. 1). Koniec karboksylowy HS1 zawiera motyw SH3 (ang. *Src-homology 3*) oraz kwasną α -helisę [6].

Badania nad myszami z uszkodzonym (ang. *knockout*) genem *Hcls1* (ang. *hematopoietic cell specific Lyn substrate 1*), kodującym białko HS1, wykazały, że brak HS1 nie powodował żadnych zmian w rozwoju limfocytów T i B. Jednak po związaniu się antygenów z receptorami BCR lub TCR zahamowana była proliferacja zarówno limfocytów T, jak i B oraz produkcja przeciwciał niezależna od limfocytów T. Dodatkowo wykryto, że limfocyty B pochodzące z jamy otrzewnowej tych myszy były odporne na indukcję apoptozy, wywołaną usieciowaniem za pomocą immunoglobulin rozpoznających receptory limfocytów B.

W 1997 roku Suzuki i wsp. szukali, za pomocą systemu dwuhybridowego, białek, które oddziaływałyby z białkiem HS1 człowieka. Odkryli oni, że HS1 wiąże się z jeszcze nigdy wcześniej niezidentyfikowanym białkiem, które nazwali HAX-1 (ang. *HS1-associated protein X-1*) [7]. Z biegiem lat w licznych niezależnych badaniach wykazano, że białko HAX-1 ma wiele innych partnerów białkowych (kortaktynę i policystynę-2 [8], $G_{\alpha_{13}}$ [9], Vpr [10], K15 [11], EBNA-LP [12], interleukinę-1 [13], HtrA2/Omi [14]) oraz że może oddziaływać z kwasami rybonukleinowymi (3' UTR w mRNA wimentyny [15]).

BIAŁKO HAX-1 A CYTOSZKIELET I PROCES MIGRACJI

Wykonując immunoprecypitację lizatów komórkowych, udowodniono, że oddziaływanie pomiędzy HS1 a HAX-1 zachodzi także *in vivo* [7]. Sprawdzając za pomocą systemu dwuhybridowego oddziaływanie pomiędzy HAX-1 a poszczególnymi fragmentami HS1, wykazano, że za tworzenie się kompleksu z HAX-1 odpowiedzialny jest fragment obejmujący reszty aminokwasowe od 27 do 66 włącznie, czyli fragment umiejscowiony na końcu aminowym, obejmujący początek motywu zasadowego. Fragment ten wykazuje ogromne podobieństwo (aż 75%) do kortaktyny/EMS1, białka występującego prawie we wszystkich tkankach, chociaż nie występuje w większości komórek hematopoetycznych.

Na homologii końca aminowego kortaktyny i HS1 podobieństwa się nie kończą: kortaktyna zawiera także powyżej

wspomniany powtarzający się motyw, tylko jest on znacznie dłuższy – zawiera aż 6 i pół powtórzeń – a na końcu karboksylowym znajduje się też domena SH3 (Ryc. 1). Kolejną cechą wspólną jest to, że kortaktyna stanowi substrat kinazy tyrozynowej Src, należącej do tej samej rodziny co kinazy fosforylujące HS1. W tej sytuacji nie dziwi fakt, że wykazano tworzenie kompleksów HAX-1 także z kortaktyną [8].

Mimo tak dużych podobieństw w budowie funkcje tych dwóch białek są odmienne. Kortaktyna, kodowana przez onkogen *EMS1*, ulega nadekspresji w komórkach płaskonabłonkowego raka głowy i szyi oraz w nowotworach sutka [16]. Białko to ma przede wszystkim związki z cytoszkieletem. Potrafi się łączyć zarówno z filamentami aktynowymi (za to oddziaływanie odpowiedzialne są wyżej wspomniane charakterystyczne powtórzenia sekwencji), jak i z kompleksem białkowym Arp2/3, biorącym udział w polimeryzacji nowych filamentów aktynowych [17]. Kortaktyna lokalizuje się przede wszystkim w cytosolu, skąd po aktywacji przez małe białko G, Rac1, przemieszcza się na obrzeża komórki [18]. Można ją odnaleźć w miejscach opłaszczonych przez klatrynę oraz związaną z filamentami aktynowymi, które dochodzą do tego obszaru. Kortaktyna tworzy także kompleks (poprzez domenę SH3) z dynaminą, dużą GTPazą, wraz z którą bierze udział w procesie endocytozy.

Uszkodzenie genu kodującego kortaktynę powoduje zahamowanie endocytozy zależnej od receptorów, lecz nie hamuje pinocytozy. Gdy hamowano endocytozę cytochalazyną (alkaloidem zapobiegającym polimeryzacji filamentów aktynowych), kortaktyna zniknęła z miejsc endocytozy, jednak dynamina pozostawała bez zmian. Oznacza to, że to dynamina pozyskuje kortaktynę podczas endocytozy w sposób zależny od aktyny. Dynamina bierze przede wszystkim udział w odłączaniu się pęcherzyków endocytarnych od błony komórkowej, a kortaktyna może być łącznikiem pomiędzy nią a cytoszkieletem [19,20].

Inną funkcją spełnianą przez kortaktynę w komórce jest jej udział w tworzeniu tzw. podosomów. Podosomy są to punktowe, istniejące w komórce przez krótki czas i bardzo dynamiczne, połączenia komórkowe, wiążące ją z macierzą pozakomórkową. Wykryto je przede wszystkim w komórkach mezenchymalnych oraz liniach komórkowych wyprowadzonych z osteoklastów i białaczek człowieka. Podosomy składają się z takich samych białek, co hemidesmosomy, które wiążą komórki z błoną podstawną, jednak w ich skład wchodzi także: żelolina, dynamina i kortaktyna. Tworzenie się podosomów uzależnione jest od fosforylującej kortaktynę kinazy Src, na co wskazuje fakt, że liczba podosomów w komórkach wzrastała pod wpływem nadekspresji tej kinazy. Oprócz tego wykryto, że nadekspresja genu kodującego kortaktynę w komórkach, w których normalnie jego ekspresja nie zachodziła (komórki linii pozyskanej ze śródbłonna pępowiny), powodowała wzrost ich migracji [21].

Kortaktyna jest zatem białkiem regulującym wiele procesów komórkowych związanych z cytoszkieletem. Fakt, że takie same białka mogą brać udział zarówno w procesach adhezji, jak i migracji, nie powinien dziwić, ponieważ

są to białka regulatorowe, kontrolujące proces przemieszczania się komórki. Proces ten jest sekwencją zdarzeń, polegającą na przywieraniu do podłoża uwypukleń komórki, przepływie cytoplazmy do tych wypustek, a na końcu – na odłączeniu od podłoża obszaru komórki, który znajduje się po stronie przeciwnej do wypustek. Nasuwa się zatem oczywisty wniosek, że białko HAX-1, oddziałując z kortaktyną, wpływa na wyżej wymienione zjawiska. Na potwierdzenie tej tezy można przytoczyć doniesienia, że HAX-1 wiąże się nie tylko z kortaktyną, ale i innymi białkami zaangażowanymi w proces migracji: policystyną-2 [8] i $G\alpha_{13}$ [9].

Policystyna-2 jest białkiem kodowanym przez gen *PKD2* (ang. *polycystic kidney disease 2*), zmutowanym u prawie wszystkich osób chorujących na torbielowate zwyrodnienie nerek. Policystyna-2 składa się z sześciu domen transbłonowych i zawiera na końcu karboksylowym motyw EF-hand, który wiąże wapń. Oprócz tego policystyna-2 wykazuje bardzo dużą homologię do podjednostki α , kanału wapniowego zależnego od potencjału błonowego, a jej koniec karboksylowy oddziałuje z TRPC1, kanałem wapniowym aktywowanym pod wpływem uwalniania wewnątrzkomórkowych zapasów Ca^{2+} [22]. Wszystko zatem wskazuje, że policystyna-2 może być białkiem kanałowym. Drugim genem, w którym znaleziono mutacje u chorych na torbielowatość, jest *PKD1*, kodujący policystynę-1, białko homologiczne do policystyny-2. Policystyna-1 jest prawdopodobnie białkiem błonowym, biorącym udział w oddziaływaniach międzykomórkowych i kontaktach pomiędzy komórką a macierzą pozakomórkową.

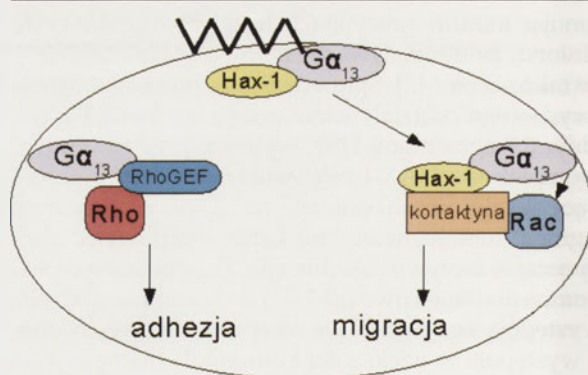
Wykryto, że policystyna-1 i -2 oddziałują pomiędzy sobą za pomocą końców karboksylowych, które skierowane są do środka komórki w stronę cytoplazmy. Oznacza to, że mogą one wchodzić w skład tego samego kompleksu błonowego lub mogą być częścią jakiegoś szlaku przekazywania sygnałów do komórki. Sama policystyna-2 także jest w stanie tworzyć homodimery, wiążąc się pomiędzy sobą za pomocą końców karboksylowych [23].

Kiedy z użyciem systemu dwuhybrydowego starano się dowiedzieć, jakie białka oddziałują z końcem aminowym policystyny-2, wykryto, że z pętlą znajdującą się pomiędzy piątą a szóstą domeną transbłonową wiąże HAX-1. Oddziaływanie to jest specyficzne, ponieważ nie wykryto oddziaływania pomiędzy HAX-1 a piątą pętlą białka kodowanego przez *PKD2L* (policystyna-L), które jest bardzo podobne do policystyny-2. Stwierdzono, że HAX-1 i policystyna-2 występują w komórkach razem w siateczce śródplazmatycznej, a w komórkach migrujących zauważono, że HAX-1 wraz z policystyną-2 ulegają przeniesieniu na obrzeża komórek, w tym do lamelipodiów. Dalsze badania wykazały, że w lamelipodiach HAX-1 kolokalizuje także z kortaktyną [8]. Jak już wspomniano wcześniej, rozmieszczenie kortaktyny na obrzeżach komórek uzależnione jest od aktywności małego białka wiążącego GTP, Rac1. Okazuje się, że aktywność policystyny-2 jest także uwarunkowana działalnością małych białek G: Cdc42, Rho i Rac1, które zaangażowane są w regulację, takich procesów jak: organizacja cytoszkieletu aktynowego, migracja, ukształtowanie komórki, adhezja i ustalenie polarności [24,18]. HAX-1 może zatem stanowić

element łączący policystynę-2 z cytoszkieletem aktynowym.

Innym dowodem pośrednim na zaangażowanie białka HAX-1 w regulację migracji komórek jest jego oddziaływanie z $G\alpha_{13}$, podjednostką α heterotrimerycznego białka wiążącego GTP (białko G) [9]. Białko G pośredniczy w wielu szlakach indukowanych przez receptory, a $G\alpha_{13}$ i $G\alpha_{12}$, należące do tej samej rodziny podjednostek α , uznaje się za kluczowe regulatory przekazywania sygnału, między innymi w szlakach prowadzących do aktywacji małego białka Rho, które kontroluje przebudowę cytoszkieletu i wzrost komórek [25]. Małe białko Rho zaangażowane jest także w tworzenie włókien naprężeniowych, będących wiązką filamentów aktynowych o kształcie igły, oraz tzw. kontaktów ogniskowych (ang. *focal adhesion sites*), tworzących się w miejscu przylegania komórki do podłoża kompleksów białkowych, od których odchodzą wiązki filamentów aktynowych [26]. Aktywność GTPazowa $G\alpha_{13}$ i $G\alpha_{12}$ stymulowana jest przez p115 RhoGEF (ang. *Rho guanine nucleotide exchange factor*), który odłącza GDP od GTPazy, pozwalając na przyłączenie się nowej cząsteczki GTP. Połączenie RhoGEF z $G\alpha_{13}$ umożliwia wymianę nukleotydów guaninowych na GTPazie Rho, a połączenie RhoGEF z $G\alpha_{12}$ hamuje aktywność małego białka Rho [27]. Inną ważną różnicą pomiędzy tymi dwiema podjednostkami jest także fakt, że $G\alpha_{13}$ stymuluje migrację komórek, a $G\alpha_{12}$ – jej nie stymuluje [28].

Wiązanie pomiędzy HAX-1 a $G\alpha_{13}$ jest wysoce specyficzne. Nie wykryto natomiast żadnych oddziaływań pomiędzy HAX-1 a $G\alpha_{12}$. Dodatkowo wykazano, że HAX-1, $G\alpha_{13}$, kortaktyna oraz małe białko Rac1 mogą wspólnie tworzyć duży kompleks [9]. Wiadomo, że migracja komórek wymaga, promowanego przez Rac1, tworzenia filamentów aktynowych przy wysuwającej się krawędzi komórki [29], a aktywacja małego białka Rho przez $G\alpha_{13}$ zostaje zniesiona przez HAX-1 [9]. Dlatego postuluje się istnienie mechanizmu, w którym zasadnicze znaczenie ma HAX-1, decydującego o tym, czy komórka migruje, czy ulega adhezji (Ryc. 2). Jeśli HAX-1 połączony byłby z $G\alpha_{13}$ dochodziłoby do utworzenia poczwórnego kompleksu z kortaktyną i Rac1, co prowadziłoby do zapoczątkowania polimeryzacji aktyny oraz przemieszczania się komórki. Odłączenie HAX-1 od $G\alpha_{13}$ powodowałoby aktywację małego białka Rho i stymulowałoby adhezję.



Rycina 2. Model regulacji migracji i adhezji przez białko HAX-1 (na podstawie [10]). Interakcja białka HAX-1 z $G\alpha_{13}$ prowadzi do utworzenia kompleksu z białkiem Rac i kortaktyną, co inicjuje migrację komórki, hamując jednocześnie drogę alternatywną, czyli wiązanie do $G\alpha_{13}$ białka Rho i stymulację adhezji.

WPŁYW HAX-1 NA ENDOCYTOZĘ

Jak wspomniano powyżej, wiążąca się z HAX-1 kortaktyna zaangażowana jest między innymi także w proces endocytozy. Okazuje się, że wpływ na ten proces może mieć również HAX-1. Ortiz i wsp. [30], szukając partnerów dla trzech białek typu ABC: MDR1, MDR2 i BSEP, znaleźli tylko jednego – właśnie HAX-1. Białka ABC (ang. *ATP-binding cassette*) są to zależne od ATP transportery, które zajmują się uwalnianiem poszczególnych składników żółci z hepatocytów do kanalików żółciowych w wątrobie. MDR1 można znaleźć nie tylko w hepatocytach, ale także m.in. w dużych ilościach w nadnerczach, w trochę mniejszych – w nerce oraz w płucach i innych tkankach [31]. Jest on składnikiem bariery krew – mózg, poza tym stwierdzono jego udział w transporcie leków. Transportując leki z powrotem do krwi, przyczynia się do powstawania lekooporności [32]. MDR2 zajmuje się transportem organicznych anionów [33], a BSEP – transportem sprzężonych kwasów żółciowych [34].

Bardzo istotną kwestią jest lokalizacja transporterów ABC w hepatocytach, gdyż muszą się one znajdować w błonie komórkowej po stronie, która nie przylega ani do podłoża, ani do innych komórek, tylko skierowanej do światła kanalika żółciowego. Badając lokalizację HAX-1 i BSEP w komórkach przylegających do podłoża, wykryto, że oba białka znajdowały się po apikalnej, odsłoniętej stronie komórki. Gdy wyciszono ekspresję *HAX-1*, okazało się, że pomimo iż nie ma ono wpływu ani na okres połowicznego zaniku ani na szybkość transkrypcji i translacji czy też transport BSEP do apikalnej błony komórkowej, to ilość BSEP w błonie wciąż wzrastała. Oznaczało to, że brak HAX-1 musiał hamować endocytozę, co potwierdzała obecność HAX-1 w pęcherzykach endocytarnych [30].

WIĄZANIE I TRANSPORT TRANSKRYPTÓW: ROLA HAX-1 W EKSPORCIE Z JĄDRA

W trzech niezależnych badaniach wykryto, że białko HAX-1 jest partnerem aż trzech białek wirusowych: EBNA-LP [12], K15 [11] i Vpr [10].

EBNA-LP (nazywane także EBNA5, ang. *Epstein-Barr virus nuclear antigen 5*) jest wirusowym białkiem jądrowym, zaangażowanym w proces unieśmiertelniania komórek zakażonych wirusem Epsteina – Barr (EBV), zakażający przede wszystkim komórki nabłonkowe oraz limfocyty B. Wraz z innym białkiem, EBNA2, pojawia się w komórce już na początku zakażenia wirusowego. Wykryto, że EBNA-LP, w zależności od fazy cyklu komórkowego, może być w różny sposób ufosforylowane na resztach seryny (prawdopodobnie przez kinazy p34^{cdc2} lub CKII). W późnej fazie G₁ jest hypofosforylowane, a w fazie G₂ – hyperfosforylowane [35]. Oprócz tego wiadomo, że białko to może oddziaływać z supresorami nowotworów, TP53 i RB1 (retinoblastoma), i w ten sposób wywołać wejście w cykl mitotyczny [36], co stanowi bardzo ważny etap w cyklu życiowym herpeswirusów, do których należą EBV.

W liniach komórkowych uzyskanych z limfoblastoidów (limfocyty transformowane EBV) EBNA-LP lokalizuje się przede wszystkim w przedziałach jądra komórkowego

zwanych ciałkami PML (ang. *PML bodies*; może ich być od 10 do 30 w jądrze), a w komórkach nietransformowanych – w nukleoplazmie. Hamowanie proteosomu powoduje przemieszczenie się EBNA-LP do jąderka [37]. Ciałkom PML przypisuje się rolę dosłownie we wszystkich najważniejszych procesach jądrowych: w transkrypcji, w naprawie DNA, obronie przed wirusami, w stresie, w regulacji cyklu komórkowego, proteolizie i apoptozie [38,39]. Białko EBNA-LP zwiększa aktywność transkrypcji genów wirusowych indukowaną przez EBNA2 [40], a z drugiej strony zmniejsza ekspresję genów kodowanych w genomie zakażonej komórki oraz niektórych genów wirusowych poprzez hamowanie poliadenylacji pre-mRNA, w wyniku czego nie dochodzi do eksportu mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy. Nie wiadomo dokładnie, jaki jest mechanizm hamowania poliadenylacji (być może EBNA-LP wiąże się z 3' UTR pre-mRNA lub z elementem kompleksu poliadenylacyjnego) ani jaki jest mechanizm wybiórczości. Wiadomo tylko, że na represję poliadenylacji nie wpływają introny, a to, które geny mają zahamowaną ekspresję, zależy od ich położenia na chromosomach [41].

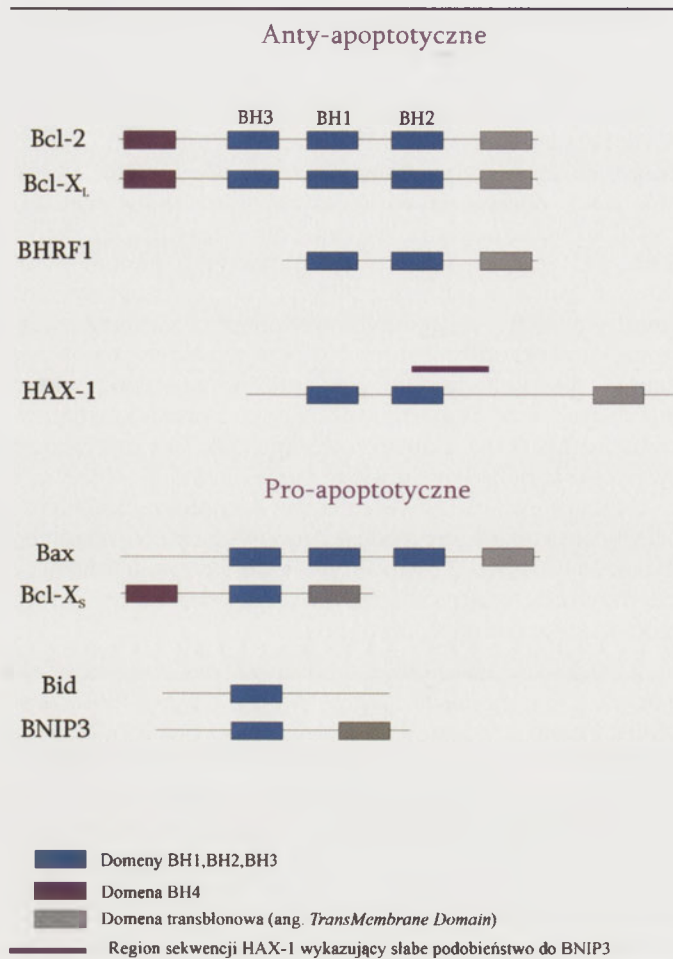
Z oddziaływania HAX-1 z EBNA-LP może zatem wynikać, że pełni ono jakąś funkcję związaną z metabolizmem RNA. Znane są badania wykazujące, że HAX-1 oddziałuje z 3' UTR mRNA wimentyny [15]. Wimentyna jest białkiem cytoszkieletu, składnikiem filamentów pośrednich w wielu komórkach. Kluczowa rola 3' UTR w lokalizacji mRNA w odpowiednim miejscu w komórce jest powszechnie znana [42]. Na 3'UTR transkryptu wimentyny znajduje się silna struktura spinki do włosów, wiążąca białko HAX-1. Równocześnie wiadomo, że 3'UTR transkryptu wimentyny ma znaczenie dla jego lokalizacji w komórce, zaś zaburzenia tej lokalizacji powodują zmiany w morfologii komórki i jej ruchliwości [43]. Istnieje więc uzasadnione przypuszczenie, że to HAX-1 jest odpowiedzialne za regulację transportu mRNA wimentyny. Zaangażowanie białka HAX-1 w regulację transportu mRNA wimentyny dodatkowo potwierdza związki tego białka z cytoszkieletem i procesem migracji.

Inną funkcją, wiążącą białko HAX-1 z jądrem komórkowym, jest import białek z cytoplazmy do jądra. Znanych jest kilka białek wiążących HAX-1, które pod wpływem odpowiedniego bodźca ulegają przemieszczeniu do jądra komórkowego (HS1, prohibityna 2, pre-interleukina-1 α). W przypadku pre-interleukiny-1 α (pre-IL-1 α) okazało się, że HAX-1 ma bardzo istotny wpływ na to przemieszczanie, gdyż jego wyciszenie powoduje zahamowanie transportu pre-IL-1 α do jądra [44]. Sugerowałoby to wahadłowe krążenie białka HAX-1 pomiędzy jądrem a cytoplazmą, związane z transportem różnego typu cząsteczek.

REGULACJA APOPTOZY PRZEZ HAX-1

Odpowiedź na pytanie, czy HAX-1 ma wpływ na proces apoptozy, kryje się chyba już w samej budowie białka HAX-1 (Ryc. 3).

Analiza sekwencji białka HAX-1 wykazała, że zawiera ono fragment o niewielkiej homologii do proapoptotycznego białka BNIP3 (wcześniej nazywane Nip3) z rodziny Bcl-2 [7]. Dalsze podobieństwa do tej rodziny białkowej,



Rycina 3. Porównanie schematu budowy białka HAX-1 z wybranymi białkami z rodziny Bcl-2; zaznaczono obecność domen BH oraz domeny wewnątrzblonowej (TMD). Białka Bid i BNIP3 należą do grupy pro-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 posiadających tylko jedną domenę BH – domenę BH3 (tzw. „BH3 only”). W białku HAX-1 znajduje się region o słabym podobieństwie do białka BNIP3. Obecność dwóch domen BH jest nietypowa dla większości białek z rodziny Bcl-2; stwierdzono ją tylko dla białek pochodzenia wirusowego (BHRF1). Pozostałe białka przedstawione na rycinie są białkami występującymi u ssaków.

to obecność w białku HAX-1 dwóch domen BH (ang. *Bcl-2 homology*): BH1 i BH2, czyli domen homologicznych do występujących w białkach z rodziny Bcl-2 [8]. Białko Bcl-2 zostało zidentyfikowane w 1984 roku. Jego nazwa wywodzi się z odkrycia, że region chromosomu 18, kodujący Bcl-2, może ulec translokacji na chromosom 14 (wraz z *c-myc* zlokalizowanym na chromosomie 8), dostając się pod silny wpływ enhancera allelu, kodującego łańcuch ciężki przeciwciała, w wyniku czego może dojść do rozwoju białaczki komórek B (ang. *B cell leukemia-2*) [45]. Rodzina Bcl-2 składa się z białek w różny sposób zaangażowanych w proces apoptozy, co stało się podstawą do ich podziału na trzy klasy (Ryc. 3):

1. antyapoptotyczne białka wielodomenowe składające się z czterech domen homologii Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 i BH4), do których należą: Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 i A1;
2. proapoptotyczne białka wielodomenowe mające trzy domeny homologii Bcl-2 (BH1, BH2 i BH3), takie jak: Bak, Bax i Bok;

3. proapoptotyczne białka mające tylko domenę BH3 (BH3-only), takie jak: Bim, Bad, Bid, Bik, Bmf, Puma, Noxa i Hrk (BNIP3 także zawiera tylko domenę BH3).

Główną rolę w procesach apoptotycznych odgrywają przede wszystkim proapoptotyczne białka wielodomenowe, odpowiedzialne za indukcję apoptozy na drodze aktywacji szlaku mitochondrialnego, prowadzącego do wywołania przepuszczalności błon mitochondrialnych i uwolnienia z przestrzeni międzybłonowej proapoptotycznych białek, takich jak: cytochrom c, HtrA2/Omi, AIF, endonukleaza G i Smac/DIABLO [46]. Białka antyapoptotyczne oraz białka zawierające tylko domenę BH3 spełniają przede wszystkim funkcje regulacyjne. Białka antyapoptotyczne są inhibitorami wielodomenowych białek proapoptotycznych, a białka zawierające tylko domenę BH3 mogą być inhibitorami białek antyapoptotycznych (Noxa, Bad, Puma, Hrk, Bmf, Bim) lub/ oraz aktywatorami białek wielodomenowych proapoptotycznych (tBid, Bim, Puma) [47].

Zauważono, że obraz mitochondriów, z których uwalniane są składniki proapoptotyczne, może być zupełnie różny: albo mitochondria są napęczniałe i mają rozszerzoną zewnętrzną błonę mitochondrialną, albo wyglądają na niezmienione. Dlatego powstały aż cztery niewykluczające się hipotezy dotyczące tego, w jaki sposób białka wielodomenowe są w stanie wywołać przepuszczalność błon mitochondrialnych. Najstarszą z nich jest hipoteza związana z istnieniem tzw. megakanalu mitochondrialnego (PTP, ang. *permeability transition pore*). W skład tego kanału wchodzi między innymi: VDAC (kanał anionowy zależny od potencjału błony), znajdujący się w zewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz, połączona z nim, translokaza nukleotydów adeninowych (ANT), zlokalizowana w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Oba te białka tworzą trzon megakanalu mitochondrialnego, łączącego macierz mitochondrialną z cytoplazmą. W skład megakanalu mitochondrialnego może wchodzić także Bax, które stymuluje jego otwarcie. Wielkość poru jest wystarczająco duża, by wypuścić cytochrom c z mitochondriów (zwłaszcza, że cytochrom c występuje także w macierzy mitochondrialnej), jednak nie tłumaczy to uwalniania pozostałych większych cząstek proapoptotycznych z przestrzeni międzybłonowej. Dlatego uważa się, że otwarcie megakanalu mitochondrialnego prowadzi do napływu do macierzy wody i cząsteczek rozpuszczonych, a w efekcie do napęcznienia mitochondriów i rozerwania zewnętrznej błony mitochondrialnej [48].

Druga hipoteza, tłumacząca uwalnianie cząstek proapoptotycznych z przestrzeni międzybłonowej, sugeruje tworzenie kanałów przez Bak lub Bax. Zauważono, że sam Bax po aktywacji, polegającej na odsłonięciu końca aminowego i karboksylowego przez tBid oraz inny nieznany czynnik, wbudowuje się w zewnętrzną błonę mitochondrialną i może tam tworzyć oligomery [49]. Bak, zawsze zlokalizowany w błonie, jest także w stanie oligomeryzować. Wyliczono, że do utworzenia kanału przez Bax/Bak, zdolnego uwolnić cytochrom c, potrzebne są tylko cztery cząsteczki [50]. Za tworzenie się kanałów odpowiedzialne są domeny BH1 i BH2, czyli te, które posiada także HAX-1; co więcej,

wykazano, że HAX-1 jest w stanie tworzyć homodimery *in vivo* [14].

Większość kanałów tworzonych przez białka z rodziny Bcl-2 powstaje w niefizjologicznym, zbyt kwaśnym pH i ma za małą średnicę, by uwolnić inne cząsteczki. Dlatego postuluje się, że w skład takiego kanału, nazwanego MAC (ang. *mitochondria apoptosis induced channel* – mitochondrialny kanał indukowany przez apoptozę), muszą wchodzić także inne białka [51].

Autorzy kolejnej hipotezy sugerują, że Bax powoduje tzw. stresowe odgięcie zewnętrznej błony mitochondrialnej, w wyniku czego dochodzi do jej połączenia z wewnętrzną błoną mitochondrialną i powstania poru lipidowego [52].

Ostania z hipotez mówi, że białka z rodziny Bcl-2 zaangażowane są w regulację przepływu wapnia z siateczki śródplazmatycznej, np. Bcl-2 może zmniejszać pulę wapnia uwalnianą z siateczki śródplazmatycznej. Uwolnienie wapnia z siateczki śródplazmatycznej może spowodować przedładowanie mitochondriów jonami wapnia, a efektem tego jest napęcznienie mitochondriów i rozerwanie zewnętrznej błony mitochondrialnej [53].

W związku z podobieństwem HAX-1 do białek z rodziny Bcl-2 postanowiono sprawdzić, jaki efekt HAX-1 wywiera na apoptozę [11]. W komórkach linii HeLa wywoływano apoptozę poprzez nadekspresję proapoptotycznego białka Bax. Jednoczesna transfekcja Bax i HAX-1 powodowała zwiększenie się liczby żywych komórek, co wskazuje, że HAX-1 jest białkiem antyapoptotycznym. Okazało się również, że białko HAX-1 hamuje wywoływaną przez Bax apoptozę w większym stopniu niż antyapoptotyczne białko Bcl-X_L, które stanowiło w tym doświadczeniu kontrolę pozytywną. HAX-1 jest także w stanie zahamować apoptozę indukowaną przez białko wirusa HIV typu 1 Vpr [10], lokalizujące się w mitochondrium i wywołujące przepuszczalność błon mitochondrialnych poprzez oddziaływanie z wyżej wspomnianym megakanałem mitochondrialnym [54].

Antyapoptotyczne działanie HAX-1 może tłumaczyć, dlaczego wykryto jego nadekspresję w keratynocytach u chorych na łuszczycę, zaburzeniu polegającym na zbyt szybkim procesie dojrzewania naskórka [55]. W chorobie tej, poza hiperproliferacją komórek, stwierdzono zaburzenia w ich apoptozie. Inną chorobą, najprawdopodobniej związaną z HAX-1, jest choroba Kostmanna (ang. *Kostmann disease, severe congenital neutropenia*). U chorych cierpiących

na jej recesywną autosomalną odmianę wykryto homozygotyczną mutację (insercja wprowadzająca wcześniejszy kodon STOP) w genie *HAX-1* [56]. Objawem tej choroby jest niedobór dojrzałych neutrofilów we krwi i szpiku kostnym, spowodowany nasileniem zachodzenia apoptozy w tych komórkach (wprowadzenie do neutrofilów pobranych od chorych prawidłowej kopii genu *HAX-1* zmniejszało częstość zachodzenia apoptozy).

Nie wiadomo, jaki jest mechanizm hamowania apoptozy przez HAX-1. Jest on jednak prawdopodobnie związany z mitochondriami, zauważono bowiem, że kiedy na komórki działano związkiem wywołującym uszkodzenia DNA, cisplatyną – tworzącą krzyżowe wiązania między sąsiadującymi nićmi DNA oraz w obrębie tej samej nici – nadekspresja HAX-1 hamowała utratę potencjału transmembranowego mitochondriów [14]. Fakt, że HAX-1 może wiązać się z białkiem Bcl-2 za pomocą swojej domeny BH2 [57], niestety, niewiele wyjaśnia, ponieważ białka antyapoptotyczne z rodziny Bcl-2 zazwyczaj wiążą się z domeną BH3 białek proapoptotycznych, zarówno zawierających jedynie domenę BH3 [58], jak i wielodomenowych [59]. Ponadto okazuje się, że jeśli do komórek wprowadzi się wektor ekspresyjny kodujący tylko koniec aminowy białka HAX-1, również dochodzi do indukcji apoptozy [10]. Być może jest to spowodowane faktem istnienia w tym białku jedynie domen BH1 i BH2, zdolnych do tworzenia kanałów w błonie mitochondrialnej.

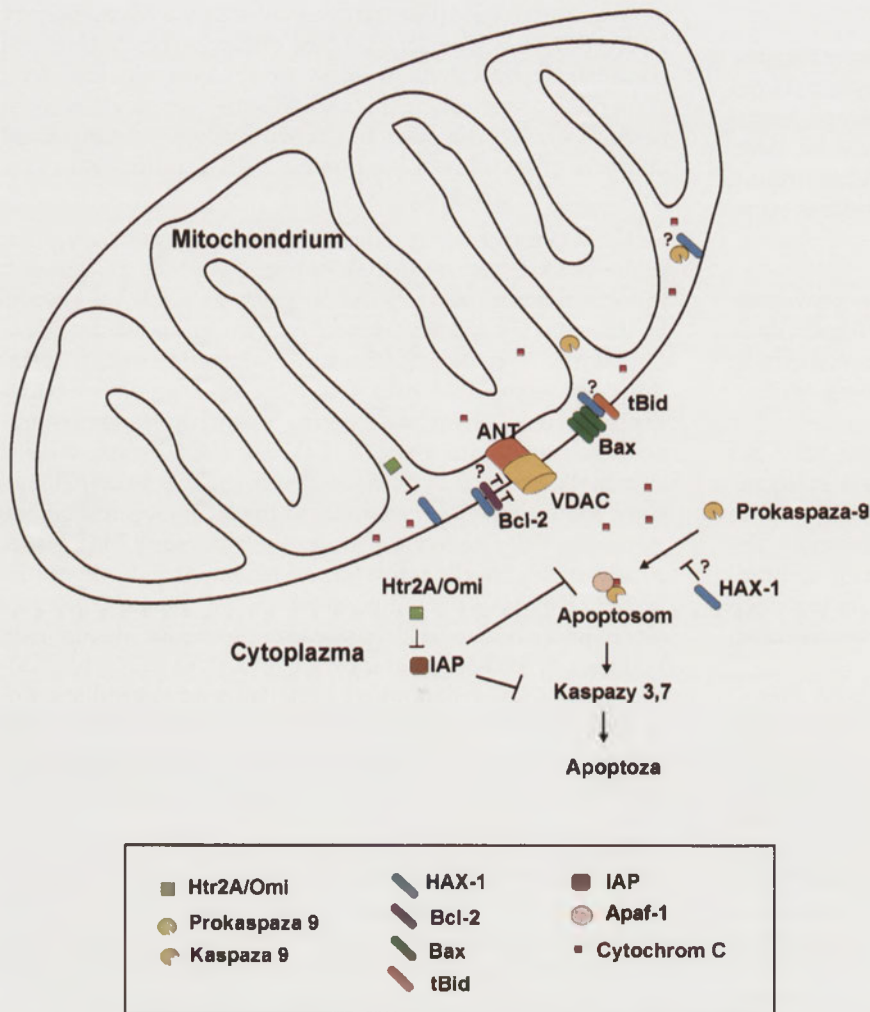
Nasuwa się także pytanie, czy poprzednio wykazane powiązania HAX-1 z cytoszkieletem mają jakiś związek z ich funkcją antyapoptotyczną. Pewne dane wskazują na to, że jest to możliwe. Z elementami cytoszkieletu związane są również antyapoptotyczne białka z rodziny z Bcl-2, Bmf i Bim, należące do klasy zawierającej jedynie domenę BH3. Bmf związany jest z kompleksem motorycznym miozyny V [60], a Bim – z łańcuchem lekkim dyneiny [61]. Oba te białka biorą udział w procesie zwanym anoikis, czyli apoptozie spowodowanej brakiem adhezji komórek. Zaburzenia w cytoszkielecie mogą być czynnikiem uwalniającym te dwa białka i wywołującym na tej drodze apoptozę. HAX-1 mógłby być w podobny sposób uwalniany od cytoszkieletu, zwłaszcza że wiadomo, iż kortaktyna (a także białko HSI) jest specyficznie degradowana przez kaspazy (proteazy cysteinowo-asparaginianowe) – główne egzekutory apoptozy [62].

Nadekspresja HAX-1 w komórkach może zahamować apoptozę, jednak jeśli już dojdzie do indukcji apoptozy,

to endogenne białko HAX-1 ulega specyficznej degradacji w mitochondriach. Proteazą przeprowadzającą tę reakcję jest HtrA2/Omi [14] – mitochondrialna proteaza serynowa, która, w wyniku wywołanej apoptozą, przepuszczalności błon mitochondrialnych, przemieszcza się do

Tabela 1. Dotychczasowa wykryta lokalizacja HAX-1 w komórce.

Lokalizacja HAX-1	Linie komórkowe
mitochondria, błona jądrowa i siateczka śródplazmatyczna [8]	Cos-7, komórki limfoblastoidalne Daudiego
siateczka śródplazmatyczna i lamellipodia [9]	HeLa
cytoplazma (wraz z białkiem wirusowym EBNA-LP) [13]	Cos-7
siateczka śródplazmatyczna i mitochondria [12]	HeLa
błona apikalna (związana z transporterami ABC) [33]	MDCKII
mitochondria [15]	HEK293
mitochondria i okolice jądra [11]	HeLa
jądra komórkowe [64]	fibroblasty z komórek otrzymanych od chorych na twardzinę układową



Rycina 4. Potencjalny udział białka HAX-1 w apoptozie. HAX-1 jest substratem dla proteazy Htr2A/Omi, która w normalnych warunkach znajduje się w mitochondrium i nie ma aktywności proteolitycznej. Podczas indukcji apoptozy dochodzi do trawienia białka HAX-1 przez Htr2A/Omi, która następnie przechodzi do cytoplazmy, gdzie trawi inhibitory kaspaz (białka IAP). Apoptoza jest inicjowana dzięki otwieraniu się kanałów w błonach mitochondrialnych – megakanalu mitochondrialnego złożonego z kanału w błonie wewnętrznej (ANT, ang. *adenine nucleotide translocase*, translokaza adeniny) i kanału w błonie zewnętrznej (VDAC, ang. *voltage dependent anion channel*), a także kanałów w błonie zewnętrznej, tworzonych przez oligomery białka Bax. Białka z rodziny Bcl-2 mają kluczowe znaczenie dla tworzenia się i przepustowości kanałów mitochondrialnych. Ze względu na swoją budowę (obecność domen BH) białko HAX-1 ma potencjalną możliwość wiązania się z białkami z rodziny Bcl-2 i wpływania na apoptozę. Ma ono także zdolność specyficznego wiązania się do kaspazy 9 i hamowania jej aktywności – być może zapobiega to tworzeniu się apoptosomu.

cytoplazmy i tam wiąże z białkiem hamującym apoptozę (IAP), degradując je, a to z kolei prowadzi do aktywacji kaspaz [63]. Proteoliza białka HAX-1 może być czynnikiem niezbędnym do indukcji apoptozy: w komórkach pewnej linii komórkowej, która nie posiada aktywnej formy HtrA2/Omi można było wywołać apoptozę, działając różnymi czynnikami, tylko pod warunkiem transfekcji komórek prawidłową HtrA2/Omi. Zauważono, że i HAX-1, i HtrA2/Omi znajdują się w normalnych warunkach w mitochondriach, musi więc istnieć jakiś mechanizm regulacji HtrA2/Omi zapobiegający trawieniu HAX-1 przy braku apoptozy. Być może odpowiedzialne za to są jakieś białka wiążące się z HtrA2/Omi [14].

Innym niedawno wykrytym partnerem i regulatorem HAX-1 jest prohibityna 2 [64], białko mitochondrialne ulegające przemieszczeniu do jądra pod wpływem przyłą-

czenia receptora estrogenu. Wyciszenie prohibityny 2 spowodowało spadek ilości HAX-1 w komórce, co doprowadziło do indukcji apoptozy. Bardzo znaczący jest także fakt, że prohibityna 2 może się wiązać z VDAC i ANT, dwoma składnikami wcześniej wspomnianego megakanalu mitochondrialnego, który najprawdopodobniej także bierze udział w procesie programowanej śmierci komórki.

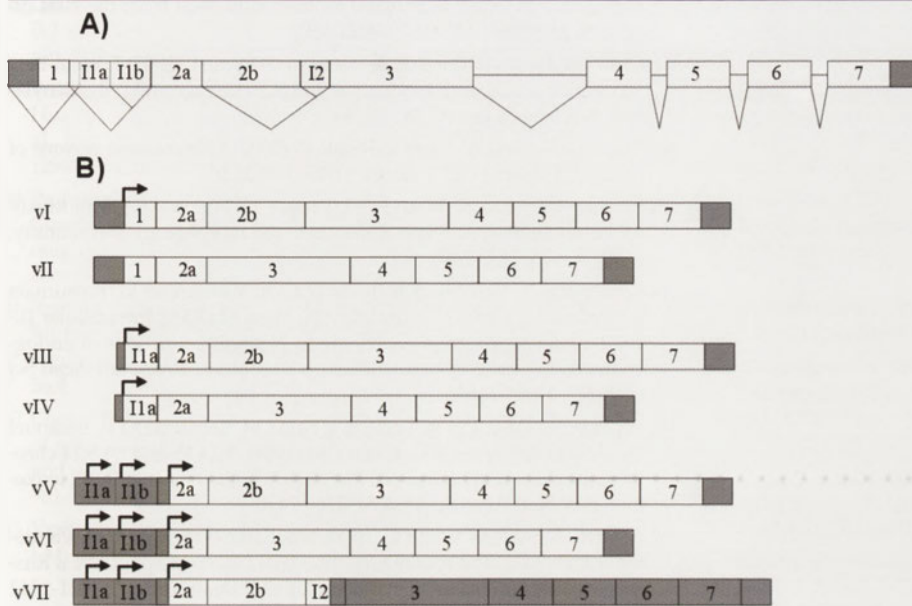
Nowe światło na zagadnienie funkcji białka HAX-1 w apoptozie rzuciła praca wykazująca oddziaływanie białka HAX-1 człowieka z kaspazą-9, białkiem odpowiedzialnym za inicjację apoptozy na drodze mitochondrialnej [65]. W pracy tej udowodniono oddziaływanie obu białek i zidentyfikowano domenę w białku HAX-1 odpowiedzialną za to wiązanie (reszty aminokwasowe od 175 do 206). Wykazano także hamowanie kaspazy-9 i zahamowanie apoptozy w obecności nadmiaru białka HAX-1 zarówno w komórkach, jak i w układzie *in vitro*. Mechanizm tego hamowania nie jest jeszcze znany, ale przypuszcza się, że HAX-1 może mieć wpływ na formowanie się apoptosomu. Doniesienia te potwierdzają znaczenie białka HAX-1 dla apoptozy (Ryc. 4).

LOKALIZACJA BIAŁKA HAX-1 W KOMÓRCIE

W ciągu ostatnich 9 lat, po tym, jak wykryto białko HAX-1, wiele niezależnych zespołów badało lokalizację tego białka w komórce. Jak przedstawiono w tabeli 1, wyniki te były bardzo różne, a próba wyciągnięcia wniosków dotyczących tego, jakie czynniki decydują o lokalizacji białka HAX-1 w komórce, na obecnym etapie może sprawiać trudność, gdyż wiele potencjalnych możliwości nie zostało sprawdzonych (np. tkankowa specyficzność, działanie stresu, faza cyklu komórkowego, sygnały zewnątrzkomórkowe, stopień fosforylacji).

ALTERNATYWNE SKŁADANIE GENU HAX-1 W KOMÓRKACH SZCZURA

Wielofunkcyjność białka HAX-1 byłaby łatwiejsza do wyjaśnienia, gdyby istniało wiele jego izoform. Wykazano, że Hax-1 szczura, homologiczny do białka człowieka i myszy, kodowany jest przez aż siedem różnych, alternatywnych wariantów mRNA (Ryc. 5) [66]. Warianty te kodują siedem potencjalnych izoform białkowych, różniących się sekwencją w domenie N-końcowej, obecnością domen BH i przewidywaną wielkością domeny PEST (domeny bogatej w prolinę, glutaminian, serynę i treoninę, odpowiedzialnej za szybką degradację białek [67]). Potencjalna izoforma VII



Rycina 5. Alternatywne warianty mRNA *Hax-1* szczura. A) Sekwencja genomowa. Schemat składania mRNA. B) Warianty transkryptów. Otwarte ramki odczytu zostały zaznaczone kolorem białym. Warianty V, VI i VII posiadają dodatkowo dwie krótkie ramki odczytu przed sekwencją kodującą dane izoformy białka HAX-1.

kodowana przez wariant z nieusuniętym intronem, wprowadzającym wcześniejszy kodon STOP, jest znacznie skrócona i nie zawiera domeny transbłonowej – przypomina zatem zmutowany fragment HAX-1 wywołujący indukcję apoptozy [11]. Różnice w budowie końca aminowego białka mogą powodować różnice w lokalizacji izoform w komórce, tym bardziej, że niektóre potencjalne izoformy mają sygnały lokalizacyjne, np. izoformy I i II – presekwencję mitochondrialną, a izoformy III i IV – sygnał lokalizacji jądrowej (NLS), zwany pat7, obejmujący reszty aminokwasowe od pozycji 6 do 12 włącznie: PERRKQW. Różna lokalizacja w komórce może być jedną z przyczyn wielofunkcyjności.

UWAGI KOŃCOWE

Zaangażowanie białka HAX-1 w procesy apoptozy, endocytozy i adhezji/migracji, wiązanie transkryptów oraz potencjalny wpływ na transport mRNA sugerują, że ma ono istotne znaczenie regulatorowe. Działanie antyapoptotyczne oraz stymulujący wpływ na migrację sugerują, że białko HAX-1 może brać udział w procesie nowotworzenia i tworzeniu przerzutów. Wyniki wskazujące na nadekspresję białka HAX-1 w niektórych nowotworach wydają się to potwierdzać [68]. Dokładna analiza danych klinicznych i dalsze badania zmierzające do ustalenia funkcji białka HAX-1 (a także funkcji poszczególnych izoform tego białka) pozwolą na wyjaśnienie, czy HAX-1 ma istotne znaczenie dla choroby nowotworowej.

PIŚMIENNICTWO

- Lydyard PM, Whelan A, Fanger MW (2005) Krótkie wykłady. Immunologia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- Yamanashi Y, Okada M, Semba T, Yamori T, Umemori H, Tsunasawa S, Toyoshima K, Kitamura D, Watanabe T, Yamamoto T (1993) Identification of HS1 protein as a major substrate of protein-tyrosine kinase(s) upon B-cell antigen receptor-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3631-3635

- Taniuchi I, Kitamura D, Maekawa Y, Fukuda T, Kishi H, Watanabe T (1995) Antigen-receptor induced clonal expansion and deletion of lymphocytes are impaired in mice lacking HS1 protein, a substrate of the antigen-receptor-coupled tyrosine kinases. *EMBO J* 14: 3664-3678
- Yamanashi Y, Fukuda T, Nishizumi H, Inazu T, Higashi K, Kitamura D, Ishida T, Yamamura H, Watanabe T, Yamamoto T (1997) Role of tyrosine phosphorylation of HS1 in B cell antigen receptor-mediated apoptosis. *J Exp Med* 185: 1387-1392
- Ruzzene M, Brunati AM, Sarno S, Marin O, Donella-Deana A, Pinna LA (2000) Ser/Thr phosphorylation of hematopoietic specific protein 1 (HS1). Implication of protein kinase CK2. *Eur J Biochem/FEBS* 267: 3065-3072
- Kitamura D, Kaneko H, Miyagoe Y, Ariyasu T, Watanabe T (1989) Isolation and characterization of a novel human gene expressed specifically in the cells of hematopoietic lineage. *Nucl Acids Res* 17: 9367-9379
- Suzuki Y, Demoliere C, Kitamura D, Takeshita H, Deuschle U, Watanabe T (1997) HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HS1, a substrate of Src family tyrosine kinase. *J Immunol* 158: 2736-2744
- Gallagher AR, Cedzich A, Gretz N, Somlo S, Witzgall R (2000) The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4017-4022
- Radhika V, Onesime D, Ha JH, Dhanasekaran N (2004) Galpha13 stimulates cell migration through cortactin-interacting protein Hax-1. *J Biol Chem* 279: 49406-49413
- Yedavalli VS, Shih HM, Chiang YP, Lu CY, Chang LY, Chen MY, Chuang CY, Dayton AI, Jeang KT, Huang LM (2005) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with antiapoptotic mitochondrial protein HAX-1. *J Virol* 79: 13735-13746
- Sharp TV, Wang HW, Koumi A, Hollyman D, Endo Y, Ye H, Du MQ, Boshoff C (2002) K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is latently expressed and binds to HAX-1, a protein with antiapoptotic function. *J Virol* 76: 802-816
- Kawaguchi Y, Nakajima K, Igarashi M, Morita T, Tanaka M, Suzuki M, Yokoyama A, Matsuda G, Kato K, Kanamori M, Hirai K (2000) Interaction of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein (EBNA-LP) with HS1-associated protein X-1: implication of cytoplasmic function of EBNA-LP. *J Virol* 74: 10104-10111
- Yin H, Morioka H, Towle CA, Vidal M, Watanabe T, Weissbach L (2001) Evidence that HAX-1 is an interleukin-1 alpha N-terminal binding protein. *Cytokine* 15: 122-137
- Cilenti L, Kyriazis GA, Soundarapandian MM, Stratico V, Yerkes A, Park KM, Sheridan AM, Alnemri ES, Bonventre JV, Zervos AS (2005) Omi/HtrA2 protease mediates cisplatin-induced cell death in renal cells. *Am J Physiol Ren Physiol* 288: F371-379
- Al-Maghrebi M, Brule H, Padkina M, Allen C, Holmes WM, Zehner ZE (2002) The 3' untranslated region of human vimentin mRNA interacts with protein complexes containing eEF-1gamma and HAX-1. *Nucl Acids Res* 30: 5017-5028
- Schuuring E, Verhoeven E, Mooi WJ, Michalides RJ (1992) Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. *Oncogene* 7: 355-361
- Uruno T, Liu J, Zhang P, Fan YX, Egile C, Li R, Mueller SC, Zhan X (2001) Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol* 3: 259-266
- Weed SA, Du Y, Parsons JT (1998) Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. *J Cell Sci* 111: 2433-2443

19. Chen L, Wang ZW, Zhu JW, Zhan X (2006) Roles of cortactin, an actin polymerization mediator, in cell endocytosis. *Acta Biochim Biophys Sinica* (Shanghai) 38: 95-103
20. Cao H, Orth JD, Chen J, Weller SG, Heuser JE, McNiven MA (2003) Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol* 23: 2162-2170
21. Lynch DK, Winata SC, Lyons RJ, Hughes WE, Lehrbach GM, Wasinger V, Corthals G, Cordwell S, Daly RJ (2003) A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 278: 21805-21813
22. Huang C, Liu J, Haudenschild CC, Zhan X (1998) The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *J Biol Chem* 273: 25770-25776
23. Tsiokas L, Kim E, Arnould T, Sukhatme VP, Walz G (1997) Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6965-6970
24. Arnould T, Sellin L, Benzing T, Tsiokas L, Cohen HT, Kim E, Walz G (1999) Cellular activation triggered by the autosomal dominant polycystic kidney disease gene product PKD2. *Mol Cell Biol* 19: 3423-3434
25. Kurose H (2003) Galpha12 and Galpha13 as key regulatory mediator in signal transduction. *Life Sci* 74: 155-161
26. Buhl AM, Johnson NL, Dhanasekaran N, Johnson GL (1995) G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J Biol Chem* 270: 24631-24634
27. Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer WD, Gilman AG, Sternweis PC, Bollag G (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science* 280: 2112-2114
28. Gu JL, Müller S, Mancino V, Offermanns S, Simon MI (2002) Interaction of G alpha(12) with G alpha(13) and G alpha(q) signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9352-9357
29. Bourne HR (2005) Rac and cell migration: CDM proteins integrate signals. *Nat Cell Biol* 7: 777-778
30. Ortiz DF, Moseley J, Calderon G, Swift AL, Li S, Arias IM (2004) Identification of HAX-1 as a protein that binds bile salt export protein and regulates its abundance in the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 279: 32761-32770
31. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I (1987) Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 265-269
32. Shen DW, Fojo A, Chin JE, Roninson IB, Richert N, Pastan I, Gottesman MM (1986) Human multidrug-resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification. *Science* 232: 643-645
33. Keppler D, König J (1997) Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. *FASEB J* 11: 509-516
34. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ (1998) The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273: 10046-10050
35. Kitay MK, Rowe DT (1996) Cell cycle stage-specific phosphorylation of the Epstein-Barr virus immortalization protein EBNA-LP. *J Virol* 70: 7885-7893
36. Szekely L, Selivanova G, Magnusson KP, Klein G, Wiman KG (1993) EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5455-5459
37. Pokrovskaja K, Mattsson K, Kashuba E, Klein G, Szekely L (2001) Proteasome inhibitor induces nucleolar translocation of Epstein-Barr virus-encoded EBNA-5. *J Gen Virol* 82: 345-358
38. Takahashi Y, Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, de Thé H (2004) PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene* 23: 2819-2824
39. Dellaire G, Bazett-Jones DP (2005) PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* 26: 963-977
40. Peng R, Moses SC, Tan J, Kremmer E, Ling PD (2005) The Epstein-Barr virus EBNA-LP protein preferentially coactivates EBNA2-mediated stimulation of latent membrane proteins expressed from the viral divergent promoter. *J Virol* 79: 4492-4505
41. Dufva M, Flodin J, Nerstedt A, Ruetschi U, Rymo L (2002) Epstein-Barr virus nuclear antigen 5 inhibits pre-mRNA cleavage and polyadenylation. *Nucl Acids Res* 30: 2131-2143
42. Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 3: reviews 0004.1-0004.10
43. Morris EJ, Evason K, Wiand C, L'Ecuyer TJ, Fulton AB (2000) Misdirected vimentin messenger RNA alters cell morphology and motility. *J Cell Sci* 113: 2433-2443
44. Kawaguchi Y, Nishimagi E, Tochimoto A, Kawamoto M, Katsumata Y, Soejima M, Kanno, T, Kamatani N, Hara M (2006) Intracellular IL-1alpha-binding proteins contribute to biological functions of endogenous IL-1alpha in systemic sclerosis fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14501-14506
45. Pegoraro L, Palumbo A, Erikson J, Falda M, Giovanazzo B, Emanuel BS, Rovera G, Nowell PC, Croce CM (1984) A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 7166-7170
46. van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandebroeck P (2002) The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 9: 1031-1042
47. Lucken-Ardjomande S, Martinou JC (2005) Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. *Compt Rendus Biol* 328: 616-631
48. Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachy-Dyson E, Di Lisa F, Forte MA (2006) The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J* 273: 2077-2099
49. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20: 929-935
50. Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH (2000) BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* 2: 553-555
51. Pavlov EV, Priault M, Pietkiewicz D, Cheng EH, Antonsson B, Manon S, Korsmeyer SJ, Mannella CA, Kinnally KW (2001) A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol* 155: 725-731
52. Terrones O, Antonsson B, Yamaguchi H, Wang HG, Liu J, Lee RM, Herrmann A, Basanez G (2004) Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. *J Biol Chem* 279: 30081-30091
53. Annis MG, Yethon JA, Leber B, Andrews DW (2004) There is more to life and death than mitochondria: Bcl-2 proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1644: 115-123
54. Jacotot E, Ravagnan L, Loeffler M, Ferri KF, Vieira HL, Zamzami N, Costantini P, Druillennec S, Hoebeke J, Briand JP, Irinopoulou T, Daugas E, Susin SA, Coite D, Xie ZH, Reed JC, Roques BP, Kroemer G (2000) The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med* 191: 33-46
55. Mirmohammadsadegh A, Tartler U, Michel G, Baer A, Walz M, Wolf R, Ruzicka T, Hengge UR (2003) HAX-1, identified by differential display reverse transcription polymerase chain reaction, is overexpressed in lesional psoriasis. *J Invest Derm* 120: 1045-1051
56. Klein C, Grudzien M, Appaswamy G, Germeshausen M, Sandrock I, Schaffer AA, Rathinam C, Boztug K, Schwitzer B, Rezaei N, Bohn G, Melin M, Carlsson G, Fadeel B, Dahl N, Palmblad J, Henter JI, Zeidler C, Grimbacher B, Welte K (2007) HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nat Genet* 39: 86-92
57. Matsuda G, Nakajima K, Kawaguchi Y, Yamanashi Y, Hirai K (2003) Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen leader protein (EBNA-LP) forms complexes with a cellular anti-apoptosis protein Bcl-2 or its EBV counterpart BHRF1 through H51-associated protein X-1. *Microbiol Immunol* 47: 91-99

58. Liu X, Dai S, Zhu Y, Marrack P, Kappler JW. (2003) The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunology* 19: 341-352
59. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC (2005) Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 19: 1294-1305
60. Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A (2001) Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293: 1829-1832
61. Reginato MJ, Mills KR, Paulus JK, Lynch DK, Sgroi DC, Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS (2003) Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol* 5: 733-740
62. Chen YR, Kori R, John B, Tan TH (2001) Caspase-mediated cleavage of actin-binding and SH3-domain-containing proteins cortactin, HS1, and HIP-55 during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 981-989
63. Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2002) HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277: 445-454
64. Kasashima K, Ohta E, Kagawa Y, Endo H (2006) Mitochondrial functions and estrogen receptor-dependent nuclear translocation of pleiotropic human prohibitin 2. *J Biol Chem* 281: 36401-36410
65. Han Y, Chen YS, Liu Z, Bodyak N, Rigor D, Bisping E, Pu WT, Kang PM (2006) Overexpression of HAX-1 protects cardiac myocytes from apoptosis through caspase-9 inhibition. *Circ Res* 99: 415-423
66. Grzybowska EA, Sarnowska E, Konopinski R, Wilczynska A, Sarnowski TJ, Siedlecki JA (2006) Identification and expression analysis of alternative splice variants of the rat Hax-1 gene. *Gene* 371: 84-92
67. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-368
68. Jiang Y, Zhang W, Kondo K, Klco JM, St Martin TB, Dufault MR, Madden SL, Kaelin WG Jr, Nacht M (2003) Gene expression profiling in a renal cell carcinoma cell line: dissecting VHL and hypoxia-dependent pathways. *Mol Cancer Res* 1: 453-462

HAX-1 protein: multifunctional factor involved in apoptosis, cell migration, endocytosis and mRNA transport

Maria Szwarc, Elżbieta Sarnowska, Ewa A. Grzybowska 

Department of Molecular Biology, Cancer Center Institute, 5 Roentgena St., 02-781 Warszawa, Poland

✉ email: ewag@coi.waw.pl

Key words: HAX-1, apoptosis, cell migration, endocytosis, posttranscriptional regulation of expression

ABSTRACT

HAX-1 protein, an anti-apoptotic factor, first identified in 1997, is also involved in cell migration, endocytosis and probably mRNA transport. HAX-1 structure indicates similarity to the proteins from Bcl-2 family, although there is no strong homology. HAX-1 is a substrate for Omi/HtrA2, a protease responsible for degradation of the caspases, and functions as an inhibitor of caspase-9, which points to its role in the regulation of apoptosis. Several HAX-1 interactions with proteins involved in apoptosis and cell motility were demonstrated. Another line of inquiry focus on its ability to bind 3' untranslated regions of the certain mRNAs. Some data indicate that it might be involved in mRNA transport. HAX-1 multifunctionality and its involvement in the processes important for the cell status suggest its possible role in oncogenesis and metastasis. It is also known that HAX-1 deficiency or overexpression leads to hereditary or systemic diseases (Kostmann disease, lesional psoriasis, systemic sclerosis). Therefore, detailed analysis of HAX-1 functions could be medically important.

Jolanta Bednarek¹

Józefa Węsierska-Gądek²

Zofia M. Kiliańska^{1,✉}

¹Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź

²Cell Cycle Regulation Group, Institute of Cancer Research, Department of Medicine I, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

✉Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego, ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; tel.: (042) 635 43 35, e-mail: zkilian@biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 7 marca 2007 r.

Artykuł zaakceptowano 20 kwietnia 2007 r.

Słowa kluczowe: apoptoza, białka rodziny Bcl-2, Mcl-1, cykl komórkowy, nowotworzenie

Wykaz skrótów: Bak (ang. *Bcl-2 homologous antagonist/killer*); Bcl-2 (ang. *B-cell leukemia/lymphoma-2*); BH (ang. *Bcl-2 homology*); Cdk1 (ang. *cyclin dependent kinase-1*); FDC (ang. *follicular dendritic cells*); GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*); Mcl-1 (ang. *myeloid cell leukemia-1*); Mule (ang. *Mcl-1 ubiquitin ligase E3*); NLS (ang. *nuclear localization signal*); PCNA (ang. *proliferating-cell nuclear antigen*); PEST – sekwencja aminokwasowa zawierająca reszty proliny, kwasu glutaminowego, seryny i treoniny; Puma (ang. *p53 upregulated modulator of apoptosis*); TCTP/fortilina (ang. *translationally controlled tumor protein/fortilin*); TM (ang. *trans membrane*) – region transbłonowy; TRAIL (ang. *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*); TRF1 (ang. *telomeric repeat binding factor-1*)

Podziękowanie: Praca powstała w trakcie realizacji projektu 003/2006/2007 w ramach współpracy polsko-austriackiej

STRESZCZENIE

Do głównych regulatorów apoptozy należą białka z rodziny Bcl-2 i białka hamujące apoptozę – IAP. W niniejszym artykule wnikliwie scharakteryzowano białko hamujące apoptozę – Mcl-1. Należy podkreślić, że to unikatowe, krótkożyjące białko – członek rodziny Bcl-2, może także funkcjonować jako czynnik stymulujący apoptozę, który powstaje w wyniku alternatywnego składania jego pre-mRNA, potranslacyjnych modyfikacji czy proteolizy. W przeglądzie przedstawiono również inne funkcje Mcl-1, m.in. w regulacji cyklu komórkowego, wydłużaniu telomerów. Podwyższona ekspresja genu *Mcl-1* towarzyszy rozwojowi różnych nowotworów, zaburzeniom neurodegeneracyjnym, a także chorobom infekcyjnym. Uzyskane wyniki badań wskazują, że analiza poziomu Mcl-1 może być użytecznym wskaźnikiem w podejmowaniu leczenia wielu chorób. Obniżenie syntezy tego białka może stanowić atrakcyjną strategię w terapii różnych nowotworów i chorób, w których Mcl-1 stanowi kluczowy czynnik w hamowaniu apoptozy.

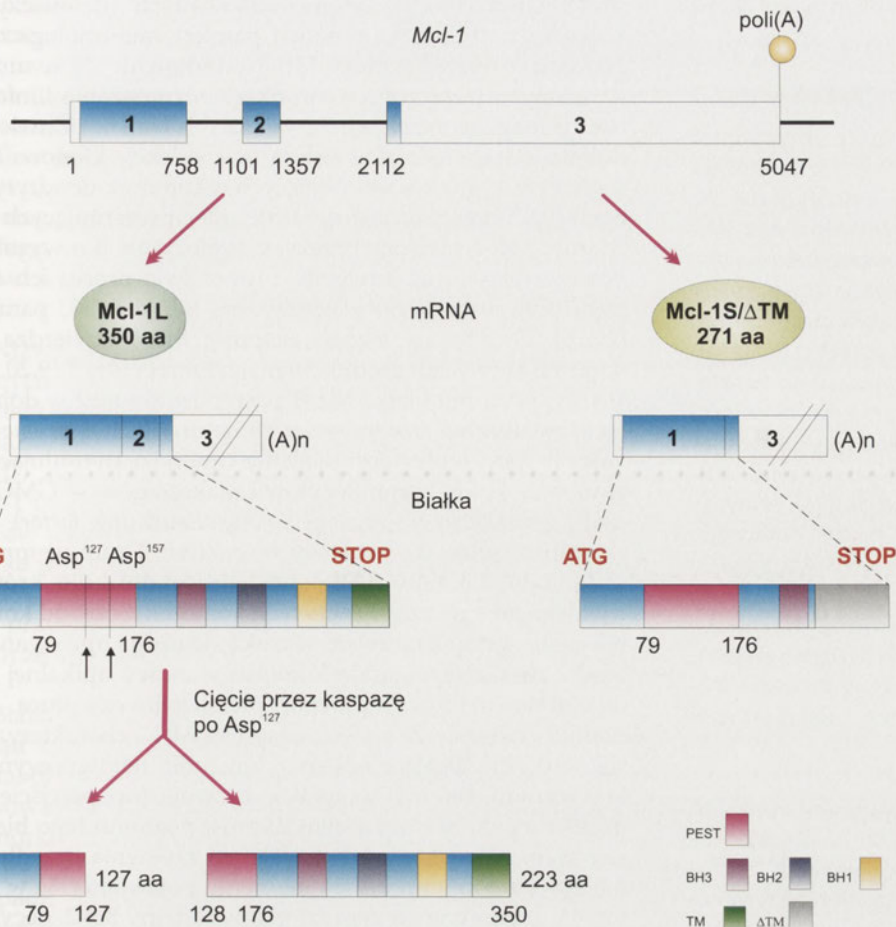
WPROWADZENIE

W przekazywaniu sygnału śmierci w komórkach głównie wykorzystywane są tzw. receptory śmierci (ang. *death receptors*), umieszczone w błonach komórkowych – inicjujące szlak receptorowy (zewnętrzny) lub mitochondria – związane z przebiegiem szlaku mitochondrialnego (wewnętrznego) apoptozy. Wiedza o apoptozie rozwija się bardzo dynamicznie i w wielu kierunkach. W centrum uwagi znajdują się mechanizmy regulacji tego, kluczowego dla organizmu, procesu. Dotychczas najwięcej uwagi poświęcono białkom z rodziny Bcl-2 (ang. *B-cell leukemia/lymphoma-2*), wśród których znajdują się czynniki zarówno anty-, jak i proapoptotyczne. Cechą charakterystyczną białek tej rodziny jest obecność w ich strukturze tzw. domen homologii BH (ang. *Bcl-2 homology*), opisywanych jako: BH1, BH2, BH3 i BH4 [1]. Domeny BH decydują o zdolności oddziaływania członków tej rodziny między sobą, bądź o oddziaływaniach z innymi białkami uczestniczącymi w regulacji apoptozy. Występowanie domen homologii oraz właściwości wynikające z ich struktury stały się podstawą podziału członków rodziny Bcl-2 u kręgowców na 3 podrodziny, tj. 1) wielodomenowe białka antyapoptotyczne (np. Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-w, A1/Bfl-1), 2) wielodomenowe białka proapoptotyczne typu Bax (np. Bax, Bak, Bok) oraz 3) jednodomenowe białka proapoptotyczne typu BH3 (ang. *BH3-only*) zawierające wyłącznie domenę BH3 [1].

Niniejszy artykuł przeglądowy stanowi podsumowanie najnowszych informacji dotyczących białka Mcl-1, które obok Bcl-2, reprezentuje wyjątkowo silny inhibitor hamujący apoptozę wywołaną przez różnorodne czynniki. Towarzysząca praca przedstawia właściwości molekularne i funkcję surwiwiny – kolejnego regulatora należącego do rodziny IAP.

STRUKTURA GENU I BIAŁKA

Białko Mcl-1 (ang. *myeloid cell leukemia-1*) należy do wielodomenowej podrodziny Bcl-2 o cechach inhibitorów apoptozy. Locus genu *Mcl-1/EAT* człowieka zidentyfikowano na ramieniu dłuższym chromosomu 1. (1q21) [2]. Regiony kodujące genu *mcl-1* myszy i człowieka wykazują znaczne (ponad 75%) podobieństwo [3]. W jego regionie promotorowym nie stwierdza się obecności sekwencji TATA. Gen ten budują 3 eksony (złożone, odpowiednio, z 631, 248 i 117 kbp u myszy oraz 688, 248 i 117 kbp u człowieka), kodujące tzw. długą formę Mcl-1L zbudowaną z 350 aa (m.c. 37/42 kDa) [4-9] (Ryc. 1). Białko to cechuje obecność tzw. domeny PEST (między 79. a 176. aa) – w jednoliterowym zapisie aminokwasów sekwencja wzbogacona w reszty proliny, kwasu glutaminowego, seryny i treoniny, domen BH (1-3) oraz, złożonej z 20 reszt aminokwasowych, hydrofobowej wstawki w rejonie C-końcowym cząsteczki Mcl-1. Ten ostatni region (podobny do fragmentu obecnego w białkach Bcl-2a i Bcl-2β), który oto-



Rycina 1. Schemat organizacji genu *Mcl-1*, transkryptów – produktów alternatywnego składowania mRNA oraz kodowanych przez nie białek, tj. formy dłuższej – Mcl-1L (350 aa) i krótszej – Mcl-1S/ΔTM (271 aa) (przygotowano na podstawie [4,9]). W przypadku ekspresji formy krótszej dochodzi do ominięcia eksonu 2. oraz zmiany ramki odczytu eksonu 3. przez co dochodzi do utraty domeny transbłonowej (ΔTM), co czyni C-końcowy fragment białka Mcl-1S/ΔTM unikatowym. Na rycinie zaznaczono domeny: homologii BH (BH1-BH3), PEST oraz transbłonową – TM. Umieszczono ponadto miejsca proteolitycznego cięcia kaspaz w domenie PEST (po Asp¹²⁷ i Asp¹⁵⁷) na formę dłuższą Mcl-1L. (preferencja Asp¹²⁷).

czają dodatkowo naładowane reszty argininy, odpowiada za kotwiczenie białka w zewnętrznej błonie mitochondrialnej – region transbłonowy (ang. *trans membrane*; TM) [2]. Domena PEST jest charakterystyczna dla białek o krótkim okresie życia w komórce, natomiast domeny BH odgrywają kluczową rolę w regulacji procesu apoptozy [10]. Pomimo nieobecności domeny BH4, charakterystycznej dla takich białek jak Bcl-2, Bcl-X_L i Bcl-X_S oraz występowania w domenie BH3 reszt aminokwasowych nietypowych dla tej podrodziny białek Bcl-2 (Val zamiast Ala w pozycji 4. rdzenia oraz pozbawiona ładunku Leu zamiast His lub Lys w pozycji -3 od obszaru rdzeniowego), białko Mcl-1, zgodnie z jego dotychczas poznaną funkcją w programowanej śmierci komórki, zaliczane jest do antyapoptotycznych członków rodziny Bcl-2 [4,9].

Alternatywne składowanie pierwotnego transkryptu *Mcl-1* z pominięciem eksonu 2. przyczynia się do utraty w powstałym białku – Mcl-1S/ΔTM (271 aa; 27-29 kDa), regionów homologii BH1 i BH2 – typowych dla antyapoptotycznej podrodziny Bcl-2 oraz domeny TM. Z kolei wskutek zmiany ramki odczytu genu w eksonie 3. produkt białkowy zyskuje charakterystyczny fragment C-końcowy, bez domeny transbłonowej. Powstały produkt – Mcl-1S/ΔTM wykazuje

strukturalne podobieństwo do proapoptotycznych członków rodziny Bcl-2, z podrodziny „BH3-only”, a jego nadekspresja – w przeciwieństwie do alternatywnego wariantu – prawdopodobnie promuje śmierć komórek na drodze apoptozy. W żywych komórkach taka postać białka występować musi w formie nieaktywnej, podobnie jak ma to miejsce w przypadku białek Bim, Bad czy Bid. [4,9].

Wykorzystanie techniki Western-blot ujawniło inne, dodatkowe izoformy Mcl-1, które mogą powstawać w wyniku alternatywnej inicjacji translacji, potranslacyjnych modyfikacji (np. fosforylacja/defosforylacja) czy cięcia przez enzymy proteolityczne [8,9]. Aktywne w hamowaniu apoptozy, białko Mcl-1 występuje w postaci ufosforylowanej, ujawniając się w żelu poliakrylamidowym w postaci prążka o m.c.z. ok. 42 kDa [5]. W jego pobliżu wędruje składnik o m.c.z. ok. 40 kDa, odpowiadający defosforylowanej postaci Mcl-1, nie pełniący funkcji antyapoptotycznej.

Ostatnio zidentyfikowano skróconą formę białka, którą, ze względu na jej jądrową lokalizację, opisano symbolem snMcl-1 [8]. Białko to wykryto techniką Western-blot w różnych liniach komórkowych (komórki mieloidalne TF-1, limfocyty Jurkat T, komórki białaczkowe

HL-60). Odmienny stopień fosforylacji powoduje, że wędruje ono w żelu poliakrylamidowym w postaci podwójnego prążka w regionie odpowiadającym m.c.z. ok. 35-37 kDa. Analiza białka, przeprowadzona z zastosowaniem spektrometrii masowej, ujawniła występowanie w rejonie C-końcowym snMcl-1 (między 264. a 276. resztą aminokwasową) odcinka, którego brak w produkcie ekspresji alternatywnego składowania genu. Z dużym prawdopodobieństwem wykazano więc, że białko to jest skróconą formą białka Mcl-1L, powstałą prawdopodobnie przez (niezależne od kaspaz) proteolityczne cięcie w pobliżu jego C-końca. Utrata domeny transbłonowej snMcl-1 pozwala przypuszczalnie na jego przemieszczanie się do jądra komórkowego, w którym białko to oddziałuje z kluczową kinazą cyklu komórkowego – Cdk1 (ang. *cyclin dependent kinase-1*). Właściwości takiej nie wykazuje białko o pełnej długości łańcucha. W strukturze pierwszorzędowej Mcl-1 nie opisano sygnału lokalizacji jądrowej NLS (ang. *nuclear localization signal*). Wydaje się prawdopodobne, że kompleks snMcl-1/Cdk1 składany jest w cytosolu i dopiero w wyniku oddziaływania z jakimiś, nieznanymi dotąd bliżej czynnikami białkowymi, zyskuje zdolność przemieszczania do jądra komórkowego [8]. Znaczenie powstałego kompleksu omówione zostanie w dalszej

części pracy, poświęconej postulowanej funkcji białka Mcl-1 w regulacji cyklu komórkowego.

LOKALIZACJA, SYNTEZA I STABILNOŚĆ BIAŁKA MCL-1

Mcl-1 reprezentuje krótko żyjące białko antyapoptyczne związane głównie z wczesnym etapem szlaku mitochondrialnego [11]. Białko to pierwotnie zidentyfikowano w 1993 roku w komórkach białaczkowych człowieka linii ML-1 (ang. *myeloid leukemia-1*) [2]. Zaobserwowano wówczas, że niedojrzałe mieloblasty indukowane do różnicowania estrem forbolu (12 mirystyniano-13-octan forbolu – ang. *12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate*; TPA) w ciągu 3 dni ulegają przekształceniu w nieproliferujące, prawidłowe monocyty/makrofagi. Natomiast już po 3 godzinach od ekspozycji na TPA, jeszcze przed ujawnieniem się morfologicznej dojrzałości komórek, wzrastała ekspresja genu, opisywanego skrótem *Mcl-1*/albo *EAT*, podobnego sekwencyjnie do wykrytego kilka lat wcześniej genu kodującego białko Bcl-2 (35% homologii, a 59% podobieństwa z Bcl-2) [2,12,13]. Wówczas znano już antyapoptotyczną aktywność białka Bcl-2. Uzyskane metodą RT-PCR wyniki, wskazujące na wczesną ekspresję białka Mcl-1 pod wpływem TPA, sugerowały rolę, jaką może ono odgrywać w procesie blokowania śmierci programowanej komórek mieloidalnych ulegających różnicowaniu.

W komórkach białko Mcl-1 zlokalizowane jest zarówno we frakcji mitochondrialnej, jak i poza nią, tj. w siateczce śródplazmatycznej i otoczce jądrowej [14]. Ukazały się doniesienia wskazujące na preferencyjne jego występowanie na obszarze jądra komórkowego [10,15–17]. Jednak większość danych wskazuje na mitochondria, jako główne miejsce jego lokalizacji [1,11,18]. Jak dotąd, nie ma zgodności co do czasu i kolejności pojawiania się opisywanego białka w określonym przedziale komórkowym. Analiza immunofluorescencyjna rozmieszczenia Mcl-1 w mysich fibroblastach linii NIH-3T3 przeprowadzona przez tajwańskich badaczy [19] wykazała, że jego subkomórkowe rozmieszczenie zależy od fazy życia komórek. W okresie ich ekspotencjalnego wzrostu przeważająca ilość opisywanego białka występuje w mitochondriach, zaś w fazie stacjonarnej znaczną pulę Mcl-1 stwierdza się w jądrze komórkowym. Dotychczas nie wyjaśniono sposobu, w jaki Mcl-1 przemieszcza się w obręb komórki. Przypuszczalnie istotną rolę w tym procesie odgrywa potranslacyjne dojrzewanie (ang. *processing*) cząsteczki Mcl-1 [19]. Według Chou i wsp. [18] w transporcie nowo syntetyzowanego białka do mitochondriów uczestniczy receptor Tom 70, którego zablokowanie (poprzez zastosowanie przeciwciał) znacząco obniża import Mcl-1 do tego organellum. Krytyczny dla oddziaływania z tym receptorem okazuje się motyw EELD, zlokalizowany wewnątrz cząsteczki białka. Dodatkowo, transport do mitochondriów wymaga obecności hydrofobowej domeny TM obecnej w regionie C-końcowym łańcucha polipeptydowego.

Ekspresja genu kodującego Mcl-1 podlega ścisłej i bardzo złożonej regulacji zależnej od etapu rozwoju organizmu, rodzaju tkanki czy fazy cyklu komórkowego [14]. Syntezę białka stwierdza się w niedojrzałych komórkach linii mieloidalnej i erytroidalnej, a także w komórkach limfoidalnych na określonym etapie ich różnicowania [20]. Niski poziom

Mcl-1 obserwuje się w nieedukowanych (dziewicznych) komórkach B oraz komórkach pamięci immunologicznej. Natomiast wzrost syntezy Mcl-1 odnotowuje się w umiejscowionych poza grasicą ośrodkach rozmnażania limfocytów B (ang. *germinal center*), w których białko, prawdopodobnie, odpowiedzialne jest za tzw. selekcję klonów. Pod wpływem sygnałów docierających z komórek dendrytycznych FDC (ang. *follicular dendritic cells*), prezentujących antygeny, Mcl-1 promuje przeżycie limfocytów B o wysokim powinowactwie do antygeny i umożliwia proces ich różnicowania w komórki plazmatyczne lub komórki pamięci [20,21]. Gwałtowny wzrost ekspresji Mcl-1 stwierdza się także po aktywacji nieedukowanych limfocytów T [9,20,22]. Wzrost poziomu białka Mcl-1 następuje również w dojrzających, ostatecznie zróżnicowanych neutrofilach w czasie zakażenia, pod wpływem działania czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów – GMC-SF (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) czy składnika ścian komórkowych bakterii Gram-ujemnych – lipopolisacharydu (LPS), sprzyjając wydłużeniu, krótkotrwałego zwykle czasu życia tych komórek. Spośród komórek niehematopoetycznych wysoką ekspresją opisywanego białka charakteryzują się komórki warstwy apikalnej nabłonka wyścielającego prostatę, piersi, jelito czy płuca. Aktualnie uznaje się, że wyższą ekspresją Mcl-1 charakteryzują się komórki ulegające istotnym zmianom fenotypowym w krytycznym dla nich momencie rozwoju (np. przejście od proliferacji do różnicowania). Wzrost poziomu tego białka jest szybki i zwykle krótkotrwały, co zapewnia przedłużenie żywotności komórki do momentu pojawienia się w niej innych czynników, w tym członków rodziny Bcl-2, decydujących o dalszych jej losach [20].

Białko Mcl-1, w przeciwieństwie do innych członków rodziny Bcl-2, których geny ulegają konstytutywnej ekspresji, syntetyzowane jest w komórkach w odpowiedzi na biocząsteczki o naturze czynników wzrostu i różnicowania [16] czy też pod wpływem stresu komórkowego (np. hipoksja) [20]. Transkrypcję *Mcl-1* aktywują, m.in. interleukiny: IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL-15, IFN α i różne czynniki wzrostu, tj. czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (ang. *vascular endothelial growth factor*; VEGF), naskórkowy czynnik wzrostu (ang. *epidermal growth factor*; EGF), czynnik wzrostu komórek pnia (ang. *stem cell factor*) czy wspomniany już czynnik GM-CSF. Ponadto, podobną aktywność wykazują niektóre hormony jak erytropoetyna, gonadotropina, aktywina A [20,23–25]. Podwyższona ekspresja genu *Mcl-1* pod wpływem czynników wzrostu i różnicowania nie wymaga syntezy białek i wykazuje podobieństwo do genów odpowiedzi wczesnej, takich jak *fos* [20,26]. Taki mechanizm regulacji ekspresji genu kodującego białko może być istotny przy przejściu przez określone stadium w rozwoju komórki, zapobiegając równocześnie przedłużonej jej ekspozycji na produkty genów promujących żywotność oraz ograniczając możliwość jej uniesmiertelnienia i transformacji nowotworowej [26]. Wymienione cytokiny i mitogeny regulują transkrypcję *Mcl-1* na drodze aktywacji szlaków kinaz MAP, PI-3K/Akt, JAK/STAT [20,27–29]. Jak dotąd, najlepiej poznano szlak włączania ekspresji *mcl-1* w zależnych od IL-3, modelowych komórkach mysiej hemopoetycznej linii Ba/F3, w których wspomniana cytokina wydaje się działać poprzez wpływ na transaktywację czynników transkrypcyj-

nych (ang. *SIE-binding complex*; szlak kinazy p38) lub na ich wiązanie z DNA w regionie promotorowym (ang. *CRE-binding complex*; szlak PI3-K/AKT) [19,28,30,31]. Wykazano, że za indukowaną przez IL-3 aktywację *mcl-1* odpowiada sekwencja zlokalizowana w regionie pomiędzy -197 a -69 nukleotydem [32]. W komórkach człowieka gen *Mcl-1* zachowuje element podobny do SIE w regionie -162 do -107 promotora (wiązący SRF (ang. *serum response factor*)/Elk-1), którego indukcja, jak wykazano na przykładzie komórek białaczkowych linii K562, następuje pod wpływem TPA [19].

Niższą syntezę *Mcl-1* obserwuje się w warunkach sprzyjających apoptozie komórek indukowanej przez promieniowanie UV, niedobór czynników wzrostu [20] lub działanie związków chemicznych o różnej naturze, np. aktynomycyny D, salicylanów, etopozydu [11]. Do spadku poziomu *Mcl-1* prowadzi również zakażenie komórek adenowirusami, ale wynika ono raczej z przyspieszenia degradacji tego białka w proteasomie, niż ze zmian na poziomie transkrypcji [19]. Sprawą otwartą jest czy spadek syntezy białka *Mcl-1* jest przyczyną, czy może konsekwencją procesów związanych ze śmiercią komórki [20].

Białko *Mcl-1*, w przeciwieństwie do innych poznanych dotąd członków rodziny *Bcl-2*, jest labilne. Czas obrotu metabolicznego *Mcl-1* zależy od typu komórek oraz zastosowanej metody pomiarowej określającej okres życia w komórkach cząsteczek nowo syntetyzowanego białka, bądź też jego dojrzałej formy [17,33]. Średni czas połowicznego rozpadu *Mcl-1* w immortalizowanych keratynocytach człowieka linii HaCaT, mierzony przy użyciu metody z cykloheksimidem – inhibitor syntezy białek – wynosi 4 godziny 20 minut, zaś w komórkach HeLa waha się on w granicach 30–40 minut [17,19,33]. Za krótki okres półtrwania *Mcl-1*, według niektórych autorów [2,3], odpowiada obecność w cząsteczce białka wspomnianej wcześniej sekwencji PEST oraz motywów Arg:Arg, które kierować mogą białko na drogę proteolizy. Inni badacze dowodzą natomiast, że domena PEST nie jest w sposób bezpośredni odpowiedzialna za szybką degradację *Mcl-1*, a jej usunięcie z cząsteczki nie wpływa istotnie na czas rozkładu białka [34].

W procesie proteolizy *Mcl-1* uczestniczy zidentyfikowany w ostatnim okresie enzym Mule (ang. *Mcl-1 ubiquitin ligase E3*), znany także jako LASU1, Ureb-1, E3^{histon}, HectH9 czy ARF-BP1 (ang. *ARF-binding protein 1*) [35–37]. Cytowane białko o aktywności ligazy ubikwitylowej, poza rozpoznaniem *Mcl-1*, odpowiada także za degradację białka p53 [37,38]. Mule jest wysokocząsteczkowym (ok. 500 kDa) enzymem zawierającym, obok domen HECT (ang. *homologous to E6-AP C-terminus*), UBA (ang. *ubiquitin associated*) i WWE (rola w kierowaniu do proteasomu), niezbędnych w pełnieniu aktywności ligazy E3, również domenę BH3 – kluczową w jego oddziaływaniu z białkiem *Mcl-1* [35,36]. Ligaza Mule oddziałuje z *Mcl-1* zarówno w formie L, jak i S [35]. Obniżenie jej ekspresji przyczynia się do stabilizacji, krótkożyjącego w warunkach prawidłowych, białka *Mcl-1* i jego nagromadzenia się w komórkach. Efekt działania enzymu modulowany jest przez czynniki, których ekspresja zależy od białka p53. Do nich zalicza się fortilinę (ang. *fortilin*; od łac. *fortis* – silny), opisywaną również symbolem TCTP

(ang. *translationally controlled tumor protein*) [15] oraz białka rodziny *Bcl-2* promujące śmierć [39,40].

Fortilina (m.c. 23-25 kDa) należy do zachowanych w ewolucji białek jądrowych o naturze antyapoptotycznej, występujących w komórkach organizmów od grzybów po ssaki [15,17]. Białko to wiąże *Mcl-1* i zapobiega jego proteolizie, a ekspresja genu fortiliny podlega negatywnej regulacji przez p53 [19,38]. Wprowadzenie do genu *Mcl-1* mutacji, uniemożliwiającej wiązanie fortiliny/TCTP powoduje wyraźny spadek stabilności otrzymanego produktu białkowego i skutkuje ograniczeniem jego antyapoptotycznej aktywności w porównaniu z cząsteczką typu dzikiego [17]. Jak dotąd, natura oddziaływania pomiędzy *Mcl-1* a fortiliną nie została wyjaśniona. Główną rolę w tym oddziaływaniu przypisuje się reszcie Lys²⁵⁷ białka *Mcl-1*, której zastąpienie Val znacząco obniża zdolność do oddziaływania obydwu tych białek i skraca ponad 2-krotnie jego czas półtrwania w komórce. Sugeruje się, że fortilina może wpływać na dojrzewanie i właściwe zwijanie nowo syntetyzowanego białka *Mcl-1*, które w jej nieobecności ulega szybszej degradacji. Alternatywny model zakłada konieczność przyłączenia do *Mcl-1* kofaktora w postaci cząsteczki fortiliny w celu ujawnienia się jego biologicznej aktywności. Oddziaływanie to warunkują potranslacyjne modyfikacje obydwu oddziałujących ze sobą białek. Ochronne działanie fortiliny może w tym przypadku wynikać z maskowania w utworzonym kompleksie miejsca ubikwitylacji cząsteczki *Mcl-1* [17]. Formowanie takiej struktury mogłoby ponadto opóźnić degradację fortiliny, za czym przemawiają wyniki uzyskane przez grupę Fujise [16] sugerujące, że to *Mcl-1* funkcjonuje jako białko opiekuńcze (ang. *chaperone*), wiążące i stabilizujące fortilinę *in vitro* i *in vivo*.

Ostatnio opublikowano doniesienia wskazujące, że *in vitro* oddziaływaniu *Mcl-1* z ligazą Mule mogą zapobiegać czynniki zawierające w swej strukturze domenę BH3 i współzawodniczące z enzymem o miejsce wiązania w hydrofobowym rowku utworzonym przez domeny BH (BH1, BH2 i BH3) cząsteczki *Mcl-1*, np. zawierający BH3 konstrukt HA-Bim(BH3) [35], białko Puma (ang. *p53 upregulated modulator of apoptosis*), Bak (ang. *Bcl-2 homologous antagonist/killer*) czy NOXA [39,40]. Prawdopodobnie stanowi to jedną z przyczyn występowania *Mcl-1* w żywych komórkach w postaci kompleksów z proapoptotycznymi białkami rodziny *Bcl-2*, m.in. Bak [35,40,41]. Wykorzystując jako model komórki HeLa, wykazano, że tworzenie heterodimerów Puma/*Mcl-1* stabilizuje cząsteczkę *Mcl-1*, a także znosi proapoptotyczną aktywność białka Puma. Sugeruje się, że jedynie niezasocjowany z żadnym ligandem *Mcl-1* okazuje wrażliwość na degradację w proteasomie. Wykazano równocześnie, że wiązanie *Mcl-1* z białkiem Puma nie jest czynnikiem wystarczającym, aby zapobiec jego proteolizie w czasie apoptozy [35]. Willis i wsp. [40] donieśli, że w fibroblastach myszy (ang. *mouse embryo fibroblast*) w warunkach promujących śmierć, wiązanie *Mcl-1* z proapoptotycznym czynnikiem NOXA, nie tylko nie chroni, ale może nawet sprzyjać degradacji białka *Mcl-1* w proteasomie i wydaje się przebiegać bez udziału ligazy Mule.

Okres połowicznego rozpadu białka *Mcl-1* może być również skrócony wskutek jego związania z tankirazą I

(ang. *TRF1-interacting, ankyrin-related ADP-ribose polymerase 1; tankyrase 1*) – enzymem wykazującym aktywność polimerazy poli(ADP-rybozy) [19,29]. Oddziaływanie to hamuje antyapoptotyczną funkcję formy długiej Mcl-1L, jak również proapoptotyczną – białka Mcl-1S. Uwagę zwraca obserwacja, że w regulacji tej wydaje się nie uczestniczyć aktywność enzymatyczna tankirazy I [19]. Wykazano, że pozbawiony domeny katalitycznej mutant polimerazy, opisywany „Tanky”, nie traci zdolności do oddziaływania z białkiem Mcl-1 [23]. W wiązanie angażuje się fragment ankirynowej domeny tankirazy-1 oraz krótki 25-aminokwasowy odcinek zlokalizowany w rejonie N-końcowym łańcucha Mcl-1 (między resztami 76. a 100. aa), zawierający motyw RPPPIG, podobny do sekwencji obecnej w innych białkach wiążących tankirazę – RXXPDG. Według danych PESTFIND, fragment ten wyposażony jest w sekwencję PEST.

Aktywność i degradacja białka Mcl-1 może być regulowana przez czynniki o naturze kinaz [33,42–45]. W cząsteczce Mcl-1 występuje wiele potencjalnych miejsc fosforylacji, a los białka wydaje się być ściśle zależny od umiejscowienia w łańcuchu aminokwasu, który ulega modyfikacji. Wyniki doświadczeń ujawniły, że fosforylacja reszt Ser¹²¹ i Thr¹⁶³ białka Mcl-1 przez kinazę JNK i p38 blokuje jego antyapoptotyczną aktywność [46,47]. Natomiast modyfikacja przez kinazy białkowe – PKA i PKB (Akt) znacząco zwiększa stabilność Mcl-1 poprzez zahamowanie obrotu metabolicznego tego białka [44,48]. Na podkreślenie zasługują wyniki doświadczeń Kato i wsp. [44] wskazujące, że hiperfosforylacja Mcl-1 (fosforylacja w dodatkowych pozycjach), wywołana działaniem na neutrofile cytotoksycznego inhibitora fosfataz 1/2 A – kwasu okadainowego lub czynników promujących apoptozę (np. taksol), może przyspieszać jego degradację. Na spadek poziomu białka Mcl-1 może wpływać także kinaza białkowa C (PKC) [33]. Stwierdzono, że w komórkach linii HaCaT, zakażonych retrowirusem kodującym fuzyjne białko PKC δ /ER, zawierające domenę katalityczną izoformy PKC δ oraz domenę wiążącą ligand receptora estrogenowego, aktywowanych przez tamoksyfen, synteza enzymu koreluje ze znacznym spadkiem poziomu Mcl-1 (około 41%) i wzrostem liczby komórek apoptotycznych w porównaniu z kontrolą. Aktualnie wiadomo, że aktywacja PKC δ wymaga obecności kaspazy-3, przeprowadzającej proteolizę pełnej długości białka i uwalniającej jego domenę katalityczną [33,42]. W warunkach naturalnych aktywna izoforma PKC δ prawdopodobnie nie indukuje samodzielnie apoptozy, lecz pełni funkcję łącznika między aktywacją kaspaz, wywołaną działaniem innych czynników, a degradacją Mcl-1 i wzmacnia, wygenerowany już w komórce, sygnał śmierci.

BIOLOGICZNA ROLA BIAŁKA MCL-1

Białko Mcl-1, zgodnie z doniesieniami ostatnich lat, uczestniczy w różnych procesach niezbędnych do rozwoju i funkcjonowania organizmu – od prawidłowego przebiegu hematopoezy, przez udział w wywoływaniu odpowiedzi immunologicznej, po reprodukcję [26,45,49,50]. Na podkreślenie zasługuje rola tego białka w procesie zapłodnienia oraz prawidłowej owulacji, właściwej embriogenezie i rozwoju zarodka [51]. Ekspresja genu kodującego białko

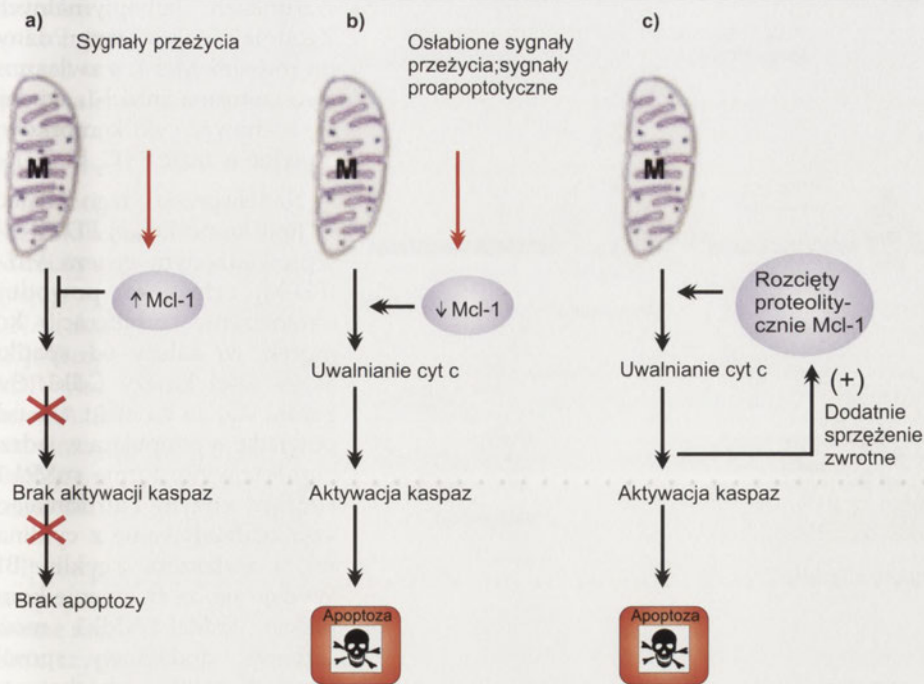
Mcl-1 jajnika, zachodząca pod wpływem gonadotropin, umożliwia przeżycie oocytów i może promować ich rozwój [20]. Przypuszcza się, że udział Mcl-1 w implantacji zarodka ściśle wiąże się z jego funkcją regulatora cyklu komórkowego [52]. Zaobserwowano ponadto, że zwiększona synteza Mcl-1 w fazie okołointplantacyjnej jest niezbędna dla prawidłowej embriogenezy. Myszy pozbawione ekspresji genu kodującego to białko charakteryzują się wysoką śmiertelnością na etapie wczesnego różnicowania, wywołanego znaczną apoptozą oraz zatrzymaniem rozwoju komórek krwi, m.in. w stadium proB limfocytów i stadium podwójnie negatywnych limfocytów T. Cytowane obserwacje [25] wskazują na kluczowe znaczenie Mcl-1 w rozwoju ssaków i utrzymaniu przy życiu dojrzałych limfocytów B i T. Wzrost syntezy ekspresji Mcl-1 w niedojrzałych komórkach służy prawdopodobnie zwiększeniu ich żywotności podczas inicjacji różnicowania. Zjawisko to ujawniono zarówno w różnicujących się komórkach mieloidalnych, jak i w nowotworowych komórkach embrionalnych linii NCR-G3, wykorzystywanej jako model embriogenezy zarodków człowieka [13,26,49,50].

Wysoki poziom syntezy Mcl-1 zmniejsza wrażliwość komórek na apoptozę indukowaną m.in. nadekspresją protoonkogenu *c-myc*, niedoborem cytokin, promieniowaniem UV, staurosporyną [31].

UDZIAŁ BIAŁKA MCL-1 W APOPTOZIE

Jak dotąd nie poznano w pełni molekularnego mechanizmu aktywności Mcl-1. Wśród istotnych właściwości tego białka kluczowe znaczenie przypisuje się jego zdolności do regulowania wypływu z mitochondriów cytochromu c [11,53], wynikającej z jego potencjału do heterooligomeryzacji z proapoptotycznymi członkami rodziny Bcl-2 (np. Bim, Bak, NOXA, Puma czy tBid) i neutralizacji ich funkcji (Ryc. 2) [9,25,41,53,54]. Uważa się, że podczas apoptozy Bak i Bax przy udziale białek Bcl-2 „BH3-only”, w tym tBid czy Bim, formują złożone kanały w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Powstawanie kanałów zwiększa przepuszczalność zewnętrznej błony tych organelli, co skutkuje wypływem apoptogennych czynników, m.in. cytochromu c, niektórych prokaspaz, proteazy Omi/HtrA2, białka Smac/DIABLO, AIF czy endonukleazy G [55]. Białko Mcl-1 wykazuje zdolność wiązania się zarówno z uczestniczącym w formowaniu kanałów błonowych składnikiem Bak, jak i Bim, NOXA czy Puma. Na podkreślenie zasługują obserwacje, że cząsteczka o pełnej długości Mcl-1L nie oddziałuje z proapoptotycznym białkiem Bid czy Bad bez ich wcześniejszej aktywacji proteolitycznej [6,30,54,56–59]. Jak dotąd, nie udowodniono oddziaływania pomiędzy białkami Bax i Mcl-1, choć niektórzy badacze nie wykluczają takiej możliwości. Akceptuje się pogląd, że Mcl-1, obok BclX_L, stanowi główny składnik regulujący funkcję proapoptotycznego białka Bak [59]. Oddziaływanie Mcl-1 z Bak (i być może z Bax) blokuje aktywność proapoptotycznych białek i zapobiega włączeniu programu śmierci.

Zgodnie z hipotetycznym modelem „wypierania/zastępowania” (ang. *displacement model*) w warunkach sprzyjających apoptozie, takich jak niedobór glukozy w rozwijających się limfocytach T czy działanie stresu genotoksycznego



Rycina 2. Regulacja apoptozy przez białko Mcl-1 (wg [9]; zmieniono). (a) Indukcja ekspresji Mcl-1 przez sygnały przeżycia może wpływać na hamowanie wypływu z mitochondriów cytochromu c i przyczyniać się do nabywania oporności na apoptozę; (b) szybki spadek ekspresji Mcl-1 po usunięciu/osłabieniu czynników przeżycia albo po pojawieniu się sygnałów proapoptotycznych stymuluje uwalnianie z mitochondriów cytochromu c i apoptozę komórek; (c) proteolityczne cięcie przez kaspazy Mcl-1 prowadzi do ujawnienia proapoptotycznego fragmentu Mcl-1, który może inicjować uwalnianie cytochromu c i aktywować apoptozę.

w komórkach HeLa, aktywność oddziałującego z Bak białka Mcl-1 może być neutralizowana przez członków rodziny Bcl-2 „BH3-only”, np. Bim, Puma czy NOXA [57–59]. W tej sytuacji proapoptotyczny partner – Bak zostaje uwolniony z kompleksu i może ulegać aktywacji (Ryc. 3). Równoczesna neutralizacja innego białka wiążącego Bak, tj. Bcl_L, umożliwi formowanie w błonach organelli komórkowych złożonych kanałów, przez które do cytosolu uwalniane są czynniki apoptogenne odpowiedzialne za realizację programu śmierci. Z kolei inny, oddziałujący z Mcl-1 i blokujący jego funkcje proapoptotyczny czynnik – Bim charakteryzuje się wysokim powinowactwem do wszystkich promujących przeżycie białek [37,59]. Wyniki doświadczeń wskazują, że Bim może ponadto: i) działać jako bezpośredni aktywator kompleksu Bax-Bak oraz ii) indukować uwalnianie białek z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów niezależnie od Bak, poprzez oddziaływanie z kanałem zależnym od napięcia – VDAC (ang. *voltage dependent anion channel*) [6,59].

Komórki prawidłowe charakteryzuje stan równowagi pomiędzy Mcl-1 a proapoptotycznymi członkami rodziny Bcl-2, z którymi białko to może oddziaływać [56,57]. Dotychczas mechanizm wspomnianej regulacji stanu równowagi wciąż nie jest znany, choć zaobserwowano, że spadkowi poziomu cząsteczek Mcl-1 towarzyszy zmniejszenie stężenia jego proapoptotycznych partnerów (np. Bak czy NOXA) [57,60]. Podobną zależność wykazano m.in. pomiędzy Bak i Mcl-1 w komórkach linii Hek 293 [60].

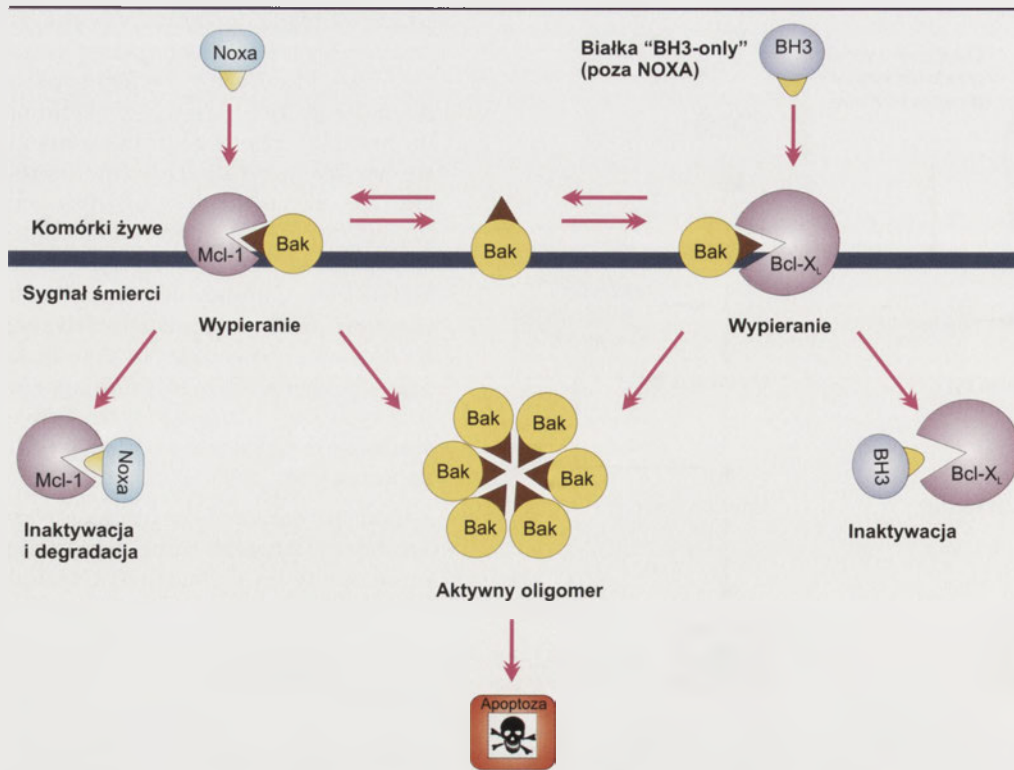
Z kolei w prawidłowych, nieedukowanych limfocytach T utrzymuje się równowaga między Mcl-1 i proapoptotycznym białkiem NOXA. Wzrostowi poziomu promującego

przeżycie białka towarzyszy podwyższenie syntezy proapoptotycznego czynnika, który wiąże i w ten sposób neutralizuje Mcl-1. Zjawisko to chroni na przykład przed nagromadzeniem się we krwi zbyt dużej liczby komórek. Po aktywacji w nieedukowanych limfocytach T rolę regulatora funkcji Mcl-1 odgrywa proapoptotyczne białko Bim. Odnotowano, że spadek ekspresji Bim w rozwijających się limfocytach powoduje przesunięcie równowagi na korzyść promującego przeżycie Mcl-1, zaś jego wzrost prowadzi do zwiększonej eliminacji tych komórek [56].

Podczas zakażenia wirusowego obserwuje się przyspieszoną degradację proapoptotycznego białka Bak, czemu towarzyszy zwiększenie przeżycia zakażonych komórek w wyniku zaburzenia homeostazy między białkami regulatorowymi [60]. W czasie apoptozy, wskutek uaktywnienia różnych mechanizmów kontroli tego procesu, dochodzi do spadku lub nawet całkowitego zaniku ekspresji Mcl-1 [31] i chociaż jest warunkiem niewystarczającym do zainicjowania apoptozy, może uwrażliwić większość komórek

na działanie dodatkowych czynników indukujących śmierć [33,56,57,60]. W zależności od rodzaju działającego na komórkę czynnika i, zapewne także, od typu komórki poziom Mcl-1 spada, zarówno wskutek indukowania zmian na poziomie mRNA, jak i na etapie translacji białka. Przedstawiono eksperymentalne dowody wskazujące, że *in vitro* staurosporyna w limfocytach Jurkat T wpływa na obydwie z wymienionych powyżej procesów. Natomiast działanie aspiryny przyczynia się do spadku poziomu antyapoptotycznego białka Mcl-1 w wyniku zależnego i/lub niezależnego od kaspaz zahamowania jego syntezy, bądź (co nie jest wykluczone) także zaburzenia jego stabilności [31].

Podczas apoptozy komórek człowieka proteolizy białka Mcl-1L mogą dokonywać granzym B i kaspazy (zwłaszcza kaspaza-3) [6,47]. Zależna od kaspazy proteoliza izoformy Mcl-1 zachodzi w obrębie sekwencji PEST, po konserwatywnych resztach Asp¹²⁷ i Asp¹⁵⁷, generując fragmenty o m.cz. odpowiednio 24 i 12 oraz 19 i 17 kDa. Preferowanym miejscem cięcia proteolitycznego jest Asp¹²⁷ (por. Ryc. 1). Należy podkreślić, że dotąd nie wykazano produktów proteolizy izoformy Mcl-1 Δ TM. Ponadto pojawiły się doniesienia, że C-końcowy fragment uwolniony przez kaspazy, a także granzym B, może wykazywać potencjał indukcji apoptozy i dodatkowego wzmocnienia sygnału śmierci [6,9]. Sugeruje się, że zdolność ta wynikać może z ponad 6-krotnie wyższego powinowactwa produktu proteolitycznego cięcia Mcl-1 do czynnika Bim, neutralizującego ochronny efekt komórek przez Mcl-1 w porównaniu z białkiem o pełnej długości [47]. Jak dotąd brak jest jednak zgodności w kwestii proapoptotycznego działania produktów proteolizy Mcl-1.



Rycina 3. Regulacja aktywności białka Bak przez białka Mcl-1 i Bcl-X_L (model „wypierania”) po uzyskaniu sygnału śmierci (wg [40]; zmieniono). Białko NOXA z łatwością zastępuje Bax w kompleksie Bax-Mcl-1, inicjując jego degradację. Inne białka z podrodziny Bcl-2 „BH3-only” oddziałują z Bcl-X_L, mogą również wypierać Bak z jego połączeń z tym białkiem antyapoptotycznym. Uwolnione białko Bak może formować oligomery w błonie mitochondrialnej i tworzyć kanały umożliwiające wypływ z mitochondriów czynników apoptogennych.

Wyniki doświadczeń Clohessy'ego i wsp. [34] wskazują, że produkt proteolizy Mcl-1 przez kaspazy nie działa proapoptotycznie, ale może działać ochronnie na komórki. Badacze ci odnotowali spadek odsetka (55–60%) komórek apoptotycznych wśród populacji komórek mysiej mieloidalnej linii FDCP-1 z wprowadzonym fragmentem $\Delta 157$ białka Mcl-1, w porównaniu z nietransfekowaną kontrolą (85–90%). Przedstawione dane sugerują, że czynnik ten może ochraniać komórki, nawet po aktywacji kaspaz w warunkach ograniczonego dostępu czynników wzrostu.

Zdolność granzymu B do proteolizy Mcl-1 może odgrywać rolę zwłaszcza w warunkach nadekspresji innych antyapoptotycznych białek rodziny Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L) lub niedoboru Bax i Bak, gdyż enzym ten działa na etapie poprzedzającym aktywację kaspaz, niezależnie od proapoptotycznych czynników zlokalizowanych w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów [6].

ROLA BIAŁKA MCL-1 W REGULACJI CYKLU KOMÓRKOWEGO

Od kilku lat antyapoptotyczna aktywność białka Mcl-1 przestała być przedmiotem wątpliwości. Natomiast zaskakujące wydają się coraz częstsze doniesienia dotyczące udziału członków rodziny Bcl-2, w tym także Mcl-1, w regulacji cyklu komórkowego [8,10,61]. Pionierskie doniesienia dotyczące tego zagadnienia pochodzą z laboratorium Korsmeyer'a [62], w którym wykazano zdolność endogennego białka Bcl-2 limfocytów T do wydłużania fazy G₁ cyklu w

warunkach suboptymalnych. Zgodnie z najnowszymi danymi również Mcl-1, a zwłaszcza jego izoforma snMcl-1, wydaje się hamować cykl komórkowy głównie w fazie S i G₂ [8,52].

Nadekspresja tego białka w linii komórkowej FDCP-1 z wprowadzonym genem Mcl-1 (FD-M) człowieka, powoduje ograniczenie proliferacji komórek, co zależy od spadku aktywności kinazy Cdk1. Sugeruje się, że za efekt ten odpowiada, występująca w jądrze komórkowym, forma snMcl-1, wiążąca enzym i utrudniająca jego oddziaływanie z cyklina-ami, a zwłaszcza z cyklina B1. Wydaje się, że tworzenie kompleksu snMcl-1/Cdk1 może stanowić dodatkowy sposób regulacji cyklu komórkowego w warunkach prawidłowych. Kolejność zdarzeń zachodzących podczas cyklu komórkowego wydaje się być następująca. Podczas fazy S lub G₂ cyklu dochodzi do proteolizy Mcl-1 o pełnej długości i rozpoczyna się składanie kompleksu snMcl-1/

Cdk1. Najwyższe natężenie proces osiąga na pograniczu faz G₂/M lub we wczesnej mitozie. Natomiast kolejny cykl podziałowy komórek poprzedza rozpad kompleksu oraz zanik formy snMcl-1, degradowanej najprawdopodobniej w proteasomie [8].

Fujise i wsp. [10] donieśli o oddziaływaniu Mcl-1 z białkiem regulatorowym cyklu komórkowego – PCNA (ang. *proliferating-cell nuclear antigen*). Białko PCNA pełni dwojaką funkcję w jądrze komórkowym, tj. 1° służy jako kofaktor polimerazy δ DNA oraz 2° moduluje aktywność innych białek jądrowych, zaangażowanych w prawidłowy przebieg replikacji DNA, np. czynnika replikacji – RF-C (ang. *replication factor-C*) i endonukleazy Fen-1 (ang. *flap endonuclease-1*) [63]. Wiązanie PCNA z białkiem Mcl-1 uniemożliwia złożenie tzw. dużego kompleksu jądrowego (kompleks RF-C-PCNA), niezbędnego do zainicjowania replikacji przez polimerazę δ DNA i blokuje wejście komórki w fazę S cyklu komórkowego. W komórkach HeLa z nadekspresją Mcl-1, po ich transfekcji plazmidem (pEGFP-MCL-1) z wklonowaną częścią cDNA białka oraz genem kodującym fluorescencyjne białko EGFP (ang. *enhanced green fluorescent protein*), odnotowano spadek syntezy DNA i obniżenie o ponad 60% komórek znakowanych bromodeoksyurydyną (BrdU) w porównaniu z komórkami kontrolnymi, zawierającymi jedynie wektor pEGFP [10]. Okazało się, że w oddziaływaniu Mcl-1-PCNA uczestniczy charakterystyczny motyw białka Mcl-1 wiążący PCNA, którego brak w cząsteczkach innych członków rodziny Bcl-2. Motyw ten zawiera 2 zachowawcze reszty glutaminy (Q) i fenyloalaniny (F) rozdzielone 6-

aminokwasową sekwencją (w tym przypadku: RNHETA), po której następuje region bogaty w lizynę. Wprowadzenie mutacji w obrębie powyższego motywu powoduje zmniejszenie (ale nie całkowite zniesienie) zdolności białka do blokowania replikacji DNA; nie wpływa natomiast na funkcje białka związane z regulacją procesu apoptozy.

Dodatkowo, jak już wspomniano wcześniej, białko Mcl-1 poza blokowaniem cyklu komórkowego, wykazuje zdolność oddziaływania z tankirazą I, która w komórkach człowieka inicjuje wydłużanie telomerów – powtarzalnych sekwencji DNA zlokalizowanych na zakończeniach chromosomów [23]. Enzym ten wpływa na elongację telomerów wskutek ADP-rybozylacji białka TRF1 (ang. *telomeric repeat binding factor-1*). Białko Mcl-1, współzawodnicząc z TRF1 o miejsce wiązania w domenie ankirynowej cząsteczki tankirazy I, blokuje syntezę telomerów i sprzyja procesowi starzenia się komórek.

Funkcjonowanie białka Mcl-1, zarówno jako inhibitora apoptozy i regulatora cyklu komórkowego, może mieć istotne znaczenie zwłaszcza w komórkach poddanych działaniu czynników uszkadzających DNA, takich jak promieniowanie jonizujące. W warunkach tych znacząco wzrasta ekspresja *Mcl-1*, co może z jednej strony – blokować cykl komórkowy i uniemożliwiać replikację DNA, a z drugiej – zapobiegać apoptozie i utrzymywać komórki przy życiu do momentu zakończenia naprawy ich materiału genetycznego [10]. Wzrost syntezy *Mcl-1* w komórkach nowotworowych może znosić potencjalne korzyści płynące z radioterapii. Zaobserwowano, że średnia długości przeżycia pacjentów z rakiem jelita grubego obniżyła się w grupie chorych poddanych działaniu promieniowania jonizacyjnego przed usunięciem guza. W komórkach nowotworowych osób poddanych radioterapii wykazano wzrost ekspresji *Mcl-1* [64]. Wysoki poziom *Mcl-1* w komórkach transformowanych wydaje się być czynnikiem prognostycznym, świadczącym o złym rokowaniu w wielu typach nowotworów [64-66].

POZIOM EKSPRESJI GENU KODUJĄCEGO MCL-1 JAKO POTENCJALNY WSKAŹNIK PROGRESJI I PRZEWIDYWANIA SKUTECZNOŚCI LECZENIA

Liczne doniesienia wskazują na białko Mcl-1 jako krytyczny czynnik sprzyjający przeżyciu komórek nowotworowych. Nadekspresja genu kodującego ten inhibitor śmierci w komórkach transgenicznych myszy indukuje nowotworzenie, zaś brak syntezy *Mcl-1* – uwrażliwia komórki na działanie czynników apoptogennych [9,29]. Wysoką ekspresję genu *Mcl-1* stwierdza się we wszystkich liniach komórkowych szpiczaków człowieka [65]. Wykazano ponadto, że konstytutywna ekspresja genu *Mcl-1* w komórkach szpiczaka z wprowadzonym genem *hMcl-1* działa ochronnie na komórki plazmatyczne, zmniejszając ich wymagania w stosunku do IL-6 i obniżając poziom apoptozy wywołany brakiem tej cytokiny [24]. Uważa się, że to *Mcl-1*, a nie *Bcl-2*, odgrywa także główną rolę w przeżyciu komórek białaczkowych linii B [65].

Wyniki doświadczeń sugerują, że poziom *Mcl-1* może decydować o stopniu zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej. Nadekspresję tego białka opisano w przy-

padku raka jelita z przerzutami do wątroby, jak również w zaawansowanych stadiach nerwiaka płodowego (ang. *neuroblastoma*) [54,67]. Z kolei u pacjentów z chłoniakiem z komórek płaszczka (ang. *mantle cell lymphoma; MCL*) agresywne stadium choroby charakteryzuje się najwyższą syntezą tego antyapoptotycznego białka. Natomiast w przypadku przewlekłej białaczki limfocytowej (ang. *chronic lymphocytic leukemia; CLL*) wysoki poziom *Mcl-1* obserwuje się w komórkach pacjentów w stadium „0” wg klasyfikacji Rai’a [29]. W dalszych stadiach choroby następuje spadek syntezy tego białka, świadczący o spontanicznej lub indukowanej lekami apoptozie komórek nowotworowych. Z kolei obserwacja wzrostu syntezy *Mcl-1* może również wynikać z nabycia przez komórki oporności. Wysoki poziom *Mcl-1* w wielu nowotworach uznaje się za niekorzystny czynnik prognostyczny, związany z opornością pacjentów na leczenie i z nawrotami choroby nowotworowej, m.in. w rakach jajnika, żołądka, prostaty czy w chłoniakach [9,20,54,65,66,68]. Szacowane „wyleczenie” w przypadku raka żołądka wynosiło u pacjentów z pozytywną i negatywną ekspresją *Mcl-1*, odpowiednio, 52,5% i 73,7% [66]. W przypadku pacjentów z ostrą białaczką szpiczkową (AML, ang. *acute myeloid leukemia*) i limfocytową (ALL, ang. *acute lymphocytic leukemia*) nawrót choroby odnotowuje się często u osób z najwyższym poziomem *Mcl-1* w komórkach białaczkowych [29]. Ponadto, uważa się, że *Mcl-1* może zmniejszać wrażliwość na terapię z zastosowaniem fludarabiny lub chlorambucylu u pacjentów z CLL. Wyniki doświadczeń *in vitro* z zastosowaniem transfekcji, prowadzącej do uzyskania komórek o zwiększonej ekspresji *Mcl-1*, potwierdzają nabycie przez nie oporności na etopozyd czy promieniowanie, a wzrost syntezy tego białka w komórkach nerki linii HEK 293 czyni je niewrażliwymi na działanie TRAIL (ang. *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) [29].

Obiecująco przedstawiają się wyniki prac *in vitro* wykorzystujące selektywne hamowanie ekspresji genu kodującego białko *Mcl-1* za pomocą modyfikowanych chemicznie antysensowych oligonukleotydów (ASO) w komórkach białaczkowych czy komórkach czerniaka, chociaż jak dotąd nie zostały podjęte próby ich zastosowania w badaniach klinicznych [6,48,54,69,70]. Wykazano, że spadek ekspresji *Mcl-1* po zastosowaniu ASO uwrażliwia komórki na działanie kolejnych chemioterapeutyków, takich jak *cis*-platyna [54], deksametazon [29], doksrubicyna, etopozyd [71] czy dekarbazyna [6]. W przypadku komórek raka wątroby (ang. *hepatocellular carcinoma; HCC*) linii HepG2 i Snu 398 zaobserwowano, że samo obniżenie ekspresji *Mcl-1*, występujące po zastosowaniu ASO, może wywoływać spontaniczną apoptozę tych komórek nowotworowych wskutek zaburzenia równowagi pomiędzy białkami pro- i antyapoptotycznymi [54].

Dużym zainteresowaniem cieszą się także substancje będące potencjalnymi induktorami, zależnego od kaspaz, proteolitycznego rozszczepienia *Mcl-1*. W opinii badaczy [24,72] czynniki te mogłyby być zastosowane w terapii CLL i innych nowotworów hematopoetycznych, jak szpiczak mnogi i różnego typu chłoniaki. Podejmowane są również próby zmniejszenia poziomu *Mcl-1* przez zastosowanie związków neutralizujących aktywność IL-6 lub inhibitorów PKB/Akt, które *in vitro* są zdolne obniżyć zarówno syntezę

opisywanego białka, jak i przyspieszać jego degradację. Wykazano, że związki te znacząco obniżają oporność komórek raka przewodów żółciowych (ang. *cholangiocellular carcinoma*, CCC) na działanie TRAIL. W podobny sposób mogłyby także uwrażliwiać komórki nowotworowe na konwencjonalne terapie [48].

Białka z podrodziny Bcl-2 „BH3-only”, takie jak Bim czy Puma, charakteryzują się potencjałem wiązania i neutralizowania wszystkich antyapoptotycznych członków rodziny Bcl-2, co niesie nadzieję, że te biocząsteczki mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób związanych z zaburzeniami procesu apoptozy [73]. Wydaje się, że białko NOXA o wysokiej specyficzności może służyć jako prototyp leków, selektywnie wiążących Mcl-1 w głównej mierze odpowiedzialny m.in. za rozwój szpiczaka mnogiego (MM, ang. *multiple myeloma*). Obniżenie poziomu białka Mcl-1 u pacjentów z różnymi nowotworami mogłoby przynieść istotny wzrost skuteczności ich leczenia, stąd białko Mcl-1 uważane jest za nowy cel działania dla leków przeciwnowotworowych i terapii antysensowej [9,74].

UWAGI KOŃCOWE

Przedstawione w pracy przeglądowej dane wskazują na złożoną aktywność białka Mcl-1. W komórkach prawidłowych blokowanie śmierci przez białko Mcl-1 wydaje się być procesem krótkotrwałym, umożliwiającym ich przetrwanie w niekorzystnych warunkach lub przejście przez pewien krytyczny dla nich etap rozwoju. Z kolei, równoczesne hamowanie elongacji telomerów przez Mcl-1 może stanowić dodatkowy mechanizm zapobiegający uniesmiertelnieniu komórek. Wydaje się możliwe, że w szczególnych warunkach środowiskowych może dojść do zaburzeń prowadzących do pojawienia się fenotypu komórek o przedłużonym okresie przeżycia lub komórek immortalizowanych, które w kolejnym etapie mogą ulec transformacji nowotworowej [20]. Dotychczas opublikowano wiele danych nie pozostawiających wątpliwości, że nieprawidłowy przebieg apoptozy, spowodowany nadekspresją genu antyapoptotycznego białka Mcl-1, jest związany z wieloma chorobami, w tym nowotworowymi. Nadekspresja *Mcl-1* u mysz transgenicznnych prowadzi do pojawienia się chłoniaka [75]. Wysoki poziom Mcl-1 odnotowano w licznych nowotworach, co wskazuje, że analiza jego poziomu może być użyteczna jako marker prognostyczny. Ponadto białko to wydaje się być atrakcyjnym celem dla leków przeciwnowotworowych, szczególnie dla tych grup związków, które mogą oddziaływać z domenami BH, obecnie dość dobrze scharakteryzowanymi. Podobnie, celem terapeutycznym tego niezwykłego białka mogą się okazać leki przeciwpalne, przeciwwirusowe czy przeciwbakteryjne w chorobach, w których przyczynia się ono do ograniczenia procesu apoptozy.

PIŚMIENNICTWO

1. Kiliańska ZM (2002) Apoptoza organizmów zwierzęcych, W: Kły-szejko-Stefanowicz L (red) Cytobiochemia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 772-815
2. Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW (1993) MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3516-3520
3. Akgul C, Turner PC, White MRH, Edwards SW (2000) Functional analysis of the human *MCL-1* gene. *Cell Mol Life Sci* 57: 684-691

4. Bingle CD, Craig RW, Swales BM, Singleton V, Zhou P, Whyte MKB (2000) Exon skipping in Mcl-1 results in a Bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J Biol Chem* 275: 22136-22146
5. Rieber M, Medina JD, Strasberg-Rieber M (2002) Relationship of Mcl-1 isoforms, ratio p21WAF1/cyclin A, and Jun kinase phosphorylation to apoptosis in human breast carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 943-949
6. Han J, Goldstein LA, Gastman BR, Froelich CJ, Yin X-M, Rabinowich H (2004) Degradation of Mcl-1 by granzyme B. *J Biol Chem* 279: 22020-22029
7. Mori M, Burgess DL, Gefrides LA, Foreman PJ, Opferman JT, Korsmeyer SJ, Cavaliheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MdG, Noebels JL (2004) Expression of apoptosis inhibitor protein Mcl1 linked to neuroprotection in CNS neurons. *Cell Death Differ* 11: 1223-1233
8. Jamil S, Sobouti R, Hojabrpour P, Raj M, Kast J, Duronio V (2005) A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *Biochem J* 387: 659-667
9. Michels J, Johnson PWM, Packham G (2005) Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 267-271
10. Fujise K, Zhang D, Liu J-I, Yeh ETH (2000) Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. *J Biol Chem* 275: 39458-39465
11. Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X (2003) Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 17: 1475-1486
12. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228: 1440-1443
13. Matsushita K, Okita H, Suzuki A, Shimoda K, Fukuma M, Yamada T, Urano F, Honda T, Sano M, Iwanaga S, Ogawa S, Hata J, Umezawa A (2003) Islet cell hyperplasia in transgenic mice overexpressing EAT/mcl-1, a bcl-2 related gene. *Mol Cell Endocrinol* 203: 105-116
14. Yang T, Kozopas KM, Craig RW (1995) The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J Cell Biol* 128: 1173-1184
15. Li F, Zhang D, Fujise K (2001) Characterization of fortilin, a novel anti-apoptotic protein. *J Biol Chem* 276: 47542-47549
16. Zhang D, Li F, Weidner D, Mnjayan ZH, Fujise K (2002) Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and fortilin. *J Biol Chem* 277: 37430-37438
17. Liu H, Peng H-W, Cheng Y-S, Yuan HS, Yang-Yen H-F (2005) Stabilization of enhancement of the antiapoptotic activity of Mcl-1 by TCTP. *Mol Cell Biol* 25: 3117-3126
18. Chou C-H, Lee R-S, Yang-Yen H-F (2006) An international EELD domain facilitates mitochondrial targeting of Mcl-1 via Tom70-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 17: 3952-3963
19. Yang-Yen H-F (2006) Mcl-1: a highly regulated cell death and survival controller. *J Biomed Sci* 13: 201-204
20. Craig RW (2002) MCL1 provides a window on the role of BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* 16: 444-454
21. Thorbecke GJ, Amin AR, Tsiagbe VK (1994) Biology of germinal centers in lymphoid tissue. *FASEB J* 8: 832-840
22. Krajewski S, Bodrug S, Krajewska M, Shabaik A, Gascoyne R, Bevan K, Reed JC (1995) Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am J Pathol* 146: 1309-1319
23. Bae J, Donigian JR, Hsueh AJW (2003) Tankyrase 1 interacts with Mcl-1 proteins and inhibits their regulation of apoptosis. *J Biol Chem* 278: 5195-5204
24. Jourdan M, Veyrone J-L, De Vos J, Redal N, Couderc G, Klein B (2003) A major role Mcl-1 antiapoptotic protein in the IL-6-induced survival of human myeloma cells. *Oncogene* 22: 2950-2959
25. Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ (2003) Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 426: 671-676

26. Townsend KJ, Zhou P, Qian L, Bieszczađ CK, Lowrey CH, Yen A, Craig RW (1999) Regulation of *MCL1* through a serum response factor/Elk-1-mediated mechanism links expression of a viability-promoting member of the *BCL2* family to the induction of hematopoietic cell differentiation. *J Biol Chem* 274: 1801-1813
27. Araki T, Hayashi M, Watanabe N, Kanuka H, Yoshino J, Miura M, Saruta T (2002) Down-regulation of Mcl-1 by inhibition of the PI3K-Akt Pathway is required for cell shrinkage-dependent cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 1275-1281
28. Liu H, Ma Y, Cole SM, Zander C, Chen K-H, Karras J, Pope RM (2003) Serine phosphorylation of STAT is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival. *Blood* 102: 344-352
29. Johnston JB, Paul JT, Neufeld NJ, Haney N, Kropp DM, Hu X, Cheang M, Gibson SB (2004) Role of myeloid cell factor-1 (Mcl-1) in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 45: 2017-2027
30. Wang J-M, Chao J-R, Chen W, Kuo M-L, Yen JY-Y, Yang-Yen H-F (1999) The antiapoptotic gene *mcl-1* is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol* 19: 6195-6206
31. Iglesias-Serret D, Pique M, Gil J, Pons G, Lopez JM (2003) Transcriptional and translational control of Mcl-1 during apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 417: 141-152
32. Chao J-R, Wang J-M, Lee S-F, Peng H-W, Lin Y-H, Chou C-H, Li J-C, Huang H-M, Chou C-K, Kuo M-L, Yen JJ-Y, Yang-Yen H-F (1998) *Mcl-1* is an immediate-early gene activated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) signalling pathway and is one component of the GM-CSF viability response. *Mol Cell Biol* 18: 4883-4898
33. Sitailo LA, Tibudan SS, Denning MF (2006) The protein kinase C δ catalytic fragment targets Mcl-1 for degradation to trigger apoptosis. *J Biol Chem* 281: 29703-19710
34. Clohessy JG, Zhuang J, Brady HJM (2004) Characterisation of Mcl-1 cleavage during apoptosis of haematopoietic cells. *Br J Haematol* 125: 655-665
35. Warr MR, Acoca S, Liu Z, Germain M, Watson M, Blanchette M, Wing SS, Shore GC (2005) BH3-ligand regulates access of MCL-1 to its E3 ligase. *FEBS Lett* 579: 5603-5608
36. Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X (2005) Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 121: 963-965
37. Chen D, Brooks CL, Gu W (2006) ARF-BP1 as a potential therapeutic target. *Br J Cancer* 94: 1555-1558
38. Shmueli A, Oren M (2005) Life, death, and ubiquitin: taming the mule. *Cell* 121: 963-965
39. Mel Y, Du W, Yang Y, Wu M (2005) Puma(*)Mcl-1 interaction is not sufficient to prevent rapid degradation of Mcl-1. *Oncogene* 24: 7224-7237
40. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DCS (2005) Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-X_L, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 19: 1294-1305
41. Cuconati A, Mukherjee C, Perez D, White E (2003) DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev* 17: 2922-32
42. Denning MF, Wang Y, Nickoloff BJ, Wrone-Smith T (1998) Protein kinase C δ is activated by caspase-dependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of human keratinocytes. *J Biol Chem* 273: 29995-30002
43. Domina AM, Smith JH, Craig RW (2000) Myeloid cell leukemia 1 is phosphorylated through two distinct pathways, one associated with extracellular signal-regulated kinase activation and the other with G_s/M accumulation or protein phosphatase 1/2 A inhibition. *J Biol Chem* 275: 21688-21694
44. Kato T, Kutsuna H, Oshitani N, Kitagawa S (2006) Cyclic AMP delays neutrophil apoptosis via stabilization of Mcl-1. *FEBS Lett* 580: 4582-4586
45. Opferman JT (2006) Unraveling MCL-1 degradation. *Cell Death Differ* 13: 1260-1262
46. Inoshita S, Takeda K, Hatai T, Terada Y, Sano M, Hata J, Umezawa A, Ichijo H (2002) Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 277: 43730-43734
47. Herrant M, Jacquel A, Marchetti S, Belhacène N, Colosetti P, Luciano F, Auberger P (2004) Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis. *Oncogene* 23: 7863-7873
48. Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ (2005) Interleukin-6 contributes to Mcl-1 upregulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* 128: 2054-2065
49. Umezawa A, Maruyama T, Inazawa J, Imai S, Takano T, Hata J (1996) Induction of *mcl1/EAT*, Bcl-2 related gene, by retinoic acid or heat shock in the human embryonal carcinoma cells, NCR-G3. *Cell Struct Funct* 21: 143-50
50. Sano M, Umezawa A, Suzuki A, Shimoda K, Fukuma M, Hata J (2000) Involvement of EAT/*mcl-1*, an anti-apoptotic bcl-1-related gene, in murine embryogenesis and human development. *Exp Cell Res* 259: 127-139
51. Rinkenberger JL, Horning S, Klocke B, Roth K, Korsmeyer SJ (2000) Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev* 14: 23-27
52. Zinkel S, Gross A, Yang E (2006) BCL-2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* 13: 1351-1359
53. Clohessy JG, Zhuang J, de Boer J, Gil-Gómez G, Brady HJM (2006) Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 281: 5750-5759
54. Sieghart W, Losert D, Strommer S, Cejka D, Schmid K, Rasoul-Rockenschau S, Bodingbauer M, Crevenna R, Monia BP, Peck-Radosavljevic M, Wacheck V (2006) Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy. *J Hepatol* 44: 151-157
55. Bednarek J, Kiliańska ZM (2005) Białka przestrzeni międzybłonowej mitochondriów uczestniczące w procesie apoptozy. *Postepy Biochem* 51: 447-458
56. Day CL, Chen L, Richardson SJ, Harrison PJ, Huang DCS, Hinds MG (2004) Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands. *J Biol Chem* 280: 4738-4744
57. Alves NL, Derks IAM, Berk E, Spijker R, van Lier RAW, Eldering E (2006) The NOXA/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells. *Immunity* 24: 703-716
58. Alves NL, van Lier RA, Eldering E (2007) Withdrawal symptoms on display: Bcl-2 members under investigation. *Trends Immunol* 28: 26-32
59. Willis SN, Adams JM (2005) Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17: 617-625
60. Minet E, Cosse J-P, Demazy C, Raes M, Michiels C (2006) Accumulation of the pro-apoptotic factor Bak is controlled by antagonist factor Mcl-1 availability. *Apoptosis* 11: 1039-1047
61. Bonnefoy-Berard N, Aouacheria A, Verschelde C, Quemeneur L, Marçais A, Marvel J (2004) Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* 1644: 159-168
62. Linette GP, Li Y, Roth K, Korsmeyer SJ (1996) Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9545-9552
63. Graidist P, Phongdara A, Fujise K (2004) Antiapoptotic protein partners fortillin and MCL1 independently protect cells from 5-fluorouracil-induced cytotoxicity. *J Biol Chem* 279: 40868-40875
64. Ulrich-Pur H, Erovic BM, Soleiman A, Jech B, Pennwieser W, Czembirek C, Zielinski CC, Thurnher D (2005) Changes in Mcl-1 expression in rectal cancer in relation to neo-adjuvant radiotherapy. *Wien Klin Wochenschr* 117: 136-140
65. Shigemasa K, Katoh O, Shiroyama Y, Mihara S, Mukai K, Nagai N, Ohama K (2002) Increased MCL-1 expression is associated with poor prognosis in ovarian carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 93: 542-550

66. Maeta Y, Tsujitani S, Matsumoto S, Yamaguchi K, Tatebe S, Kondo A, Ikeguchi M, Kaibara N (2004) Expression of Mcl-1 and p53 proteins predicts the survival of patients with T3 gastric carcinoma. *Gastric Cancer* 7: 78-84
67. Abel F, Sjöberg R-M, Nilsson S, Kogner P, Martinsson T (2005) Imbalance of the mitochondrial pro- and anti-apoptotic mediators in neuroblastoma tumours with unfavourable biology. *Eur J Cancer* 41: 635-646
68. Pfeil K, Eder IE, Bektic J, Huebl H, Pycha A, Schaefer G, Rogatsch H, Bartsch G, Klocker H (2004) Overexpression of the anti-apoptotic protein Mcl-1 is an early event in prostate cancer. *Eur Urol (Suppl 3)*: 24
69. Moulding DA, Giles RV, Spiller DG, White MRH, Tidd DM, Edwards SW (2000) Apoptosis is rapidly triggered by antisense depletion of MCL-1 in differentiating U937 cells. *Blood* 96: 1756-1763
70. Stahel RA, Zangemeister-Wittke U (2003) Antisense oligonucleotides for cancer therapy—an overview. *Lung Cancer* 41: 581-588
71. Haura EB, Song L, Karras J, Lee H (2003) Mcl-1 is a survival factor lung cancer. *Lung Cancer* 41 (Suppl. 2): 75
72. Puthier D, Thabard W, Rapp M, Etrillard M, Harousseau J, Bataille R, Amiot M (2001) Interferon alpha extends the survival of human myeloma cells through an upregulation of the Mcl-1 anti-apoptotic molecule. *Br J Haematol* 112: 358-363
73. Chen L, Willi SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Dolman PM, Day CL, Adams JM, Huang DCS (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17: 393-403
74. Derenne S, Monia B, Dean NM, Taylor JK, Rapp M-J, Harousseau J-L, Bataille R, Amiot M (2002) Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-X_L is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* 100: 194-199
75. Zhou P, Levy NB, Xie H, Qian L, Lee CY, Gascoyne RD, Craig RW (2001) MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. *Blood* 97: 3902-3909

New face of antiapoptotic proteins. I. Protein Mcl-1

Jolanta Bednarek¹, Józefa Węsierska-Gądek², Zofia M. Kiliańska¹✉

¹Department of Cytobiochemistry, University of Lodz, 12/16 Banacha St., 90-237 Lodz, Poland

²Cell Cycle Regulation Group, Institute of Cancer Research, Department of Medicine I, Medical University of Vienna, Borschkegasse 8 a, A-1090 Vienna, Austria

✉e-mail: zkilian@biol.uni.lodz.pl

Key words: apoptosis, Bcl-2 family, Mcl-1, cell cycle, carcinogenesis

ABSTRACT

Main regulators of apoptosis belong to Bcl-2 protein family and apoptosis inhibitory proteins – IAPs. In this review the apoptosis inhibitor – Mcl-1 protein is profoundly characterized. It is important that this unique short-living protein – the member of Bcl-2 family may also operate as apoptosis promoting agent, which results of alternative splicing of its pre-mRNA, posttranslational modifications or proteolysis. The review presents also other functions of Mcl-1, i.e. involvement in cell cycle regulation, elongation of telomers. Elevated expression of Mcl-1 accompanies the development of various cancers, neurodegenerative disorders and also infectious diseases. The obtained results indicate that expression level of Mcl-1 may be useful in treatment decisions of large number of diseases. Ablating expression of this protein may be an attractive therapeutic strategy in the treatment of various cancers, and the diseases where Mcl-1 may play a key role in apoptosis suppression.

STRESZCZENIE

Surwiwina (m.cz. 16,5 kDa, pI 5,1) należy do rodziny IAPs (ang. *inhibitory apoptosis proteins*) – białek hamujących apoptozę. W strukturze surwiwiny człowieka znajduje się N-końcowa domena BIR, połączona regionem łącznikowym z C-końcową, α -helikalną domeną oddziałującą z mikrotubulami. Domena BIR tego białka jest związana z aktywnością antyapoptotyczną i wiązaniem kompleksu białek pasażerskich (CPC ang. *chromosomal passenger complex*) do regionów centromerowych chromosomów. Gen *surwiwiny*, ulegając ekspresji na drodze alternatywnego składania jego pierwotnych transkryptów, dostarcza, obok formy dzikiej (142 aa), czterech izoform tego białka. W pracy przeglądowej przedstawiono budowę domenową i funkcje surwiwiny w procesie apoptozy, cyklu komórkowym i nowotworzeniu oraz znaczenie tego białka jako potencjalnego markera nowotworowego. Ponadto, zasygnalizowano rozwój nowych strategii terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem surwiwiny.

WPROWADZENIE

W bieżącym roku mija dekada od wykrycia surwiwiny. Białko to zidentyfikowano w laboratorium Dario C. Altieriego [1] z University of Massachusetts, Worcester (USA). Surwiwina nieprzerwanie wzbudza duże zainteresowanie, gdyż ulega ekspresji/nadekspresji głównie w komórkach nowotworowych. Jej obecność wykrywa się w komórkach embrionalnych, aktywnie namnażających się, natomiast komórki prawidłowe ostatecznie zróżnicowane, stare cechuje słaba ekspresja lub jej brak [1-2]. Nazwę surwiwina (ang. *survive* – przeżywać) nadano białku jako wyraz jego unikatowej właściwości – zapobieganiu śmierci programowanej. Ten inhibitor apoptozy zaliczono do rodziny IAP_s (ang. *inhibitory apoptosis proteins*), dzięki pierwotnie poznanej funkcji – hamowaniu apoptozy oraz obecności w jego strukturze, zachowanej w ewolucji, domeny – BIR (ang. *baculovirus IAP repeat*). Dość szybko okazało się, że opisywany przedstawiciel rodziny IAP wykazuje również inną ważną cechę – zdolność do regulacji podziałów komórkowych [3-6]. Pełnienie wyżej wymienionych, głównych funkcji, umożliwia surwiwinie jej lokalizacja. W komórkach prawidłowych to niskocząsteczkowe, kwaśne białko (m.cz. 16,5 kDa, pI 5,1) występuje jako partner tzw. chromosomowego kompleksu pasażerskiego (CPC, ang. *chromosomal passenger complex*) [7-10]. Surwiwina jest wykrywana jako składnik CPC w różnych obszarach aparatu mitotycznego, uczestniczy w segregacji chromatyd podczas mitozy, poruszaniu się chromosomów podczas podziału komórkowego, cytokinezie. W aktywnie namnażających się komórkach ekspresja surwiwiny jest praktycznie niewykrywalna w fazach G₁ i S; osiąga wysoki poziom na pograniczu faz cyklu – G₂/M [11,12].

Dohi i wsp. [13] sugerują, że surwiwina reprezentuje także białko przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, z której wypływa do cytosolu w wyniku sygnału śmierci, zapobiegając aktywacji kaspazy-9. Cytowani badacze postulują, że tylko surwiwina uwolniona czynnikami apoptotycznymi z mitochondriów, a nie jej pula, która może ulec ekspresji przed zadziałaniem sygnału śmierci, może hamować apoptozę.

Zagadnienie udziału surwiwiny w przebiegu mitozy przedstawiono ostatnio szeroko na łamach *Postępów Biochemii* [14].

SURWIWINA – UNIKATOWY PRZEDSTAWICIEL RODZINY IAP

Geny, których ekspresja dostarcza białek o naturze inhibitorów apoptozy wykryto po raz pierwszy w genomie bakulowirusów owadów [15]. Białka IAP okazały się czynnikami hamującymi aktywność kaspaz i chroniącymi zakażone komórki gospodarza przed śmiercią (np. białko p35, crmA, ang. *cytokine response modifier A*) [16,17]. Lawinowo ukazujące się doniesienia wykazały, że homologii

Józefa Węsierska-Gądek¹

Jolanta Bednarek²

Zofia M. Kiliańska^{2,✉}

¹Cell Cycle Regulation Group, Institute of Cancer Research, Department of Medicine I, Medical University of Vienna, Vienna, Austria
²Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź

✉Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego, ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; tel.: (042) 635 43 35, e-mail: zkilian@biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 4 czerwca 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 18 lipca 2007 r.

Słowa kluczowe: apoptoza, białka rodziny IAP, surwiwina, cykl komórkowy, nowotworzenie

Wykaz skrótów: aa – aminokwas; Apaf-1 (ang. *apoptosis protease activating factor-1*); BIR (ang. *baculoviral inhibitor of apoptosis*); CARD (ang. *caspase recruitment domain*); CPC (ang. *chromosomal passenger complex*); IAP (ang. *inhibitory apoptosis protein*); RING (ang. *really interesting gene*); Smac/DIABLO (ang. *second mitochondrial activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI*); tBid (ang. *truncated BH3 interacting domain death agonist*); XBXP (ang. *hepatitis B X-interacting protein*); XIAP (ang. *X-linked inhibitory apoptosis protein*)

Podziękowanie: Praca powstała w trakcie realizacji projektu 003/2006/2007 w ramach współpracy polsko-austriackiej

wirusowych inhibitorów apoptozy występują powszechnie zarówno u bezkręgowców, jak i kręgowców [18-20]. Dotychczas u człowieka zidentyfikowano ośmiu przedstawicieli rodziny IAP. W strukturze tych białek występują, zachowane w ewolucji, domeny BIR, które mogą być reprezentowane pojedynczo (np. ML-IAP/liwina czy surwiwina) bądź powtórzone trzykrotnie (np. XIAP/ILP-1; Ryc. 1).

W domenach BIR (o długości ok. 70–80 aa) wyróżnia się 65-aminokwasowy rdzeń, zawierający cztery odcinki α heliksowe i trzy o strukturze harmonijki β . W N-końcu domeny znajduje się, zachowana w ewolucji, reszta argininy, uznana za kluczową w związaniu białek, oraz w środkowej części – zachowana w ewolucji glicyna. W C-końcowym odcinku BIR, poznanych dotąd IAP, występuje motyw $CX_2C-X_{16}HX_3-C$ niezbędny w wiązaniu jonu Zn^{+2} . Domeny BIR surwiwiny i BRUCE/apollon (należące do tzw. II typu BIR) cechuje obecność dodatkowych trzech aminokwasów, tj. Cys-Pro-Thr (surwiwina) i Cys-Pro-Ala (BRUCE) [8,19].

W C-końcu cząsteczki niektóre IAP zawierają, zachowaną w ewolucji, domenę RING (ang. *really interesting new gene*). Motyw ten, o naturze palca cynkowego (wiąże 2 jony Zn^{+2}), wykazuje aktywność ligazy ubikwityny E3. Pewne IAP (np. cIAP-1 i cIAP-2) wyposażone są dodatkowo w domenę CARD (ang. *caspase recruitment domain*) lub UBC (ang. *ubiquitin conjugating*) (np. białko BRUCE/apollon), które są istotne w oddziaływaniach białko - białko [19-20]. Domena BIR jest motywem decydującym o zaliczeniu białka do IAP, stąd w niektórych pracach stosowany jest dla nich symbol BIRPs (ang. *BIR-containing proteins*) [19]. Z kolei obecność lub brak domeny RING oraz homologia domen BIR (BIR1–3; typ I/II BIR) stała się podstawą podziału rodziny IAP na trzy podrodziny/klassy [20]. Podrodzina pierwsza obejmuje pięć białek, w budowie których występuje motyw RING oraz jedna lub trzy domeny BIR. Są to: XIAP/ILP-1 (ang. *X-linked IAP*), cIAP-1, cIAP-2 (ang. *cellular IAP-1, IAP-2*), liwina/ML-IAP i ILP-2 (ang. *IAP like protein-2*). Podrodzina druga jest reprezentowana przez NAIP (ang. *neuronal apoptosis inhibitory protein*), białko, które w strukturze zawiera trzy domeny BIR, ale pozbawione jest domeny RING. Podrodzina trzecia, w której opisano dwa białka, tj. surwiwinę i BRUCE/apollon (ang. *BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme*). Białka te różnią się znacząco długością

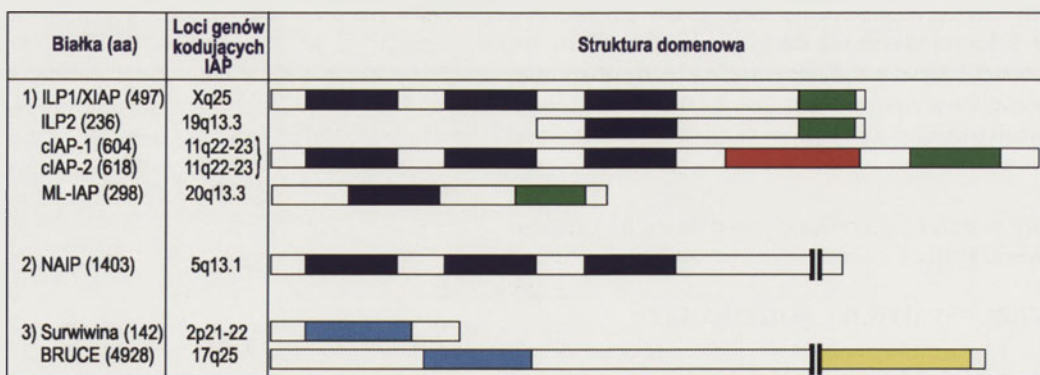
i masą cząsteczkową (16,5 i 528 kDa); cechuje je obecność pojedynczej domeny BIR oraz brak domeny RING.

Białka opisywanej rodziny stanowią składniki komórkowe o zachowanej w ewolucji strukturze; większość z nich okazuje zdolność do hamowania apoptozy poprzez oddziaływanie z kaspazami, aczkolwiek mechanizm/y te nie są wciąż w pełni poznane. Aktywność białek IAP wiąże się bądź z ich bezpośrednim oddziaływaniem z kaspazami, bądź z udziałem innych biocząsteczek, które pośredniczą w rozpoznawaniu tych enzymów i w ich proteosomalnej degradacji [18,21-24].

Szersze omówienie właściwości i funkcji białek IAP można odnaleźć w obszernych pracach przeglądowych [10,20]. Akceptuje się pogląd, że domena BIR surwiwiny i BRUCE (42% homologii), opisywana jako domena BIR typu II (nieco dłuższa niż inne BIR), obok odgrywanej roli w hamowaniu śmierci programowanej, jest istotna dla przebiegu podziałów komórkowych [10,25].

STRUKTURA GENU I BIAŁKA, IZOFORMY, LOKALIZACJA

Locus genu kodującego surwiwinę człowieka usytuowany jest na chromosomie 17 w regionie telomerowym (17q25) [1]. Gen ten, opisywany również symbolem *Birc5*, o długości ok. 15 kpz, budują cztery eksony (odpowiednio 111, 110, 118 i 87 pz) przedzielone trzema intronami. Otwarta ramka odczytu, o długości 426 pz, koduje łańcuch polipeptydowy o 142 aa [26]. Gen kodujący surwiwinę jest zachowawczy ewolucyjnie [27]; zidentyfikowano go przez hybrydyzację cDNA kodującego inne białko – EPR-1 (ang. *effector cell protease receptor-1*) [1,2]. Otwarta ramka odczytu dla surwiwiny okazała się zawierać sekwencje w odwrotnej orientacji dla tych, kodujących wspomniany receptor. Promotor minimalny tego genu (ok. 250 nukleotydów) znajduje się w niemetylowanej wyspie CpG; należy do pozbawionych kasety TATA promotorów i zawiera kilka miejsc wiązania czynnika transkrypcyjnego SP1. Aktywność genu *surwiwiny* jest hamowana przez produkty genów supresorowych – białko p53 [28] i Rb [29], a aktywowana przez czynnik transkrypcyjny E2F1 [30]. Białko kodowane przez *Rb* może hamować aktywność genu *surwiwiny*, wiążąc się bezpośrednio do jego promotora, bądź może hamować ekspresję *surwiwiny* w sposób pośredni, zapobiegając wiązaniu E2F1 z jej promotorem. Wyniki doświadczeń wykorzystujących ukierunkowaną mutagenezę wykazały, że miejsca wiązania czynnika E2F i p53 nakładają się na promotor genu kodującego *surwiwinę*, stąd produkt genu supresorowego *p53* może ograniczać ekspresję *surwiwiny* przez hamowanie E2F [30]. Szersze aspekty regulacji genu *surwiwiny* zostaną omówione w rozdziale



Domeny funkcjonalne: ■ BIR (typu I), ■ BIR (typu II), ■ RING, ■ CARD, ■ UBC

Rycina 1. Schematyczne przedstawienie struktury domenowej białek rodziny IAP u ssaków z ich podziałem na 3 podrodziny (przygotowano na podstawie [10,20]). Na rycinie podano ponadto długość łańcuchów poszczególnych białek oraz usytuowanie kodujących je genów na chromosomach człowieka.

dotyczącym jego nadekspresji w komórkach nowotworowych.

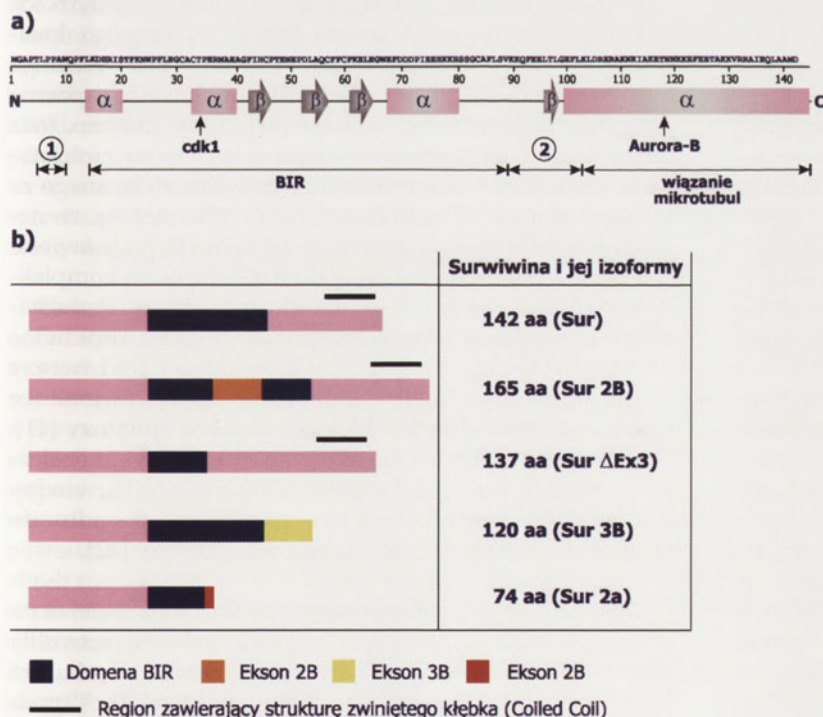
Analiza krystalograficzna ujawniła, że surwiwina występuje jako homodimer, w którym dwie domeny BIR tworzą strukturę przyjmującą kształt związanej kokardy (ang. *bow-tie*) [10,31]. W N-końcu łańcucha surwiwiny znajdują się trzy odcinki α -helikalne (reszty aminokwasowe: 14–21; 31–41 i 68–80) i trzy motywy strukturalne o strukturze harmonijki β (reszty: 43–45; 53–58 i 61–64), które wchodzi w skład, zachowanej w ewolucji, domeny BIR (Ryc. 2a), odpowiedzialnej za hamującą aktywność IAP. W opisywanym białku domena ta umieszczona jest między 18–88 aa i cechuje ją obecność czterech reszt wiążących Zn^{2+} , tj. Cys⁵⁷, Cys⁶⁰, His⁷⁷ i Cys⁸⁴, które tworzą palec cynkowy [31,32]. Na podkreślenie zasługuje fakt, że unikatową dla surwiwiny (i BRUCE/apollon) domenę BIR poprzedza pięć reszt aminokwasowych (48–52 aa) z przewagą aminokwasów kwasowych, sterujących w formie „przegubu” (ang. *knuckle*). To szczególnie miejsce stanowi przypuszczalny motyw „dokowania” białek oddziałujących z surwiwiną, np. Smac/DIABLO (ang. *second mitochondrial activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI*) [33]. C-końcowy segment cząsteczki surwiwiny (98–142 aa), który w odróżnieniu od większości IAP nie zawiera domeny RING, stanowi wydłużony amfipatyczny region o strukturze α -helisy, poprzedzony strukturą β harmonijki, który występuje w formie zwiniętego kłęбка. Odcinek ten nie uczestniczy w dimeryzacji białka, rozciągając się poza domenę BIR [31]. Natomiast w tworzeniu dimerów białko to wykorzystuje dwa hydrofobowe odcinki, obejmujące przy N-końcu cząsteczki fragment Leu⁶-Trp¹⁰

i tzw. region łącznikowy, rozciągający się między 89–102 resztą aminokwasową (Ryc. 2a). Wciąż pozostaje sprawą otwartą jak surwiwina, której dimery występują *in vivo* [34], wypełnia swoje funkcje jako inhibitor apoptozy i składnik chromosomowego kompleksu pasażerskiego. Istnieją dowody eksperymentalne, że C-końcowy odcinek tego białka oddziałuje z mikrotubulami [5]. Usunięcie fragmentu genu kodującego C-końcowy α -heliks zapobiega wiązaniu tego przedstawiciela IAP z mikrotubulami [11]. Doświadczenia genetyczne wykazały, że mutacja w kodonie 84 *surwiwiny* (podstawienie cysteiny alaniną; C84A) dostarcza białka, które współzawodniczy z dziką formą surwiwiny w wiązaniu mikrotubul. Wyniki te jednocześnie wykluczyły udział domeny BIR w tych oddziaływaniach. Okazało się ponadto, że taki produkt mutacji genu w komórkach nowotworowych wykazuje aktywność proapoptotyczną [11]. N- i C-koniec białka wiąże region łącznikowy (89–97 aa), który jest istotny dla jego subkomórkowej lokalizacji [32].

Alternatywne składanie *surwiwiny* prowadzi do syntezy pięciu różnych mRNA, które podczas translacji dostarczają formy dzikiej, oraz czterech izoform opisywanych jako: surwiwina-2B, surwiwina- Δ Ex3 [26], surwiwina-3B [35] i ostatnio wykryta – surwiwina-2 α [36] (por. Ryc. 2b). W 1999 r. Mahotka i wsp. [26] zidentyfikowali dwie izoformy, tj. surwiwinę- Δ Ex3 (137 aa) i surwiwinę-2B (165 aa) w liniach komórkowych raka nerki.

Izoforma surwiwiny- Δ Ex3 powstaje jako produkt ekspresji 1, 2 i zmutowanego 4 eksonu, z pominięciem w czasie składania pierwotnego transkryptu eksonu 3. Produkt ekspresji cechuje skrócenie domeny BIR przy 74 reszcie aminokwasowej białka, a C-końcowy 63-aminokwasowy jego odcinek jest produktem zmienionego eksonu 4, który jest wzbogacony o fragment przepisany z 3' UTR. Natomiast surwiwina-2B, najdłuższa z dotychczas opisanych izoform (165 aa), poza informacją płynącą z eksonów 1–4, zostaje wzbogacona o odcinek przepisany z kryptycznego eksonu 2B (o długości 69 pz), który stanowi część intronu 2 i zostaje wstawiony w domenę BIR (por. Ryc. 2b). Zmiany sekwencyjne w obydwu izoformach generują nowe potencjalne miejsca N-glikozylacji (surwiwina-2B) i N-mirystylacji (surwiwina-2B i - Δ Ex3) [26]. Analizy, wykorzystujące komórki wątrobiaka HepG2 transfekowane wektorem pEGFP-N3 kontrolnym bądź genem kodującym surwiwinę lub jej izoformy -2B i - Δ Ex3, w których indukowano apoptozę za pomocą metotreksatu, ujawniły odmienną zdolność hamowania apoptozy przez badane białka. Surwiwina- Δ Ex3 wykazywała w badanym układzie zdolności antyapoptotyczne tylko nieznacznie niższe niż forma dzika, podczas gdy surwiwina-2B – znacznie ograniczone [26].

Kolejna wykryta izoforma – surwiwina-3B (120 aa) – powstaje przez ekspresję pięciu eksonów, w tym piątego, kryptycznego eksonu 3B, stanowiącego fragment intronu 3 o długości 165 pz. Produkt białkowy tak złożonego trans-



Rycina 2. a) Struktura pierwszo- i drugorzędowa surwiwiny z zaznaczeniem domeny BIR i regionów funkcjonalnych; 1 i 2 – motywy dimeryzacji, obszar asocjacji z mikrotubulami oraz miejsc fosorylacji przez kinazy CDK1 i Aurora B. b) Struktura wariantów genu surwiwiny kodujących formę dziką białka i jej izoformy: surwiwinę-2B, surwiwinę- Δ Ex3, surwiwinę-3B i surwiwinę-2 α . Na diagramie umieszczono długość kodowanych łańcuchów polipeptydowych oraz odcinki strukturalne zwiniętego kłęбка oraz wskazano regiony białka kodowane przez zaznaczone eksony (opracowano na podstawie [10,26,35,36]).

kryptu jest krótszy o 22 aminokwasy od formy dzikiej, gdyż w nowo pozyskanym eksonie znajduje się kodon terminacyjny UGA [35]. Należy podkreślić, że ten wariant białka zawiera nienaruszoną domenę BIR, stanowiącą kluczowy motyw jej właściwości antyapoptotycznych. Z kolei izoforma ta nie zawiera C-końcowej struktury zwiniętego kłębka, co zapewne ogranicza jej zdolności w oddziaływaniu z mikrotubulami. Surwiwinę-3B pierwotnie opisano w kilku liniach komórkowych wyprowadzonych z gruczolakoraków żołądka i jelita grubego oraz z komórek jednojądrzastych krwi chorych na ostrą białaczkę szpikową i zespół mielodysplastyczny [35].

Najkrótsza izoforma – surwiwina-2 α (74 aa) – powstaje w wyniku ekspresji transkryptu zawierającego eksony 1 i 2 oraz tzw. ekson 2 α , który stanowi fragment intronu 2 o długości 197 pz. W tym wariantcie występuje skrócona domena BIR [36]. Wyniki doświadczeń, w których określano potencjał apoptotyczny komórek Daoy (*medulloblastoma*) transfekowanych wektorami: kontrolnym, wzbogaconym surwiwiną czy surwiwiną-2 α bądź kombinacją formy dzikiej i izoformy-2 α , po ich ekspozycji na działanie winkrystyny – alkaloidu wiążącego tubulinę, sugerują, że krótki wariant antagonizuje aktywność antyapoptotyczną formy dzikiej [36]. Nieliczne, jak dotąd, doniesienia z zastosowaniem doświadczeń immunoprecypitacji wskazują, że może dochodzić do oddziaływania surwiwina-surwiwina-2 α , co osłabia biologiczne funkcje formy dzikiej białka.

Aktualnie uważa się, że dzika forma surwiwiny dominuje w komórkach, a jej izoformy produkowane są w mniejszym stopniu i w różnym nasileniu, charakterystycznym dla typu komórek [10,36].

Występowanie surwiwiny i jej wariantów molekularnych okazało się być związane z ich odmiennym rozmieszczeniem subkomórkowym, co potwierdzono, wykorzystując frakcjonowanie komórkowe oraz analizy immunohistochemiczne. Główna pula surwiwiny ulega rozdzielaniu między jądra komórkowe i cytoplazmę. Oszacowano, że w komórkach HeLa stosunek tego białka w cytoplazmie i jądrach komórkowych wynosi 6:1. Różna zawartość surwiwiny o odmienniej immunoreaktywności jest niezależnie modulowana w przebiegu cyklu komórkowego [37,13]. Opisane białko łączy się z centrami organizacji mikrotubul podczas interfazy, z centrosomami i wrzecionem mitotycznym podczas metafazy, a następnie przenosi się do ciałek pośrednich (ang. *midbodies*) w późnej telofazie [11,38]. Wyniki badań Caldas i wsp. [36] potwierdziły podobne subkomórkowe rozmieszczenie surwiwiny-2 α podczas cyklu komórkowego. Najdłuższa izoforma – surwiwina-2B – głównie lokuje się w cytoplazmie, a w mniejszym stopniu w jądrach komórkowych i mitochondriach. Natomiast wariant surwiwiny, którego pierwotny transkrypt w czasie składania utracił ekson 3 – Δ Ex3 i wykazuje dwuczęściowy motyw lokalizacji jądrowej (NLS) umieszczony między $^{-81}$ RRK 83 - i $^{-89}$ RRK 91 . W przypadku komórek raka piersi – MCF7 czy raka płuc linii A549 surwiwina- Δ Ex3 w ponad 80% występuje w jądrach komórkowych. Stanowi to potwierdzenie, że C-końcowy segment tego białka jest krytyczny dla jego lokalizacji wewnątrzkomórkowej [26,32,36,39]. Zainicjowane ostatnio prace rzucają nowe światło na możliwość wy-

kluczenia z jąder komórkowych surwiwiny i jej izoformy – surwiwiny-2B – za pomocą mechanizmu, w którym uczestniczy białko receptorowe CRM-1, oddziałujące z tymi cząsteczkami przez ich C-końcowy fragment łańcucha, w którym znajduje się ponadto sekwencja NES (ang. *nuclear export signal*) między 89 a 98 aa [32,40]. Na aktualnym etapie badań wydaje się, że przeciwdziałanie eksportowi surwiwiny z jądra komórkowego przez zastosowanie farmakologicznych inhibitorów jest rozważane jako nowa opcja terapeutyczna.

Na podkreślenie zasługuje cytowane we wprowadzeniu doniesienie, dotyczące identyfikacji surwiwiny w komórkach nowotworowych [13]. Okazuje się, że uruchomienie sygnalizacji śmierci programowanej jest czynnikiem stymulującym wypływ tego białka z mitochondriów do cytoplazmy, w której jego obecność wiąże się z apoptozą i rozrostem nowotworu.

POTRANSLACYJNE MODYFIKACJE SURWIWINY

Dwa zespoły wiodące w badaniach modyfikacji surwiwiny, kierowane przez D. C. Altieriego [41] i Sally P. Wheatley [10,42], wykazały, że białko to może być fosforylowane przez zależną od cykliny kinazę 1 (CDK1) i kinazę Aurora B, odpowiednio na Thr 34 i Thr 117 . Określono również przypuszczalne miejsca, które mogą być modyfikowane przez kinazę kazeinową II (Thr 48 i Thr 97), kinazę białkową C (Thr 21 , Thr 88 i Thr 123), a także kinazę białkową A (Ser 80). Istotna dla właściwości biologicznych surwiwiny, fosforylacja Thr 34 , dotycząca preferowanego przez CDK1 miejsca, po którym następuje układ aminokwasów -P 35 ER 37 -, może zmieniać aktywność domeny BIR surwiwiny. Miejsce modyfikacji CDK1 jest usytuowane w sąsiedztwie wystającego kwasowego „przegubu” [46]. Ufosforylowanie Thr 34 wzmacnia kwasowy charakter tego odcinka BIR, wpływając zapewne na oddziaływanie białko – białko [41]. Udowodniono, że ta modyfikacja Thr 34 wpływa na wiązanie surwiwiny z inicjatorową kaspazą-9 i blokowanie tego enzymu, związanego ze szlakiem mitochondrialnym apoptozy. Okazało się, że nadekspresja mutantu surwiwiny, w którym Thr podstawiono Ala (Thr34Ala), przyczynia się do rozszczepienia kompleksu surwiwina – kaspaza-9 i indukuje apoptozę. Przedstawiono dowody, że hamowanie apoptozy przez surwiwinę odbywa się w czasie mitozy, podczas której CDK1 tworzy z tym inhibitorem stabilne kompleksy, umiejscowione we wrzecionie podziałowym, blokując inicjację apoptozy [41]. Doniesiono, że hamowanie aktywności kinaz cyklinozależnych przez flawopirydol ogranicza fosforylację surwiwiny w komórkach nowotworowych, prowadząc ponadto do spadku ekspresji tego białka i indukcji apoptozy [42].

Doświadczenia z zastosowaniem reakcji kinazowej *in vitro* (ang. *kinase assay*) oraz spektrometrii masowej pozwoliły określić miejsce fosforylacji surwiwiny przez kinazę Aurora B na Thr 117 [43]. Ekspresja surwiwiny, w której Thr 117 podstawiono Ala uniemożliwia jej fosforylację *in vitro*.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że surwiwina, która w odróżnieniu od innych przedstawicieli rodziny IAP nie zawiera domeny RING o aktywności ligazy E3 ubikwityny, ulega również ubikwitylacji i degradacji proteasomalnej [44]. Jak

dotąd, nie znaleziono potwierdzenia, które z reszt lizyny z szesnastu cząsteczek, występujących w opisywanym białku, ulegają modyfikacji przez ubikwitynę. Należy podkreślić, że mutacje punktowe genu kodującego ten inhibitor, tj. T34A i D53A, a także izoforma kodowana przez produkt alternatywnego składowania – surwiwina- Δ Ex3 – ulegają szybszej degradacji proteolitycznej niż dzika forma białka [34,41,45]. Obserwacje, wskazujące, że okres połowicznego rozpadu surwiwiny jest kontrolowany przez jej modyfikacje, sugerują możliwość terapeutycznej interwencji, która może okazać się szczególnie skuteczna w tych chorobach, w których nadekspresja surwiwiny stanowi przyczynę zaburzenia fazy wykonawczej apoptozy [42].

UDZIAŁ SURWIWINY W CYKLU KOMÓRKOWYM

Na podstawie zgromadzonych dotąd danych uznaje się, że główna funkcja białek rodziny IAP wyposażonych w domenę BIR typu II, poza regulacją procesu apoptozy, związana jest z ich udziałem w procesie podziału komórek [14,25,46]. Wykazano, że surwiwina, której synteza wzrasta około dziesięciokrotnie w fazie G₂/M cyklu komórkowego, wchodzi w skład złożonego kompleksu CPC i wraz z pozostałymi jego składnikami, takimi jak: Aurora B, INCENP (ang. *inner centromere protein*), borealina/dasra B, TD-60 (ang. *telophase disk-60*), uczestniczy w prawidłowej segregacji chromosomów podczas mitozy i właściwym przebiegu cytokinezy [46,47]. Obniżenie ekspresji tego białka przez zastosowanie cząsteczek siRNA (ang. *small interference RNA*) przejawia się nieprawidłowościami w podziałach komórek, tj. zaburzeniami cytokinezy i powstaniem komórek wielojądrowych [46]. Rdzeń kompleksu CPC tworzy czynnik Aurora B o aktywności kinazowej, natomiast pozostałe składniki odpowiadają za ujawnienie się jego enzymatycznej aktywności we właściwym czasie i miejscu w komórce. Surwiwina, wchodząca w bezpośrednie oddziaływanie z białkiem INCENP, przy stabilizującym działaniu borealiny, prawdopodobnie warunkuje właściwą lokalizację kompleksu w czasie podziału komórek [46]. Dodatkowo, wiązanie surwiwiny do kompleksu CPC wydaje się wzmacniać kinazową aktywność enzymu Aurora B [48].

Badania z zastosowaniem techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej wykazały, że podczas fazy M cyklu komórkowego surwiwina przemieszcza się w obrębie aparatu mitotycznego [46,49]. W czasie pro- i metafazy surwiwina wykrywana jest głównie w centromerach, zaś w anafazie wiąże się z mikrotubulami wrzeciona podziałowego. Następnie umieszcza się kolejno w płaszczyźnie środkowej wrzeciona podziałowego (ang. *midzone*) (anafaza) i ciała pośredniego (telofaza), aby ostatecznie ulec wyłączeniu poza obręb rozdzielonych komórek potomnych [46,50]. Ponadto, u pewnych mutantów wykazano obecność surwiwiny w centrosomach komórek interfazowych [51]. Uważa się, że domena BIR surwiwiny jest kluczowa, choć niewystarczająca dla wiązania kompleksu CPC do regionów centromerowych chromosomów, natomiast α -helikalny fragment C-końcowy białka jest niezbędny, a zarazem wystarczający, do kierowania białka do wrzeciona mitotycznego i ciała pośredniego [46]. Na oddziaływanie surwiwiny z poszczególnymi składnikami aparatu mitotycznego wpływają jej potranslacyjne modyfikacje, w tym ubikwitylacja. Stwier-

dzono, że przyłączenie do cząsteczki surwiwiny reszt ubikwityny (kompleks białkowy p97-NP14-Ufd1) zwiększa jej powinowactwo do centromerów, natomiast ich odłączenie (czynnik FAM) skutkuje oddysocjowaniem kompleksu [46].

Surwiwina jako składnik CPC pośrednio: i) uczestniczy w destabilizacji mikrotubul nieprawidłowo połączonych z kinetochorem i promuje biorientację mikrotubul; ii) reguluje poziom w kinetochorach składnika regulatorowego kompleksu mitotycznego punktu kontroli cyklu komórkowego – białka BubR1-, w konsekwencji, wejście komórek w anafazę; iii) stabilizuje mikrotubule oraz iv) uczestniczy w zakończeniu cytokinezy przez umożliwienie fosforylacji różnych białek i struktur komórkowych [46].

UDZIAŁ SURWIWINY W APOPTOZIE

Jak dotąd, najlepiej scharakteryzowano, wśród rodziny IAP, udział w apoptozie białka XIAP, zidentyfikowanego w 1999 r. przez Ducketta i wsp. [52]. Białko to zawiera trzy domeny BIR i, w C-końcowym segmencie cząsteczki, domenę RING (por. Ryc. 1). Przedstawiono dowody, że XIAP wiąże bezpośrednio kaspazy. Funkcję tę wypełnia dzięki tzw. odcinkowi łącznika między domeną BIR-1 i BIR-2, który jest kluczowym motywem uczestniczącym w hamowaniu kaspazy-3 i -7, utrzymując katalityczne miejsca cysteiny niedostępne, w czym jest wspomagana przez stabilizujące działanie domeny BIR-2 [18,53]. Z kolei domena BIR-3 uczestniczy w hamowaniu kaspazy-9 poprzez wiązanie się z powierzchnią rowka, wykorzystywanego w dimeryzacji enzymu, utrzymując ją w formie nieaktywnego monomeru [54]. Unikatowa struktura surwiwiny, białka wyposażonego strukturalnie tylko w jedną domenę BIR (najbardziej zbliżoną do BIR-2 XIAP), bez strukturalnych odpowiedników motywu łącznika białka XIAP [55], powoduje, że mechanizm(y) wyjaśniający antyapoptotyczną naturę tego białka jest mało klarowny. Z kolei wyciszenie *in vitro* ekspresji genu kodującego surwiwinę w komórkach HeLa przez antysensowne oligonukleotydy dla fragmentów genu tego białka, potęguje ich wrażliwość na śmierć programowaną na drodze receptorowej [56]. Natomiast doświadczenia wykorzystujące myszy transgeniczne potwierdzają, że wprowadzenie genu kodującego surwiwinę wywołuje zmniejszenie liczby komórek apoptotycznych wśród keratynocytów naskórka [57] czy komórkach wysepek β trzustki [58] po napromieniowaniu UV. Aktualnie wydaje się, że w blokowaniu procesu apoptozy białko to wykorzystuje oddziaływania z różnymi kofaktorami. Wśród nich wymienia się niskocząsteczkowe białko HBXIP (ang. *hepatitis B virus X interacting protein*) oraz wspomniane białko XIAP/ILP-1 [59]. Czynnik HBXIP, pierwotnie zidentyfikowano jako białko wiążące wirusowy, onkogenny polipeptyd (91 aa, m.c. 9,6 kDa) – HBX (ang. *X protein of hepatitis B virus*), modulujący jego transaktywacyjną właściwość i hamujący replikację wirusa zapalenia wątroby typu B – HBV *in vitro*. Wiadomo jednak, że chociaż ekspresja HBXIP wzrasta kilkakrotnie w zakażonych HBV hepatocytach, to nie występuje wyłącznie w czasie zakażenia wirusowego i nie ogranicza się do komórek wątroby [60,61]. Jak wykazano, synteza HBXIP zachodzi w prawie wszystkich tkankach ludzkich, szczególnie obficie w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym. Dodatkowo,

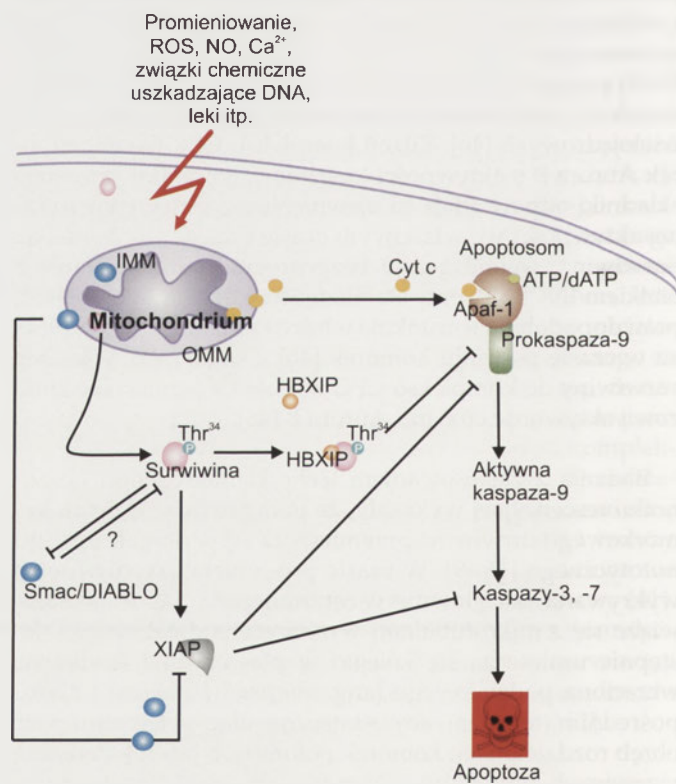
obecność tego czynnika wykryto w komórkach innych kręgowców, wskazując na jego zachowawczą rolę fizjologiczną [60].

Marusawa i wsp. [61] wykazali bezpośrednie oddziaływanie między surwiwiną i HBXIP zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* oraz udowodnili, że oddziaływanie to jest niezbędnym warunkiem do ujawnienia się antyapoptotycznej właściwości surwiwiny i blokowania aktywacji kaspaz na szlaku mitochondrialnym, zależnym od cyt c. Niewykluczone jest ponadto, że HBXIP może także uczestniczyć, obok surwiwiny, w przebiegu cyklu komórkowego [61,62]. Koniecznym i zarazem wystarczającym elementem strukturalnym w oddziaływaniach między opisywanymi białkami, wydaje się być domena BIR surwiwiny, a regulatorowe znaczenie dla optymalnego wiązania HBXIP przypisuje się fosforylacji Thr³⁴ w cząsteczce surwiwiny, przeprowadzanej w głównej mierze przez kinazę CDK1 [61]. Podstawienie Thr³⁴ niezdolną do ufosforylowania resztą aminokwasową znosi oddziaływanie surwiwiny z jej potencjalnym kofaktorem, natomiast podstawienie w tej pozycji reszty glutaminianu wiąże się ze zwiększeniem powinowactwa surwiwiny do HBXIP *in vitro* w porównaniu z białkiem typu dzikiego.

Według przedstawionych danych w mieszaninie zawierającej obok prokaspazy-9 także cząsteczki Apaf-1, cyt c, dATP oraz surwiwinę i czynnik HBXIP obserwuje się ok. 80% spadek pojawiania się aktywnej podjednostki enzymu w porównaniu z kontrolą pozbawioną dwóch ostatnich składników. Efekt ten nie ujawnia się w obecności surwiwiny bądź HBXIP, działających samodzielnie. Uważa się, że kompleks HBXIP - surwiwina zapobiega składaniu apoptosomu wskutek wiązania prokaspazy-9 i uniemożliwienia jej rekrutacji do aktywowanego czynnika Apaf-1 (Ryc. 3). Okazało się ponadto, że wirusowe białko HBX dodane do lizatu komórek embrjonalnych nerki linii HEK293T wzmacnia o ok. 50% hamującą aktywność kompleksu HBXIP – surwiwina, a polipeptyd HBXIP pełni, prawdopodobnie, funkcję łącznika pomiędzy HBX i surwiwiną. Informacje te wydają się być szczególnie interesujące w kontekście rozwoju przednowotworowych zmian w hepatocytach zakażonych HBV. Chociaż od prawie 20 lat przewlekłe zakażenie tym wirusem związane jest z rakiem wątroby, jak dotąd udział białek wirusa w ich rozwoju nie został wyjaśniony [63,64]. Sugeruje się, że wirusowe białko onkogenne HBX może sprzyjać nowotworzeniu, znosząc wrażliwość komórek na apoptozę, m.in. poprzez pośrednie oddziaływanie z kompleksem HBXIP - surwiwina [61].

Obok hipotez dotyczących zdolności surwiwiny do regulowania aktywności i/lub hamowania aktywacji kaspaz w apoptosomie, powszechnie akceptuje się pogląd, sugerujący pośrednie działanie surwiwiny na hamowanie apoptozy [50]. Wydaje się, że pozostaje on w zgodzie z analizą porównawczą sekwencji aminokwasowej oraz struktury surwiwiny i innego przedstawiciela rodziny IAP – XIAP. Badacze popierający powyższą hipotezę zakładają, że główne antyapoptotyczne działanie surwiwiny polega raczej na wiązaniu i neutralizowaniu białek o działaniu antagonistycznym w stosunku do przedstawicieli rodziny IAP, takich jak, wykryte w laboratorium Vauxa [65], mitochondrialne białko Smac/DIABLO. Czynniki te uwalnia się do cytosolu w

warunkach sprzyjających apoptozie [66]. Dojrzała cząsteczka Smac (m.cz. 21 kDa; 184 aa), dzięki obecności N-końcowego motywu AVPI, opisywanego RHG (od nazw genów *reaper*, *hid*, *grim* występujących u muszki owocowej), może oddziaływać z domeną BIR białek rodziny IAP, głównie XIAP, cIAP-1, cIAP-2, ale i surwiwiną [66]. Pierwsze dowody wskazujące na oddziaływanie pomiędzy Smac/DIABLO a surwiwiną przedstawione zostały przez chińskich badaczy w 2003 roku [50]. Wykazali oni, że białka te wiążą się ze sobą *in vitro* i *in vivo*, a główną rolę w tym oddziaływaniu odgrywa reszta Asp⁷¹, zlokalizowana w obrębie regionu BIR surwiwiny, wspomagana przez jej α -helikalny region C-końcowy oraz N-końcowy aminokwas w Smac/DIABLO (Ala¹). Występująca samodzielnie domena BIR surwiwiny wydaje się być niewystarczająca dla skutecznego składania kompleksu, natomiast cząsteczka surwiwiny niosąca mutację D71R nie tylko traciła zdolność do wiązania proapoptotycznego czynnika, ale sama zyskiwała właściwości promujące śmierć komórek. Przeprowadzone eksperymenty dowiodły ponadto, że proces apoptozy może być blokowany w obecności surwiwiny i innych cząsteczek hamujących (takich jak XIAP), co wydaje się być konsekwencją neutralizowania aktywności Smac/DIABLO i ujawnienia się funkcji białek IAP. Z kolei surwiwina samodzielnie nie wykazuje zdolności hamowania aktywności kaspaz (-7, -9).



Rycina 3. Hipotetyczny model działania surwiwiny podczas apoptozy. Ufosforylowana reszta Thr³⁴ w cząsteczce surwiwiny stabilizuje białko XIAP – inhibitor, zdolny do hamowania aktywacji/aktywności kaspaz inicjatorowych (kaspaza-9) i wykonawczych (kaspaza-3 i -7), a po związaniu kofaktora – HBXIP blokuje aktywację prokaspazy-9 w apoptosomie i zapobiega apoptozie komórek na szlaku mitochondrialnym. Surwiwina może wiązać ponadto mitochondrialny czynnik Smac/DIABLO, uwolniony do cytosolu po uruchomieniu sygnału śmierci. Oddziaływanie to może przyspieszać ubikwitylację i proteasomalną degradację surwiwiny, albo znosić cytotoksyczność Smac/DIABLO i ujawniać antyapoptotyczną aktywność pozostałych inhibitorów rodziny IAP (np. XIAP) (opracowano na podstawie [50,61,67,68]).

Odmienne wyniki uzyskali Mc Neish i wsp. [67], którzy potwierdzili możliwość oddziaływań pomiędzy opisywanymi białkami, ale wykluczyli skuteczność surwiwiny w znoszeniu cytotoksyczności wywoływanej przez Smac/DIABLO. Doświadczenia z użyciem siRNA wykazały, że surwiwina nie wpływa na proapoptotyczną aktywność Smac/DIABLO. Natomiast Smac/DIABLO przyspiesza ubikwitylację surwiwiny i reguluje szybkość jej degradacji w komórce. Okazało się, że okres połowicznego rozpadu surwiwiny w komórkach raka jajnika linii OVCAR4, transfekowanych wektorem adenowirusowym niosącym DNA, kodujący dojrzalą formę białka Smac/DIABLO, ulega skróceniu z 6 do 2 godzin, w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Negatywny wpływ Smac/DIABLO na trwałość surwiwiny znosi obecność w środowisku laktacystyny (12,5 μ M) – uznanego inhibitora proteasomu 20S.

Dane doświadczalne, które ukazały się w ciągu ostatnich kilku lat świadczą ponadto o udziale surwiwiny w stabilizacji cząsteczek białka XIAP [68]. Wyniki badań z zastosowaniem techniki chromatografii powinowactwa wskazują niezbicie na współwystępowanie surwiwiny w ekstraktach komórkowych w postaci kompleksu, zawierającego XIAP obok białek opiekuńczych Hsp90 i Hsp70. Oddziaływania między tymi białkami wzmacniane są prawdopodobnie przez czynniki wywołujące apoptozę (np. staurosporyna). Dodatkowo wykazano, że transfekcja komórek linii HEK293T genem kodującym surwiwinę skutkuje przedłużeniem czasu półtrwania XIAP z 2 do 5,5 godzin, prawdopodobnie w konsekwencji przyłączenia do białka XIAP cząsteczek surwiwiny w sposób uniemożliwiający dostęp enzymu Ubc H5, przeprowadzającego poliubikwitylację. Heterokompleks XIAP – surwiwina odgrywa, jak się uważa, zasadniczą rolę w ochronie komórki, nasilając aktywność białek inhibitorowych w blokowaniu aktywacji kaspaz i przebiegu apoptozy.

Niewykluczony jest również odmienny mechanizm działania surwiwiny. Stwierdzono na przykład, że zniesienie aktywności surwiwiny (T34A) w komórkach czerniaka może indukować przeniesienie czynnika AIF (ang. *apoptosis inducing factor*) do jądra komórkowego i, w bliżej niewyjaśniony sposób, włączać apoptozę niezależną od kaspaz [69]. Przypuszcza się, że kluczowa rola surwiwiny polegać może na hamowaniu zależnego od AIF mitochondrialnego szlaku apoptozy, a ekspresja genu kodującego surwiwinę zarówno przed apoptozą zależną, jak i niezależną od kaspaz.

Jak dotąd, mechanizm działania surwiwiny w hamowaniu apoptozy pozostaje w sferze badań. Wyjaśnienia wymagają zwłaszcza przyczyny pozostających w sprzeczności rezultatów prac badaczy, pochodzących z różnych laboratoriów. Możliwe, że różnice te są efektem specyficzności komórkowej lub też wynikają z zastosowania odmiennych technik badawczych [67].

UDZIAŁ SURWIWINY W PROCESIE NOWOTWORZENIA

Powszechna synteza surwiwiny w wielu nowotworach wobec niskiego, prawie niewykrywalnego poziomu w odnośnych komórkach prawidłowych wciąż fascynuje badaczy [1,70]. Jej obecność wykazano w komórkach em-

brionalnych, a także niektórych tkankach dojrzałych organizmów, głównie w komórkach cechujących się wysokim potencjałem mitotycznym, np. szpik kostny, keratynocyty podstawnej warstwy skóry [3,70]. Obniżenie syntezy tego białka podczas ostatecznego różnicowania się tkanek prawidłowych stanowi adaptację do ich aktualnego stanu namnażania i jest, w pewnych warunkach, odwracalne.

Wykazano na doświadczalnym modelu regenerującej wątroby, że po częściowej hepatektomii lub też po chemicznym uszkodzeniu wątroby u myszy następuje około trzydziestokrotny wzrost stężenia mRNA dla surwiwiny, który ściśle zależy od indukcji replikacji DNA w tym narządzie [71].

Wymienione fakty, a także istotny udział surwiwiny w regulacji szlaków komórkowych (ang. *cross-talk*) pomiędzy życiem a śmiercią komórkową, nasuwa szereg pytań, m.in. czy surwiwina pełni aktywną funkcję w transformacji nowotworowej, a jeśli tak, to jaki molekularny mechanizm prowadzi do przywrócenia syntezy surwiwiny w komórkach nowotworowych? Czy wznowienie syntezy tego białka może wpływać na inicjację czy też na progresję kancerogenezy? Czy zaburzenie regulacji apoptozy po podwyższeniu komórkowego poziomu surwiwiny odgrywa rolę w inwazyjności komórek nowotworowych, względnie w procesie angiogenezy?

Pierwsze informacje wskazujące na udział surwiwiny w transformacji nowotworowej były czysto opisowe. Stwierdzono, że o ile białka kodowane przez gen kodujący surwiwinę z reguły nie występują w zdrowych, ostatecznie zróżnicowanych tkankach, to do ich syntezy dochodzi podczas zmian o charakterze hiperplazji czy dysplazji; jest ona szczególnie wysoka w większości tkanek zmienionych nowotworowo. Niektóre doniesienia sugerują, że do wzrostu poziomu surwiwiny dochodzi już we wczesnym etapie procesu nowotworzenia oraz wskazują na bezpośrednią zależność pomiędzy syntezą surwiwiny a stadium zaawansowania nowotworu [1,72]. Wskazuje się na zaburzenia prawidłowej regulacji procesu apoptozy wskutek podwyższenia poziomu surwiwiny, jako przyczynę agresywnego wzrostu nowotworów oraz wzrostu ich złośliwości i inwazyjności.

Stosunkowo liczne badania, zarówno kliniczne, jak i przeprowadzone na zwierzęcych modelach doświadczalnych, dotyczą roli surwiwiny w transformacji nowotworowej skóry. Wysoki poziom syntezy tego białka wykrywano w różnych typach raka skóry, tj. w czerniaku złośliwym [73,74], jak również w innych odmianach raka skóry [70]. W odróżnieniu od zdrowych melanocytów, w których nie stwierdzono obecności surwiwiny, jej wysoką syntezę udokumentowano w czerniaku [73]. Wszystkie badane przypadki czerniaka z przerzutami (15 z 15), a także trzynastie z piętnastu przypadków jego inwazyjnej formy odznaczało się obecnością surwiwiny. Harmonizowało to z wysokim indeksem mitotycznym oraz bardzo niskim indeksem apoptotycznym w przerzutowej formie czerniaka. Wygaszenie ekspresji genu kodującego surwiwinę metodą interferencji RNA lub też nadekspresja genu kodującego jej zmutowaną, niefunkcjonalną formę (Cys85Ala) w komórkach czerniaka, spowodowało indukcję apoptozy [73]. Ponadto, podjęto

próbę oceny, czy ekspresja białek antyapoptotycznych, m.in. surwiwiny czy liwiny, może być odbiciem stopnia zaawansowania czerniaka i jego inwazyjności [74]. Wykorzystując technikę immunohistochemicznego barwienia oraz ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (qRT-PCR), oznaczono poziom obu wymienionych białek u 63 pacjentów z przerzutami czerniaka złośliwego. Odnotowano syntezę surwiwiny w próbkach czerniaka 62 pacjentów (98%), natomiast liwiny – u 60 pacjentów (90%). Warto nadmienić, że stwierdzono duże różnice w ilości kopii mRNA dla surwiwiny pomiędzy poszczególnymi pacjentami [74]. Znaczącej liczbie pacjentów (56 z 63), którzy zostali poddani zabiegowi chirurgicznemu, podawano dodatkowo szczepionkę *Canvaxin* (19 pacjentom preparat ten podano zarówno przed operacją, jak również po operacji, podczas gdy 37 pacjentów otrzymało go wyłącznie po zabiegu operacyjnym). Na podkreślenie zasługuje fakt, że wśród pacjentów z niskim poziomem surwiwiny, którzy zostali poddani immunoterapii, po zabiegu chirurgicznym odnotowano znaczne wydłużenie czasu przeżycia. Obserwacja ta zdaje się być istotna, ponieważ w odniesieniu do liwiny u tych samych pacjentów podobnej współzależności nie stwierdzono [74].

Badania przeprowadzone z wykorzystaniem myszy transgenicznymi potwierdziły istotny współdziałanie surwiwiny w przyspieszonej progresji nowotworów skóry (przekształcenie brodawczaka w raka kolczystokomórkowego) [75]. Wyniki doświadczeń sugerują, że nadekspresja genu kodującego surwiwinę zapobiega spontanicznej i indukowanej apoptozie, której towarzyszy spadek poziomu białka p53. Obniżenie poziomu p53, wskutek inaktywacji jednego allela *p53* (myszy *p53+/-*), nasila dodatkowo efekt antyapoptotyczny. Nie stanowi to zaskoczenia, jeżeli uwzględni się, że białko p53 hamuje ekspresję genu kodującego surwiwinę, a ponadto, jako czynnik transkrypcyjny, indukuje ekspresję licznych proapoptotycznych genów. Również doniesienia innych grup badawczych wskazują, że podwyższenie ekspresji surwiwiny podczas transformacji blokuje fazę wykonawczą apoptozy, przyczyniając się tym samym do przyspieszenia progresji procesu nowotworowego [57]. Wygaszenie ekspresji genu kodującego surwiwinę w kilku liniach chłoniaków niehodgkinowskich (NHL) za pomocą oligonukleotydów antysensownych (ASO) hamowało ich namnażanie się w hodowli komórkowej, a także zapobiegało powstawaniu ksenotransplantatów u myszy SCID, jak również ograniczało wzrost już istniejących nowotworów [76].

Wiele prac doświadczalnych dotyczy udziału surwiwiny w transformacji nowotworowej jelita grubego. Duże zainteresowanie tą tematyką jest zapewne spowodowane nie tylko wysoką częstotliwością występowania raka jelita grubego w krajach uprzemysłowionych, ale także faktem, że molekularne podstawy transformacji nowotworowej tego narządu są dość dobrze poznane. Kawasaki i wsp. [77] donieśli, że ekspresja genu kodującego surwiwinę obniżała indeks apoptotyczny w tym nowotworze bez względu na obecność białka Bcl-2. Badacze ci obserwowali ponadto, że pacjentów z niskim indeksem apoptotycznym w tkance nowotworowej cechował krótszy okres przeżycia. Obserwacja ta zasugerowała, że surwiwina może być niezależnym czynnikiem prognostycznym [77].

Analiza immunohistochemiczna 52 prób raka jelita grubego wykazała, iż ekspresja genu kodującego surwiwinę w 27 przypadkach ściśle harmonizowała nie tylko ze spadkiem indeksu apoptotycznego, ale również z podwyższeniem indeksu mitotycznego w tkance nowotworowej w porównaniu do 25 przypadków bez ekspresji genu *surwiwiny* [78]. W kolejnych badaniach podjęto próbę określenia, na którym etapie procesu kancerogenezy jelita grubego dochodzi do wznowienia syntezy surwiwiny. W tym celu oznaczono poziom surwiwiny oraz białka antyapoptotycznego Bcl-2 w materiale klinicznym, reprezentującym najważniejsze stadia zmian tkanek podczas rozwoju nowotworu, począwszy od niezłośliwych polipów, poprzez kolejne stadia zaawansowania klinicznego, aż do złośliwej formy gruczolakoraka.

Badaniami immunohistochemicznymi objęto bogaty materiał kliniczny (143 hiperplastyczne polipy, 171 gruczolaków z niską dysplazją, 42 gruczolaki o wysokiej dysplazji oraz 60 gruczolakoraków). Uzyskane wyniki ujawniły, że poziom surwiwiny zwiększał się w sposób statystycznie istotny podczas transformacji niezłośliwego gruczolaka w postać złośliwego nowotworu. Wyniki oceny poziomu białka Bcl-2 nie potwierdziły podobnej zależności. Natomiast wzrostowi ekspresji genu *surwiwiny* towarzyszył spadek indeksu apoptotycznego oraz podwyższenie procentu komórek Ki-67 pozytywnych [79]. Wyniki te zostały potwierdzone w innych doniesieniach [80]. Wygaszenie ekspresji genu *surwiwiny* w komórkach raka okrężnicy HCT116, przy użyciu techniki siRNA, spowodowało zahamowanie namnażania się tych komórek *in vitro*, a także doprowadziło do siedmiokrotnego zmniejszenia wzrostu guzów implantowanych „nagim” myszom [80].

Reasumując, można stwierdzić, że zgromadzono wystarczająco przekonujące wyniki, które, wykorzystując bogaty materiał kliniczny oraz różne modele doświadczalne, nie tylko dokumentują udział surwiwiny w procesie nowotworzenia, ale pozwalają również na ustalenie istotnej roli przywrócenia ekspresji genu kodującego surwiwinę na etapie postępującego procesu nowotworzenia.

ROLA WARIANTÓW SURWIWINY W PROCESIE NOWOTWORZENIA

Precyzyjne ustalenie roli surwiwiny w transformacji nowotworowej jest utrudnione z uwagi na fakt, że w komórkach człowieka, oprócz formy dzikiej, występują jej izoformy, powstające na drodze alternatywnego składania pre-mRNA. Do chwili obecnej, doniesienia o roli wariantów surwiwiny w procesie nowotworzenia są wciąż nieliczne. Ponadto, niektóre obserwacje są ze sobą sprzeczne i stąd też trudno jest dokładnie ocenić ich udział w procesie nowotworzenia.

Podwyższoną syntezę surwiwiny-2B zaobserwowano w niektórych przypadkach nerwiaków (ang. *neuroblastoma*) odznaczających się dobrym rokowaniem, podczas gdy w szczególnie złośliwych nowotworach stwierdzono tylko niski poziom surwiwiny [81]. Jak dotąd, nie stwierdzono żadnego związku przyczynowo – skutkowego pomiędzy syntezą dzikiej formy surwiwiny, ani jej wariantu – $\Delta Ex3$,

a stopniem zaawansowania nowotworów przewodu pokarmowego [82]. Odmienne wyniki odnotowano w przypadku poziomu surwiwiny-2B. Jej synteza była znacząco podwyższona we wczesnych stadiach nowotworzenia (stadium I + II), a ulegała spadkowi w zaawansowanym stadium rozwoju nowotworu tego narządu (stadium III + IV) [82]. Natomiast zwrócono uwagę na niekorzystną rolę surwiwiny-2B w progresji nowotworów nerek [45]. Synteza surwiwiny-2B ulegała obniżeniu w mocno zaawansowanych stadiach guzów nowotworowych [45]. Wysoki poziom syntezy surwiwiny-2 α wykryto w pierwotnych guzach nowotworowych centralnego systemu nerwowego (rdzeniaki, ang. *medulloblastoma*) [83]. Biorąc pod uwagę fakt, że w niektórych wariantach surwiwiny brak jest, przynajmniej częściowo, funkcjonalnego motywu BIR, nie można wykluczyć, że mogą one się znacznie różnić pod względem biologicznych właściwości. W istocie, w odróżnieniu od dzikiej formy surwiwiny jej wariant 2 α posiada właściwości apoptogenne i tym samym może niweczyć antyapoptotyczną funkcję, głównie reprezentowanej, dzikiej formy surwiwiny [36].

W podsumowaniu należy stwierdzić, że poziom syntezy poszczególnych wariantów surwiwiny obserwowany w indywidualnych przypadkach może mieć decydujące znaczenie w regulacji jej antyapoptotycznej funkcji w komórkach nowotworowych.

MOLEKULARNE MECHANIZMY PROWADZĄCE DO NADEKSPRESJI SURWIWINY W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Mechanizm(y) odpowiedzialny(e) za przywrócenie ekspresji genu kodującego surwiwinę podczas kancerogenezy do poziomu występującego w komórkach embrionalnych lub niektórych prawidłowych tkankach o wysokim potencjale mitotycznym, budzi wielkie zainteresowanie. Stężenie surwiwiny, a także jej aktywność w komórkach regulowana jest na kilku poziomach, tj. przez modulację transkrypcji jej genu, stabilność transkryptów, translację oraz stabilność samego białka, która z kolei jest kontrolowana m.in. przez stopień ufosforylowania, a także przez regulację wewnątrzkomórkowej jej lokalizacji. Akceptuje się, że poziom surwiwiny w prawidłowych komórkach podlega cyklicznej zmianie zależnej od progresji cyklu komórkowego i jeżeli białko to osiąga najwyższy poziom podczas fazy G₂/M cyklu komórkowego, należy się spodziewać w obrębie promotora genu kodującego surwiwinę obecności typowych elementów występujących w promotorach innych genów, które ulegają ekspresji w sposób zależny od cyklu komórkowego. Analiza sekwencji promotora genu kodującego surwiwinę ujawniła obecność kilku charakterystycznych elementów, tj. sekwencji CHR (ang. *cell-cycle genes homology region*) [84], odpowiedzialnej za hamowanie ekspresji genu podczas fazy G₁ oraz trzech sekwencji CDE (ang. *cell cycle-dependent elements*), które przyczyniają się do wzrostu transkrypcji w fazie G₂/M cyklu komórkowego [11]. Badania regionu promotora genu *surwiwiny* w komórkach nowotworowych wykazały obecność polimorfizmu [85]. Jeden z polimorfizmów, zlokalizowany w obrębie regionu obejmującego elementy CHR/CDE, wydaje się być związany z mutacją charakterystyczną dla wielu typów nowotworów i harmonizuje ze

wzrostem ekspresji genu *surwiwiny* zarówno na poziomie mRNA, jak również białka.

Ponadto, w obrębie promotora genu *surwiwiny* zidentyfikowano specyficzne sekwencje typowe dla wiązania niektórych czynników transkrypcyjnych: białka p53, regulatora transkrypcyjnego CBP (ang. *CREB-binding protein*), a także ważnego czynnika szlaku sygnałowego β -kateniny – TCF-4 (ang. *T-cell factor-4*). Sekwencja w promotorze genu *surwiwiny*, będąca miejscem wiązania p53, odbiega nieco od typowej sekwencji kanonicznej (ang. *canonical p53 responsive element*) [30]. Odcinek promotora, w którym wiąże się dzika forma białka p53 pokrywa się częściowo z miejscem łączenia się czynników transkrypcyjnych z rodziny E2F, co ma istotne znaczenie dla mechanizmu regulacji transkrypcyjnej surwiwiny przez p53. Wykazano, że białko p53 hamuje transkrypcję surwiwiny [30], przy czym represja ta może mieć charakter bezpośredni lub też pośredni. Szacuje się, że w ok. 50% wszystkich chorób nowotworowych u ludzi gen *p53* ulega mutacji. Ponadto, w dużej liczbie przypadków nowotworów dochodzi do inaktywacji kodowanego przez białko nie tylko w wyniku mutacji genu, lecz również w efekcie destabilizacji jego produktu białkowego lub jego niewłaściwej lokalizacji wewnątrzkomórkowej. We wszystkich tych przypadkach odnotowuje się brak białka p53 w jądrze komórkowym lub jego niefunkcjonalność. Łatwo jest więc zrozumieć, że wskutek braku dzikiej formy białka p53 nie dochodzi do represji genu kodującego surwiwinę. Uwzględniając ponadto fakt, że dzika forma p53 poza surwiwiną hamuje również gen *BCL-2*, a ponadto stymuluje wiele genów proapoptotycznych, takich jak: *Bax*, *PUMA*, *NOXA*, *kaspaza-9* (oraz wiele innych), jego inaktywacja musi prowadzić do decydującego zaburzenia istniejącej równowagi komórkowej pomiędzy czynnikami pro- i antyapoptotycznymi [86]. Ponadto, inaktywacja p53 prowadzi również do zaburzeń ekspresji genu *surwiwiny* regulowanej poprzez znajdujące się w obrębie jej promotora wspomniane elementy, uzależnione od przebiegu cyklu komórkowego – CHR i CDE. Wykazano, że geny wyposażone w kasety CCAAT, charakterystyczne dla zależnych od G₂/M promotorów, ulegają bezpośredniemu hamowaniu przez dziką formę p53 [87].

Ostatnio Rother i wsp. [88], badając ekspresję genu kodującego Cks1 (ang. *cyclin-dependent kinase subunit 1*) – przedstawiciela rodziny kinaz zależnych od cyklin, wykazali, że prawidłowa jej regulacja wymaga współdziałania w obrębie promotora obydwu elementów – CHR i CDE. Ponadto stwierdzili, że poziom mRNA dla Cks1, ulegający zmianie zależnej od cyklu komórkowego, obniża się pod wpływem wzrostu ekspresji *p53* pomimo, iż w obrębie promotora nie występują specyficzne miejsca dla wiązania tego białka. Autorzy ci wykluczają możliwość, że w zaobserwowanej represji pośredniczy inny czynnik transkrypcyjny NF-Y, który jest zwykle wiązany przez sekwencję w CCAAT. Przytoczone dane dokumentują istotny udział białka p53 w regulacji ekspresji surwiwiny, która, jak wiadać, następuje poprzez represję przynajmniej dwóch niezależnych szlaków, i pozwalają lepiej zrozumieć poważne skutki spowodowane inaktywacją produktu genu supresorowego *p53*.

Na regulację ekspresji genu *surwiwiny* wpływa także czynnik związany ze szlakiem sygnałowym β -katenina-TCF-4, co zasygnalizowano w 2001 roku [89]. Okazało się, że białko kodowane przez gen supresorowy APC (ang. *adenomatous polyposis coli*) obniża ekspresję genu *surwiwiny* poprzez zablokowanie szlaku β -katenina/TCF-4. To wysokocząsteczkowe białko strukturalne, które uczestniczy m.in. w adhezji komórkowej, odgrywa ważną rolę w regulacji szlaku β -kateniny/TCF-4 w ścianie jelita grubego. Produkty bakteryjnej fermentacji resztek pokarmu zmieniają chemicznie środowisko, przed czym skuteczną obroną jest szybka odnowa komórek śluzówki jelita. Stąd też konieczna jest precyzyjna regulacja aktywności czynników transkrypcyjnych. Mutacje genu APC, występujące w rodzinnych zespołach raka jelita grubego, prowadzą najczęściej do syntezy skróconego białka APC, pozbawionego miejsca wiązania β -kateniny, a tym samym – do utraty represji szlaku β -katenina/TCF-4, co stwarza warunki promujące przemianę nowotworową.

W tym miejscu należy zacytować wyniki doświadczeń, w których, wykorzystując ocenę aktywności indukcji promotora genu *surwiwiny* (dzięki technice z wykorzystaniem genu reporterowego), odnotowano 6–12-krotną różnicę jego aktywności w komórkach raka okrężnicy HCT-116, w których funkcjonuje szlak β -katenina/TCF-4, w porównaniu z komórkami HeLa pozbawionymi tej ścieżki sygnałowej [90]. Obserwacje te potwierdziły udział czynników szlaku β -katenina/TCF-4 w regulacji ekspresji genu *surwiwiny*. W promotorze genu *surwiwiny* wykazano trzy miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego TCF, określane jako TBE (ang. *TCF-binding elements*) [90]. Mutacje w dwóch bliższych elementach TBE2 i TBE3 przyczyniły się do 79% spadku ekspresji genu *surwiwiny*, podczas gdy mutacja kolejnego – TBE1 – nie okazywała istotnego wpływu na jej ekspresję. Wyniki te sugerują, że regulacja transkrypcji genu *surwiwiny* podlega znacznemu zróżnicowaniu w różnych typach tkanek. W komórkach przewodu pokarmowego białko APC oraz czynniki szlaku β -katenina/TCF-4 odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji genu *surwiwiny*. Mutacja APC prowadzi do niekontrolowanego wzrostu poziomu β -kateniny i zasadniczej aktywacji szlaku β -katenina/TCF-4, a w konsekwencji – do zwiększenia ekspresji genu *surwiwiny* i tym samym zahamowania apoptozy.

Przywrócenie ekspresji genu *surwiwiny* wydaje się być także promowane przez czynnik transkrypcyjny Stat-3 (ang. *signal transducer and activator of transcription-3*). Wysoki poziom tego białka odnotowano w badaniach dotyczących raka sutka. W tym nowotworze również dochodzi często do stałej aktywacji białka Stat-3 [91]. Równoczesne podwyższenie poziomu obydwu białek wykazano w grupie pacjentów wysokiego ryzyka, opornych na chemoterapię. Doświadczenia genetyczne potwierdziły, że czynnik Stat-3 łączy się bezpośrednio z promotorem genu *surwiwiny*. Jego wyciszenie w komórkach raka piersi MDA-MB-435s przy użyciu ASO powodowało obniżenie poziomu *surwiwiny* i indukcję apoptozy [91].

Ostatnio przedstawiono wyniki wskazujące, że ekspresja genu opisywanego inhibitora apoptozy może

być również regulowana przez stabilizację mRNA oraz modulację jego translacji. Posługując się modelem raka prostaty, obserwowano wzrost ekspresji genu *surwiwiny* pod wpływem insulinopodobnego czynnika wzrostu IGF-1 (ang. *insulin-like growth factor-1*) [92]. Wzrost ten, indukowany przez IGF-1, całkowicie wyciszała rapamycyna, lek immunosupresyjny będący silnym inhibitorem kinazy mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*). W celu poznania mechanizmu leżącego u podłoża tego zjawiska, kolejne doświadczenia przeprowadzono na komórkach raka prostaty z nadeskpresją genu rybosomalnej kinazy p70S6K1 (w formie dzikiej albo zmutowanej odpornej na działanie rapamycyny). W opisanych warunkach doświadczalnych odnotowano, że IGF-1 specyficznie podwyższa poziom *surwiwiny* poprzez stymulację rybosomalnej kinazy p70S6K1 [92]. Wyniki tych fascynujących badań uwzględniają kontrolę ekspresji genu *surwiwiny* na kaskadowym szlaku kinaz PI3, AKT, mTOR oraz p70S6K1. Wskazanie na rybosomalną kinazę p70S6K1, jako pośrednika podczas aktywacji *surwiwiny* przez czynniki wzrostu, poszerzyło nie tylko naszą aktualną wiedzę dotyczącą regulacji ekspresji genu *surwiwiny*, lecz pozwala ponadto na opracowanie nowej strategii leczenia nowotworów, w których wysoka synteza *surwiwiny* łączy się ze złą prognozą.

Komórkowy poziom *surwiwiny* jest ponadto kontrolowany na poziomie białka, poprzez regulację jego stabilności. Degradacja białek na drodze proteasomalnej stanowi główny mechanizm modulujący obrót białek w komórkach, przy czym ich rekrutacja w proteasomie regulowana jest przez ich uprzednią poliubikwitylację. Z kolei podatność poszczególnych białek na ten proces jest uzależniona od stanu i rodzaju ich modyfikacji (np. fosforylacji, acetylacji, itd.), a także od wiązania się z innymi białkami, co może dodatkowo wpływać na ich stabilność. *Surwiwina* wiąże się z białkiem opiekuńczym Hsp90, co chroni ją przed szybką degradacją [93].

Biologiczna aktywność *surwiwiny* może być dodatkowo regulowana przez jej wewnątrzkomórkową lokalizację. Białko to uczestniczy w dwóch diametralnie różnych procesach – w regulacji apoptozy oraz mitozy. Ten stan „wymusza” jej odmienną lokalizację wewnątrzkomórkową, która w prawidłowych komórkach jest ściśle regulowana, podobnie jak jej ekspresja.

Jak ostatnio wykazano, cząsteczka *surwiwiny* jest wyposażona w motyw NES i, poprzez utworzenie kompleksu z receptorowym białkiem eksportowym – CRM-1, podlega regulowanemu transportowi, który jest wrażliwy na traktowanie leptomycyną B [40,94]. Molekularna etykieta eksportowa NES okazuje istotne znaczenie dla biologicznej aktywności *surwiwiny*. Delecja NES prowadzi do zaburzeń oddziaływania pomiędzy *surwiwiną* a CRM-1, uniemożliwiając tym samym prawidłową lokalizację *surwiwiny* w centrosomach, co w konsekwencji zaburza funkcję składników tego kompleksu. Dowiedziono, że białko CRM-1 pośredniczy w umieszczeniu *surwiwiny* w centrosomach. Wygaszenie jego ekspresji przez siRNA lub inaktywację genu zapobiega usytuowaniu *surwiwiny* w centrosomach [40].

CZY SURWIWINA STANOWI BIOMARKER I MOŻE MIEĆ CHARAKTER WSKAŹNIKA PROGNOSTYCZNEGO?

Markerem nowotworowym z reguły nazywa się czynnik wielocząsteczkowy, najczęściej białko ze składnikiem lipidowym, cukrowym czy też glikolipidowym, który z uwagi na pełnioną funkcję (enzym, receptor, czynnik transkrypcyjny, itp.) jest syntetyzowany wyłącznie w komórkach zmienionych nowotworowo, albo – jeżeli jego poziom jest niski – w komórkach prawidłowych i podczas kancerogenezy dochodzi do jego znacznego wzrostu, przewyższającego wielokrotnie ten osiągnięty w komórkach odnośnikowych. W oparciu o taką definicję (a szczególnie o jej drugi człon) wydaje się, że surwiwina spełnia te kryteria i można ją uznać za biomarker niektórych typów nowotworów [95,96].

Markery nowotworowe są przydatne nie tylko w diagnostyce schorzeń nowotworowych, tj. w wykrywaniu, lokalizacji

lub też określeniu stopnia zaawansowania klinicznego, ale także odgrywają rolę przy wyborze specyficznego leczenia oraz przy monitorowaniu skuteczności terapii. Ponadto, wykorzystując dane epidemiologiczne i wyniki analiz klinicznych, biomarkery mogą mieć charakter prognostyczny. Obserwacje dokonane w kilku ośrodkach naukowych wskazują, że ocena poziomu surwiwiny może stanowić wskaźnik prognostyczny m.in. w raku okrężnicy oraz skóry. Wysoki jej poziom w rakach okrężnicy, sutka oraz w chłoniakach zwykle wiąże się ze złym rokowaniem [1,2,79].

SURWIWINA JAKO CEL TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Surwiwina stała się obiektem opracowania potencjalnych strategii terapeutycznych na różnych poziomach jej regulacji. W chwili obecnej realizowane są dwie główne opcje leczenia: jedna – farmakologiczna, a druga – oparta na zastosowaniu

Tabela 1. Postulowane strategie leczenia nowotworów z wykorzystaniem wyciszenia ekspresji genu *surwiwiny*.

Rodzaj terapii	Model komórkowy	Skutki biologiczne	Piśmiennictwo
Terapia genowa			
Mutant Thr 34 →Ala –plazmid	komórki HeLa	apoptoza ↑	[41,42,104]
Mutant Cys 84 →Ala AAV	linie komórkowe raka jelita grubego i czerniaka oraz ksenotransplantaty	prolifерacja ↓ apoptoza ↑ wielkość guza ↓ angiogeneza ↓	[73,99]
Wygaszanie ekspresji			
Antysensowne oligonukleotydy (ASO)	różne linie komórek nowotworowych	prolifерacja ↓ apoptoza ↑	[73,97]
siRNA	linie komórkowe raka jelita grubego oraz ksenotransplantaty	prolifерacja ↓ apoptoza ↑ wielkość guza ↓	[80, 97]
Rybozomy	linie komórkowe czerniaka, raka sutka i prostaty oraz ksenotransplantaty	prolifерacja ↓ apoptoza ↑ wielkość guza ↓	[98]
Blokada transkrypcji przy użyciu niskocząsteczkowych inhibitorów			
M(4)N	różne linie komórek nowotworowych oraz ksenotransplantaty	prolifерacja ↓ apoptoza ↑ ekspresja genu <i>surwiwiny</i> ↓ ekspresja genu <i>CDK1</i> ↓	[100]
YM155	różne linie komórek nowotworowych oraz ksenotransplantaty	prolifерacja ↓ apoptoza ↑	[101]
	badania kliniczne obejmujące pacjentów z NHL i czerniakiem	wielkość guza ↓ apoptoza ↑	[101]
Interferencja wiązania białka HSP90			
Seferdyna	różne linie komórek nowotworowych oraz ksenotransplantaty	prolifерacja ↓ wielkość guza ↓ apoptoza ↑	[105]
	komórki prawidłowe	żywołność	[105]
Inhibitory kinaz – blokada fosforylacji surwiwiny			
Flawopirydol	linie komórkowe raka sutka i szyjki macicy	prolifерacja ↓ apoptoza ↑	[105]
Purvalanol	komórki HeLa	prolifерacja ↓ apoptoza ↑	[103]
NU6140	komórki HeLa	prolifерacja ↓ apoptoza ↑	[103]

zastosowaniu metod molekularnych, m.in. interferencji RNA lub terapii genowej (Tab. 1). Terapia oparta na zastosowaniu metod molekularnych, stawiając sobie za cel inaktywację prawidłowego genu *surwiwiny*, względnie zahamowanie jego transkrypcji, posługuje się różnymi narzędziami. Do ograniczania ekspresji używa się metody antysensownych oligonukleotydów [97] lub rybozomu [98]. Wygaszanie genu *surwiwiny* dokonuje się także przy użyciu małych interferencyjnych cząsteczek RNA [80] lub też przez wprowadzenie sondy ze zmutowanym w kodonie 84 (Cys84Ala) genem *surwiwiny*, którego produkt wykazuje zmienione właściwości biologiczne [99]. W pierwszych

próbach jako nośnika transportującego sondę genetyczną stosowano plazmidy albo jako wektor – adenowirusy. Technologia ta okazała się mało skuteczna, ponieważ transfer DNA za pomocą plazmidów jest na ogół mało efektywny, a przydatność adenowirusów jest ograniczona, z uwagi na ich toksyczność i indukcję reakcji odpornościowych.

Większy sukces odnotowano, wykorzystując próby z zastosowaniem wektorów AAV (ang. *adeno-associated viral vectors*) [99]. Okazało się, że dotychczas są one jedynymi wektorami, które pozwalają w efektywny sposób na długotrwałą ekspresję transgeny, zarówno w szybko dzielących się, jak i w komórkach spoczynkowych. Wektory AAV nie są patogenne ani nie cechują się zdolnością do replikacji. Zastosowanie tej technologii może okazać się szczególnie korzystne w leczeniu schorzeń nowotworowych przewodu pokarmowego, m. in. raka okrężnicy. Stwierdzono bowiem, że jelito jest naturalnym gospodarzem dla AAV i dodatkowo można doustnie stosować zaprojektowany lek z wykorzystaniem tego wektora. Po doustnym podaniu wektora AAV wykazano długotrwałą ekspresję transgeny zarówno w komórkach nabłonka, jak i również w komórkach blaszki właściwej. Wprowadzenie zmutowanego genu *surwiwiny* (Cys84Ala) do komórek raka okrężnicy prowadziło do zahamowania ich namnażania się oraz spowodowało spontaniczną katastrofę mitotyczną oraz apoptozę. Ponadto, ujawniono, że zmutowany gen *surwiwiny* (Cys84Ala) uwrażliwiał komórki nowotworowe na działanie leków cytostatycznych. Ekspresja tak zmutowanego genu hamowała proces nowotworzenia komórek okrężnicy. Miejscowe wstrzykiwanie wektora AAV ze zmutowanym genem *surwiwiny* do ksenotransplantów zwierzęcego modelu wywoływało katastrofę mitotyczną oraz apoptozę, a także hamowało angiogenezę [99]. Wyniki tych fascynujących doświadczeń są obiecujące i pozwalają żywić nadzieję, że wkrótce ten rodzaj terapii genowej znajdzie zastosowanie w próbach klinicznych.

Ostatnio zsyntetyzowano szereg związków niskocząsteczkowych, które wydają się być skuteczne w modulowaniu ekspresji genu *surwiwiny*, a niektóre z nich znajdują się już w fazie badań klinicznych. Jedną z tych substancji, kwas tetra-O-metylo-nordihydrogwajaretowy (M4N; ang. *tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid*), bezpośrednio hamuje transkrypcję genu *surwiwiny* regulowaną przez czynnik transkrypcyjny Sp1 oraz indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych [100]. Związek ten jednak jest mało selektywny, ponieważ blokuje ogólną transkrypcję. Znacznie bardziej specyficzny okazał się niskocząsteczkowy związek YM155, który hamuje transkrypcję genu *surwiwiny* i obniża syntezę białka. Obecnie YM155 znajduje się w fazie II badań klinicznych [101].

Innym podejściem terapeutycznym są próby obniżenia poziomu *surwiwiny* przez zmniejszenie jej stabilności, co można osiągnąć m.in. przeciwdziałając fosforylacji tego białka przy użyciu selektywnych inhibitorów kinaz lub zapobiegając tworzeniu kompleksów z białkiem szoku cieplnego – Hsp90. Dotychczas przeprowadzono wiele prób z zastosowaniem inhibitorów kinaz zależnych od cyklin, jak: flawopirydol, purwalanol [42,102] czy też NU6140 [103]. Najbardziej skuteczne okazało się działanie inhibitorów kinaz po uprzednim podaniu taksolu [103,104]. Zablokowa-

nie komórek nowotworowych w mitozie i wzrost fosforylacji Thr³⁴ *surwiwiny* spowodował ich większą podatność na działanie inhibitorów kinaz. Inna strategia oparta jest na zaburzeniu oddziaływania pomiędzy *surwiwiną* a białkiem opiekuńczym Hsp90 [105]. Testowane są obecnie substancje naśladujące oligopeptydy (ang. *peptidomimetics*), których sekwencje opracowano, znając strukturę *surwiwiny* w obrębie odcinka wiążącego Hsp90. Jedną z tych substancji, seferdyna (ang. *shepherdin*), obejmuje region *surwiwiny* pomiędzy Lys⁷⁹-Leu⁸⁷ [105]. Wykazano, że związek ten wykazuje wysoką selektywność wiązania się ze wspomnianym fragmentem białka, hamuje namnażanie się komórek nowotworowych i indukuje apoptozę. Ponadto powoduje destabilizację białek oddziałujących z Hsp90, m.in. *surwiwiny* czy kinazy AKT.

Przeciwdziałanie eksportowi *surwiwiny* z jądra komórkowego stanowi najnowszą opcję terapeutyczną [94]. koncepcja oparta na zastosowaniu *surwiwiny* z delecją NES lub specyficznych przeciwciał blokujących selektywnie ten motyw *surwiwiny* mogłaby stanowić interesującą alternatywę, ponieważ blokada jądrowego eksportu nie obejmowałaby innych białek, które oscylują pomiędzy cytosolem i jądrem komórkowym.

PIŚMIENNICTWO

1. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3: 917-921
2. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC (1998) Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 152: 43-49
3. Altieri DC, Marchisio C (1999) Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest* 79: 1327-1333
4. Kallio MJ, Nieminen M, Eriksson JE (2001) Human inhibitor of apoptosis proteins (IAP) survivin participates in regulation of chromosome segregation and mitotic exit. *FASEB J* 15: 2721-2723
5. Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbsky GJ, Tognin S, Marchisio PC, Symons M, Altieri DC (2002) Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res* 62: 2462-2467
6. Lens SMA, Medema RH (2003) The survivin/Aurora B complex. *Cell Cycle* 2: 507-510
7. Skoufias DA, Mollinari C, Lacroix FB, Margolis RL (2000) Human survivin is a kinetochore-associated passenger protein. *J Cell Biol* 151: 1575-1582
8. Wheatley SP, Carvalho A, Vagnerelli P, Earnshaw WC (2001) INCENP is required for proper targeting of survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr Biol* 10: 1319-1328
9. Carvalho A, Carmena M, Sambade C, Earnshaw WC, Wheatley SP (2003) Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J Cell Sci* 116: 2987-2998
10. Wheatley SP, McNeish IA (2005) Survivin: A protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *Int Rev Cytol* 247: 35-88
11. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC (1998) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396: 580-584
12. Otaki M, Hatano M, Kobayashi K, Osagawa T, Kuriyama T, Tokuhisa T (2000) Cell cycle-dependent regulation of TIAP/m-survivin expression. *Biochim Biophys Acta* 1493: 188-194
13. Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC (2004) Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* 114: 1117-1127
14. Wolanin K, Piwocka K (2007) Rola i znaczenie *surwiwiny* w przebiegu mitozy. *Postepy Biochem* 53: 10-18

15. Crook NE, Clem RJ, Miller LK (1993) An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 67: 2168-2174
16. Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferrenz C, Franklin S, Ghayur T, Li P, Licari P, Mancovitch J, Shi L, Greenberg AH, Miller L, Wong WW (1995) Inhibition of ICE family protease by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 269: 1885-1888
17. Deveraux QL, Reed JC (1999) IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13: 239-253
18. Kilianska ZM (2002) Apoptoza organizmów zwierzęcych, W: Klyszejko-Stefanowicz L (red). *Cytobiochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 772-815
19. Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL (2001) Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol* 2, dostępne na <http://genomebiology.com/2001/2/7review/3009.1-3009.10>
20. Schimmer AD (2004) Inhibitor of apoptosis proteins. Translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 64: 7183-7190
21. Le Blanc AC (2003) Natural cellular inhibitors of caspases. *Prog Neuropsych Pharmacol Biol Psychiatry* 27: 215-229
22. Shin H, Renatus M, Eckelman BP, Nunes VA, Sampaio CA, Salvesen GS (2005) The BIR domain of IAP-like protein is conformationally unstable: implications for caspase inhibition. *Biochem J* 385: 1-10
23. Vucic D, Franklin MC, Wallweber HJ, Das K, Eckelman BP, Shin H, Elliott LO, Kadkhodayan S, Deshayes K, Salvesen GS, Fairbrother WJ (2005) Engineering ML-IAP to produce an extraordinarily potent caspase 9 inhibitor: implications for Smac-dependent anti-apoptotic activity of ML-IAP. *Biochem J* 385: 11-20
24. Verhagen AM, Kratina TK, Hawkins CJ, Silke J, Ekert PG, Vaux DL (2007) Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs *via* N-terminal IAP binding motifs. *Cell Death Differ* 14: 348-357
25. Martin SJ (2004) Apollon vista of death and destruction. *Nature Cell Biol* 6: 804-806
26. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD (1999) Survivin-ΔEx3 and survivin-2B: Two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res* 59: 6097-6102
27. Li FZ, Altieri DC (1999) The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional recruitments of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Res* 59: 3143-3151
28. Zhou M, Gu L, Li F, Zhu Y, Woods WG, Findley HW (2002) DNA damage induced a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* 303: 124-131
29. Jiang Y, Saavedra HJ, Holloway MP, Leone G, Altura RA (2004) Aberrant regulation of survivin by the Rb/E2F family of proteins. *J Biol Chem* 279: 40511-40520
30. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen JD, Murphy M (2002) Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 277: 3247-3257
31. Chantalat L, Skoufias DA, Kleman JP, Jung B, Didebery O, Margolis RL (2000) Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extension. *Mol Cell* 6: 183-189
32. Rodriguez JA, Span SW, Ferreira CGM, Krut FAE, Giaccone G (2002) CRM1-mediated nuclear export determines the cytoplasmic localization of the antiapoptotic protein survivin. *Exp Cell Res* 275: 44-53
33. Sun C, Nettesheim D, Liu Z, Olejniczak ET (2005) Solution structure of human survivin and its binding interface with Smac/DIABLO. *Biochemistry* 44: 11-17
34. Song Z, Liu S, He H, Hoti N, Wang Y, Feng S, Wu M (2004) A single amino acid change (Asp53-Ala53) converts survivin from antiapoptotic to proapoptotic. *Mol Biol Cell* 15: 1287-1296
35. Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, Inuzuka M (2004) Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 902-907
36. Caldas H, Honsey LE, Altura RA (2005) Survivin 2 alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol Cancer* 4: 11-20
37. Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC (2002) Survivin exists in immunologically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci* 115: 575-585
38. Li F, Ackerman EL, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tongin S, Villa A, Marchisio PC, Altieri DC (1999) Pleiotropic cell-divisions defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nature Cell Biol* 1: 461-466
39. Mahotka C, Libmann J, Wenzel M, Suschek CV, Schmitt M, Gabbert ME, Gerharz CD (2002) Differential subcellular localization of divergent splice variants. *Cell Death Diff* 9: 1334-1342
40. Knauer SK, Bier C, Habtechael N, Stauber RH (2006) The survivin-Crm1 interaction is essential for chromosomal passenger complex localization and function. *EMBO Rep* 7: 1259-1265
41. O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li FZ, Zhang H, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC (2000) Regulation of apoptosis at cell division by p34^{cdc2} phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13103-13107
42. Wall NR, O'Connor DS, Plescia J, Pommier Y, Altieri DC (2003) Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Res* 63: 230-235
43. Wheatley SP, Henzing AJ, Dodson H, Khaled W, Earnshaw WC (2004) Aurora-B phosphorylation *in vitro* identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to INCEP *in vivo*. *J Biol Chem* 279: 5655-5660
44. Zhao J, Tenev T, Martins LM, Downward J, Lemoine NR (2000) The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci* 113: 4363-4371
45. Mahotka C, Krieg T, Krieg A, Wenzel M, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE, Gerharz CD (2002) Distinct *in vivo* expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 100: 30-36
46. Lens SMA, Vader G, Medema RH (2006) The case for survivin as a mitotic regulator. *Curr Opin Cell Biol* 18: 616-622
47. Vagnarelli P, Earnshaw WC (2004) Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* 113: 211-222
48. Johnson ME, Howerth EW (2004) Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Vet Pathol* 41: 599-607
49. Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS (2006) Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett* 244: 164-171
50. Song Z, Yao X, Wu M (2003) Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem* 278: 23130-23140
51. Colnaghi R, Connel CM, Barret RMA, Wheatley SP (2006) Separating the antiapoptotic and mitotic roles of survivin. *J Biol Chem* 281: 33450-33456
52. Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB (1996) A conserved family of cellular genes related to the baculovirus *iap* gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* 15: 2685-2694
53. Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Datta P, Alnemri ES, Shi Y (2001) Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 104: 769-780
54. Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y (2003) Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* 11: 519-527
55. Verdecia M, Huang H-K, Dutil E, Kaiser D, Hunter T, Noel J (2000) Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* 7: 602-608
56. Jiang X, Wilford D, Duensing S, Munger K, Jones D (2001) Participation of survivin in mitotic and apoptotic activities of normal and tumor-derived cells. *J Cell Biochem* 83: 342-354

57. Grossman D, Kim PJ, Blanc-Brude OP, Brash DE, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC (2001) Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteract UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. *J Clin Invest* 108: 991-999
58. Dohi T, Salz W, Costa M, Ariyan C, Bassadonna GP, Altieri DC (2006) Inhibition of apoptosis by survivin improves transplantation of pancreatic islets for treatment of diabetes in mice. *EMBO Rep* 7: 438-443
59. Altieri DC (2006) The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Cur Opin Cell Biol* 18: 609-615
60. Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR (1998) Cloning and characterization of a novel Hepatitis B Virus X Binding Protein that inhibits viral replication. *J Virol* 72: 1737-1743
61. Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC (2003) HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 22: 2729-2740
62. Fujii R, Zhu C, Wen Y, Marusawa H, Bailly-Maitre B, Matsuzawa S, Zhang H, Kim Y, Bennett CF, Jiang W, Reed JC (2006) HBXIP, cellular target of hepatitis B virus oncoprotein, is a regulator of centrosome dynamics and cytokinesis. *Cancer Res* 66: 9099-9107
63. Shirakata Y, Kawada M, Fujiki Y, Sano H, Oda M, Yaginuma K, Kobayashi M, Koike K (1989) The X gene of hepatitis B virus induced growth stimulation and tumorigenic transformation of mouse NIH3T3 cells. *Jpn J Cancer Res* 80: 617-621
64. Zentgraf H, Herrmann G, Klein R, Schranz P, Loncarevic I, Herrmann D, Hubner K, Schroder CH (1990) Mouse monoclonal antibody directed against hepatitis B virus X protein synthesized in *Escherichia coli*: detection of reactive antigen in liver cell carcinoma and chronic hepatitis. *Oncology* 47: 143-148
65. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102: 43-53
66. Vaux DL, Silke J (2003) Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 499-504
67. Mc Neish IA, Lopes R, Bell SJ, McKay TR, Fernandez M, Lockley M, Wheatley SP, Lemoine NR (2005) Survivin interacts with Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis. *Exp Cell Res* 302: 69-82
68. Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, Marusawa H, Zou H, Armstrong R, Matsuzawa S, Salvesen GS, Reed JC, Altieri DC (2004) An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem* 279: 34087-34090
69. Liu T, Brouha B, Grossman D (2004) Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in survivin-targeted melanoma cells. *Oncogene* 23: 39-48
70. Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC (1999) Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. *Lab Invest* 79: 1121-1126
71. Deguchi M, Shiraki K, Inoue H, Okano H, Ito T, Yamanaka T, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, Murata K, Furusaka A, Hisatomi H, Nakano T (2002) Expression of survivin during liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 59-64
72. Altura RA, Olshefski RS, Jiang Y, Boue DR (2003) Nuclear expression of survivin in paediatric ependymomas and choroids plexus tumours correlates with morphologic tumour grade. *Br J Cancer* 89: 1743-1749
73. Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC (1999b) Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J Invest Dermatol* 113: 1076-1081
74. Takeuchi H, Morton DL, Elashoff D, Hoon DS (2005) Survivin expression by metastatic melanoma predicts poor disease outcome in patients receiving adjuvant polyvalent vaccine. *Int J Cancer* 117: 1032-1038
75. Allen SM, Florell SR, Hanks AN, Alexander A, Diedrich MJ, Altieri DC, Grossman D (2003) Survivin expression in mouse skin prevents papilloma regression and promotes chemical-induced tumor progression. *Cancer Res* 63: 567-572
76. Ansell SM, Arendt BK, Grote DM, Jelinek DF, Novak AJ, Wellik LE, Remstein ED, Bennett CF, Fielding A (2004) Inhibition of survivin expression suppresses the growth of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 18: 616-623
77. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N (1998) Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 58: 5071-5074
78. Chen WC, Liu Q, Fu JX, Kang SY (2004) Expression of survivin and its significance in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 10: 2886-2889
79. Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K, Tenjo T, Tanigawa N (2001) Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer* 91: 2026-2032
80. Williams NS, Gaynor RB, Scoggin S, Verma U, Gokaslan T, Simmang C, Fleming J, Tavara D, Frenkel E, Becerra C (2003) Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin Cancer Res* 9: 931-946
81. Islam A, Kageyama H, Hashizume K, Kaneko Y, Nakagawara A (2000) Role of survivin, whose gene is mapped to 17q25, in human neuroblastoma and identification of a novel dominant-negative isoform, survivin-beta/2B. *Med Pediatr Oncol* 35: 550-553
82. Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Muller W, Takeno S, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE, Gerharz CD (2002) Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. *Br J Cancer* 86: 737-743
83. Fangusaro JR, Jiang Y, Holloway MP, Caldas H, Singh V, Boue DR, Hayes J, Altura RA (2005) Survivin, survivin-2B, and survivin-delta-Ex3 expression in medulloblastoma: biological markers of tumor morphology and clinical outcome. *Br J Cancer* 92: 359-365
84. Zwicker J, Lucibello FC, Wolfrum LA, Gross C, Truss M, Engeland K, Muller R (1995) Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. *EMBO J* 14: 4514-4522
85. Xu Y, Fang F, Ludewig G, Jones G, Jones D (2004) A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells. *DNA Cell Biol* 23: 527-537
86. Węsierska-Gądek J, Schmid G (2005) The subcellular distribution of the p53 tumour suppressor, and organismal ageing. *Cell Mol Biol Lett* 10: 439-453
87. Imbriano C, Gurtner A, Cocchiarella F, Di Agostino S, Basile V, Gostissa M, Dobbstein M, Del Sal G, Piaggio G, Mantovani R (2005) Direct p53 transcriptional repression: *in vivo* analysis of CCAAT-containing G2/M promoters. *Mol Cell Biol* 25: 3737-3751
88. Rother K, Li YY, Tschopp K, Kirschner R, Muller GA, Mossner J, Engeland K (2007) Expression of cyclin-dependent kinase subunit 1 (Cks1) is regulated during the cell cycle by a CDE/CHR tandem element and is downregulated by p53 but not by p63 or p73. *Cell Cycle* 6: 853-862
89. Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ, Boman BM (2001) Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* 61: 8664-8667
90. Kim EH, Kim SU, Shin DY, Choi KS (2003) Roscovitine sensitizes glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by downregulation of survivin and XIAP. *Oncogene* 23: 446-456
91. Gritsko T, Williams A, Turkson J, Kaneko S, Bowman T, Huang M, Nam S, Eweis I, Diaz N, Sullivan D, Yoder S, Enkemann S, Eschrich S, Lee JH, Beam CA, Cheng J, Minton S, Murocacho CA, Jove R (2006) Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 12: 11-19
92. Vaira V, Lee CW, Goel HL, Bosari S, Languino LR, Altieri DC (2007) Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling. *Oncogene* 26: 2678-2684
93. Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, Fontana J, Pradhan D, Marchisio PC, Sessa WC, Altieri DC (2003) Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 13791-13796
94. Knauer SK, Mann W, Stauber RH (2007) Survivin's dual role: an export's view. *Cell Cycle* 6: 518-521

95. Ohsawa I, Nishimura T, Kondo Y, Kimura G, Satoh M, Matsuzawa I, Hamasaki T, Ohta S (2004) Detection of urine survivin in 40 patients with bladder cancer. *J Nippon Med Sch* 71: 379-383
96. Osaka E, Suzuki T, Osaka S, Yoshida Y, Sugita H, Asami S, Tabata K, Hemmi A, Sugitani M, Nemoto N, Ryu J (2006) Survivin as a prognostic factor for osteosarcoma patients. *Acta Histochem Cytochem* 39: 95-100
97. Xia C, Xu Z, Yuan X, Uematsu K, You L, Li K, Li L, McCormick F, Jablons DM (2002) Induction of apoptosis in mesothelioma cells by antisurvivin oligonucleotides. *Mol Cancer Ther* 1: 687-694
98. Pennati M, Binda M, Colella G, Folini M, Citti L, Villa R, Daidone MG, Zaffaroni N (2003) Radiosensitization of human melanoma cells by ribozyme-mediated inhibition of survivin expression. *J Invest Dermatol* 120: 648-654
99. Tu SP, Cui JT, Liston P, Huajiang X, Xu R, Lin MC, Zhu YB, Zou B, Ng SS, Jiang SH, Xia HH, Wong WM, Chan AO, Yuen MF, Lam SK, Kung HF, Wong BC (2005) Gene therapy for colon cancer by adeno-associated viral vector-mediated transfer of survivin Cys84Ala mutant. *Gastroenterology* 128: 361-375
100. Chang CC, Heller JD, Kuo J, Huang RC (2004) Tetra-o-methyl nordihydroguaiaretic acid induces growth arrest and cellular apoptosis by inhibiting Cdc2 and survivin expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13239-13244
101. Mita MM, Mita AC, Tolcher AW (2006) Apoptosis mechanism and implications for cancer therapeutics. *Targ Oncol* 1: 197-214
102. Zaffaroni N, Pennati M, Colella G, Perego P, Supino R, Gatti L, Pilotti S, Zunino F, Daidone MG (2002) Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cell Mol Life Sci* 59: 1406-1412
103. Pennati M, Campbell AJ, Curto M, Binda M, Cheng Y, Wang LZ, Curtin N, Golding BT, Griffin RJ, Harcastle IR, Henderson A, Zaffaroni N, Newell DR (2005) Potentiation of paclitaxel-induced apoptosis by the novel cyclin-dependent kinase inhibitor NU6140: a possible role for survivin-down regulation. *Mol Cancer Ther* 4: 1328-1337
104. O'Connor DS, Wall NR, Porter AC, Altieri DC (2002) A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* 2: 43-54
105. Plescia J, Salz W, Xia F, Pennati M, Zaffaroni N, Daidone MG, Meli M, Dohi T, Fortugno P, Nefedova Y, Gabrilovich DI, Colombo G, Altieri DC (2005) Rational design shepherdin. A novel anti-cancer agent. *Cancer Cell* 7: 457-468

New face of antiapoptotic proteins. II. Survivin

Józefa Węsierska-Gądek¹, Jolanta Bednarek², Zofia M. Kiliańska^{2,✉}

¹Cell Cycle Regulation Group, Institute of Cancer Research, Department of Medicine I, Medical University of Vienna, Borschkegasse 8 a, A-1090 Vienna, Austria

²Department of Cytobiochemistry, University of Lodz, 12/16 Banacha St., 90-237 Lodz, Poland

✉ e-mail: zkilian@biol.uni.lodz.pl

Key words: apoptosis, IAP, survivin, cell cycle, carcinogenesis

ABSTRACT

Survivin (mol.wt. 16.5 kDa; pI 5.1) belongs to the IAPs family – inhibitors of apoptosis. The human survivin protein contains an N-terminal BIR domain connected with a C-terminal, α -helical domain interacting with microtubules *via* a linker region. The BIR domain of the protein exhibits anti-apoptotic activity and plays a role in the binding of the chromosomal passenger complex (CPC) to the centromere regions of chromosomes. Alternative splicing of the human *survivin* gene gives rise to five different mRNA transcripts yielding wild-type survivin (142 aa) and four isoforms of the protein. In this review, the structure, features, and functions of wild-type survivin and its isoforms in the apoptotic process, cell cycle, and carcinogenesis as well as the significance of this protein as potential neoplastic marker are presented. Moreover, insights into the development of new anti-cancer therapeutic strategies targeting survivin are overviewed.

Katarzyna Oszajca[✉]

Janusz Szemraj

Jacek Bartkowiak

Zakład Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

[✉]Zakład Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; tel.: (042) 678 24 65, e-mail: kasia_osz@o2.pl

Artykuł otrzymano 17 stycznia 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 19 marca 2007 r.

Słowa kluczowe: tlenek azotu, nadtlenoazotyn, ekspresja genów, S-nitrozylacja, czynniki transkrypcyjne

Wykaz skrótów: AP-1 (ang. *activator protein-1*) – białko aktywujące (czynnik transkrypcyjny); HIF-1 (ang. *hypoxia-inducible factor-1*) – czynnik indukowany przez hipoksję 1; HRE (ang. *hypoxia response element*) – element odpowiedzi na hipoksję; ICE (ang. *interleukin-1 β converting enzyme*) – enzym konwertujący interleukinę 1 β ; IRE (ang. *iron responsive element*) – sekwencje reagujące na żelazo; IRP (ang. *iron regulatory protein*) – białko regulujące homeostazę żelaza; NF- κ B (ang. *nuclear factor kappa B*) – jądrowy czynnik transkrypcyjny; NOS (ang. *nitric oxide synthase*) – syntaza tlenu azotu; TACE (ang. *tumor necrosis factor-alpha converting enzyme*) – enzym konwertujący czynnik martwicy nowotworów-a

Podziękowanie: Praca powstała podczas realizacji grantu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr 2P05A 141 29

STRESZCZENIE

W ciągu ostatnich ponad 20 lat tlenek azotu stał się przedmiotem intensywnych badań w zakresie biologii molekularnej i innych dziedzin nauki. Prowadzone doświadczenia odkrywają jego ogromną rolę zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patofizjologicznych. Istotną cechą tlenu azotu jest jego udział w regulacji ekspresji genów. Mechanizmy tej regulacji opierają się przede wszystkim na działaniu pośrednim i polegają na modulacji czynników transkrypcyjnych, translacji i stabilności mRNA, a także na potranslacyjnej modyfikacji produktów określonych genów. Praca ma na celu przedstawienie dotychczasowej wiedzy na temat wpływu tlenu azotu na ekspresję genów eukariotycznych.

WPROWADZENIE

Tlenek azotu (NO) jest labilną cząsteczką, która może pełnić ważne funkcje biologiczne zarówno wewnątrz komórki, w której jest syntetyzowana, jak i poprzez oddziaływanie z komórkami i cząsteczkami sąsiadującymi. Ten wolny rodnik powstaje w organizmie z L-argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenu azotu (NOS, ang. *nitric oxide synthase*), występującą w postaci czterech izoform – neuronalnej, indukowalnej, śródbłonkowej oraz mitochondrialnej [1-5]. W warunkach fizjologicznych komórki śródbłonka naczyń krwionośnych, neurony i makrofagi wytwarzają niewielkie ilości NO, który bierze udział w regulacji ciśnienia krwi, przewodnictwie nerwowym, w reakcjach układu immunologicznego oraz w wielu innych funkcjach organizmu. Natomiast w różnych stanach patologicznych indukowalne izoformy NOS mogą produkować znaczne ilości tlenu azotu. Wówczas może być on odpowiedzialny za rozwój takich schorzeń, jak na przykład udar mózgu, cukrzyca czy choroby reumatyczne. Tlenek azotu działa jako wewnątrzkomórkowa cząsteczka przekazująca sygnały, której ostatecznym celem jest zmiana ekspresji określonych genów. Jednym z pierwszych genów, zidentyfikowanych jako podlegający transkrypcyjnej regulacji przez NO, był gen *NOS2* kodujący indukowalną izoformę NOS, co wskazuje na istnienie potencjalnego mechanizmu nadmiarowego tworzenia tlenu azotu w przewlekłych chorobach zapalnych [6]. Regulacja ekspresji genów przez tlenek azotu odbywa się przede wszystkim pośrednio i polega na modulacji czynników transkrypcyjnych, translacji i stabilności mRNA, a także na potranslacyjnej modyfikacji produktów określonych genów [7,8]. Niniejsza praca przedstawia dotychczasową wiedzę na temat wpływu tlenu azotu na ekspresję genów eukariotycznych.

MOLEKULARNY MECHANIZM DZIAŁANIA TLENU AZOTU

Tlenek azotu pełni w komórkach funkcje wtórnego przekaźnika, głównie dzięki jego prostej, dwuatomowej strukturze. Bierze udział w kilku złożonych reakcjach chemicznych, które odpowiadają określonym efektom biologicznym wywoływanym przez NO. Wyróżniamy zarówno bezpośrednie efekty działania tlenu azotu (reakcje NO z jonami metali przejściowych), jak również pośrednie, w których biorą udział pochodne tlenu azotu, powstałe w wyniku jego oddziaływanie z anionorodnikiem ponadtlenkowym czy tlenem cząsteczkowym (odpowiednio – reakcje tworzenia nadtlenoazotynu i S-nitrozylacji).

REAKCJE NO Z JONAMI METALI PRZEJŚCIOWYCH

NO posiada zdolność oddawania elektronów, zatem może reagować z jonami metali przejściowych, takimi jak żelazo, miedź czy cynk, z utworzeniem kompleksów metalo-nitrozylowych. Mechanizm ten odgrywa rolę w przebiegu różnych procesów, gdyż metale przejściowe są składnikami grup prostetycznych wielu enzymów i innych białek (np. żelazo grupy hemowej w cząsteczce cykazy guanylanowej, hemoglobina, mioglobina), jak również kontrolują połączenia siarkowe w enzymach (np. centra żelazowo-siarkowe w białkach łańcucha

oddechowego), czynnikach transkrypcyjnych (np. białka z motywem palca cynkowego, jak Sp-1 czy EGR-1) i białkach wiążących mRNA (np. IRP1). Tlenek azotu może wywierać wpływ zarówno aktywujący (cyklaza guanylanowa), jak i hamujący (domeny palca cynkowego) na funkcje poszczególnych białek [7].

TWORZENIE NADTLENOAZOTYNU

Tlenek azotu, będąc wolnym rodnikiem (NO), łatwo reaguje z anionorodnikiem ponadtlenkowym (O_2^-), tworząc nadtlendioazotyn (ONOO⁻) [9]. Nadtlendioazotyn jest bardzo reaktywny względem wszystkich klas cząsteczek organicznych, a więc białek, lipidów i kwasów nukleinowych. Jest silnym utleniaczem, który ma zdolność do utleniania reszt tiolowych do kwasu sulfenowego i sulfonowego oraz do nitrowania peptydów i białek. Nadtlendioazotyn modyfikuje reszty cysteinowe, metioninowe, tryptofanowe i tyrozynowe w łańcuchach peptydowych, co skutkuje zmianami funkcjonalnymi. Na przykład, nieodwracalna nitracja kluczowych reszt tyrozynowych może prowadzić do inaktywacji wielu enzymów, zmiany struktury białek, a także może wpływać na szlaki przekazywania sygnałów oparte na fosforylacji tyrozyny [7,10].

Nadtlenoazotyn może być regulatorem syntezy cytokin prozapalnych, takich jak czynnik martwicy nowotworów (TNF- α) czy interleukina 6 (IL-6), w komórkach jednojądrzastych człowieka. W działaniu tym pośredniczy jądrowy czynnik transkrypcyjny κ B (NF- κ B, ang. *nuclear factor κ B*), a mechanizm polega na nitracji lub defosforylacji inhibitora tego czynnika – I κ B- α [10].

Nadmierna produkcja nadtlendioazotynu prowadzi do nitracji białek, zahamowania mitochondrialnego łańcucha oddechowego, upośledzenia energetyki komórkowej, uszkodzenia DNA, apoptozy czy śmierci komórki, a w konsekwencji do rozwoju komórkowego lub tkankowego stanu chorobowego [11]. Zwiększone ilości ONOO⁻ towarzyszą między innymi hipercholesterolemii, nadciśnieniu, cukrzycy czy zawałowi mięśnia sercowego [12]. Jedną z przyczyn nadmiernej syntezy nadtlendioazotynu jest niedobór kofaktora dla syntaz tlenku azotu – tetrahydrobiopteryny. Według Channona [13], ograniczenie dostępności lub brak tego kofaktora prowadzi do zaburzenia aktywności endotelialnej izoformy syntazy NO. Możliwy jest jednak przepływ elektronów z NADPH poprzez koenzymy flawinowe na tlen cząsteczkowy, ale skutkujący syntezą anionorodnika ponadtlenkowego (substratu w produkcji ONOO⁻) i/lub nadtlenu wodoru. Również niedobór L-argininy – substratu w syntezie tlenku azotu – może przyczynić się do nadmiernej produkcji nadtlendioazotynu. Zbadano, że w komórkach makrofagów o obniżonym stężeniu argininy, indukowalna izoforma NOS produkuje zarówno anionorodnik ponadtlenkowy, jak i tlenek azotu, które mogą reagować ze sobą, tworząc ONOO⁻ [14].

Tlenek azotu może być regenerowany z nadtlendioazotynu przez reduktazę azotynową. Enzym ten pobiera niezbędne do redukcji elektrony z NADH lub NADPH, a także współpracuje z flawoproteinami i cytochromami. Reduktaza azotynowa nie tylko wydłuża efektywny czas trwania NO, ale

również zmniejsza stężenie bardzo reaktywnych wtórnych metabolitów [15].

S-NITROZYLACJA

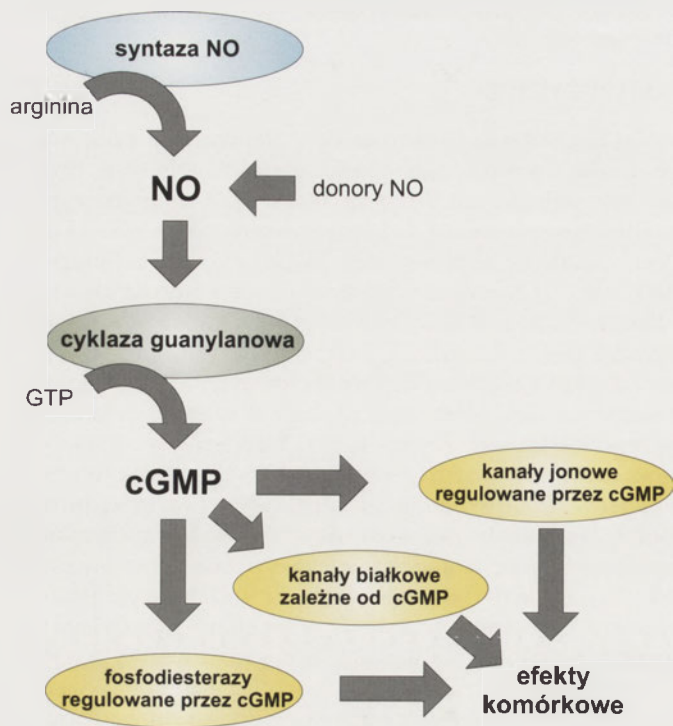
Oddziaływanie tlenku azotu z tlenem cząsteczkowym prowadzi do utworzenia tlenku azotu III (N_2O_3) w procesie tzw. autooksydacji tlenku azotu. N_2O_3 ulega następnie szybkiemu rozpadowi do jonu nitrozonowego (NO⁺) i azotynu. Szybkość autooksydacji zależy głównie od stężenia NO oraz O_2 i znacząco wzrasta w obrębie błon lipidowych. Oznacza to, że szybkość tworzenia N_2O_3 jest duża w miejscu syntezy tlenku azotu [11]. S-nitrozotiole powstają w wyniku oddziaływania jonów nitrozonowych na grupy tiolowe pewnych białek. Jeżeli S-nitrozylacja dotyczy enzymów czy czynników transkrypcyjnych, dla których reszty cysteinowe oraz tworzenie lub rozrywanie mostków disiarczkowych są kluczowe w utrzymaniu ich struktury czwartorzędowej i funkcji, oczywiste jest, że nitrozylacja jest w tym przypadku istotnym mechanizmem przekazywania sygnałów przez NO. Regulacja funkcji białek poprzez potranslacyjną modyfikację grup tiolowych cysteiny w wyniku S-nitrozylacji jest analogiczna do regulacji białek na zasadzie fosforylacji [16]. Badania potwierdzają, że tlenek azotu może brać udział w szlakach przekazywania sygnałów poprzez nitrozylację na przykład: kinaz białek, fosfataz, białek G, kanałów jonowych, kinaz tyrozynowych, czynników transkrypcyjnych, takich jak NF- κ B, białko aktywujące 1 (AP-1, ang. *activator protein 1*) czy C/EBP (ang. *CAAT/enhancer binding protein*) [8]. Odwracalność tej modyfikacji potwierdza jej znaczenie dla wielu zdarzeń sygnalizacyjnych [7].

Fakt, że ponad 100 białek ulega nitrozylacji, wskazuje na znaczącą rolę NO w przekazywaniu sygnałów z udziałem tego mechanizmu. Na przykład: w wyniku S-nitrozylacji hamowana jest kinaza inhibitora I κ B - IKK, a aktywacji ulega kinaza p21^{ras} [11,17,18].

Ze względu na ograniczoną trwałość tlenku azotu i ściśle określone miejsca syntezy, ważny jest dla jego funkcji sposób transportu tej cząsteczki. Za przENOŚniki NO uważane są niskocząsteczkowe S-nitrozotiole, jak również S-nitrozylowane białka. Są one wystarczająco trwałe, odwracalnie uwalniają jony NO⁺ i wtórnie nitrozylują różne cząsteczki docelowe. Badania przeprowadzone *in vitro* pokazują, że S-nitrozo-albumina i S-nitrozo-hemoglobina są głównymi transporterami tlenku azotu w krwi człowieka, uwalniającymi NO w warunkach niedotlenienia [7].

UDZIAŁ TIENKU AZOTU W PRZEKAZYWANIU SYGNAŁÓW

Za pomocą opisanych wyżej mechanizmów, tlenek azotu może brać udział w przekazywaniu sygnałów poprzez wpływ na kanały jonowe, białka G, kinazy tyrozynowe, kinazy Janus, kinazy białek aktywowane mitogenicznie (np. ERK, p38MAPK, JNK), kaspazy, metaloproteiny oraz fosfatazy białek [7]. Jednym z ważniejszych szlaków przeniesienia sygnału przez NO jest aktywacja cytoplazmatycznej cyklazy guanylanowej (sGC, ang. *soluble guanylyl cyclase*) (Ryc. 1). Tlenek azotu reaguje z żelazem hemowym w miejscu katalitycznym tego enzymu, co prowadzi do jego akty-



Rycina 1. Schemat przekazywania sygnałów przez tlenek azotu z udziałem cGMP.

wacji i syntezy cyklicznego 3',5'-guanozynomonofosforanu (cGMP). cGMP może regulować czynniki transkrypcyjne bezpośrednio poprzez indukowanie fosforylacji lub przez wzrost ekspresji białek. Do czynników transkrypcyjnych kontrolowanych przez cGMP na drodze zależnej od fosforylacji, należą: CREB (ang. *cAMP response element binding protein*), aktywujący czynnik transkrypcyjny 1 (ATF-1, ang. *activating transcription factor-1*) oraz wielofunkcyjny czynnik transkrypcyjny TFIIB. Natomiast do czynników transkrypcyjnych, których ekspresja regulowana jest przez cGMP, należą: białko aktywujące (AP-1, ang. *activator protein-1*), Egr-1 (ang. *early growth response gene-1*) i GAX (ang. *growth arrest-specific homeobox gene*). Ponadto cGMP może pośrednio regulować czynniki transkrypcyjne poprzez modulację szlaku przekazywania sygnału na czynnik transkrypcyjny. Przykładem jest regulacja przez cykliczny GMP inhibitora NF- κ B, I κ B. A poprzez aktywację lub hamowanie szlaku kinazy MAP, cGMP może regulować aktywność wielu czynników transkrypcyjnych, np.: TCF (ang. *ternary complex factor*), CREB, ATF-2 i c-Jun [19].

Głównym pośrednikiem w przekazywaniu sygnałów przez cykliczny guanozynomonofosforan jest kinaza białkowa zależna od cGMP (PKG, ang. *cGMP dependent protein kinase*). PKG jest kinazą serynowo-treoninową, aktywowaną po związaniu cGMP. Docelowe miejsca działania PKG są związane z relaksacją mięśni gładkich, aktywacją płytek krwi i neutrofilów oraz sekrecją jelitową. Do innych czynników pośredniczących w przenoszeniu sygnału za pomocą cGMP, należą: kanały bramkowane cyklicznymi nukleotydami, kinaza białkowa zależna od cAMP (PKA, ang. *cAMP dependent protein kinase*) i fosfodiesterazy [11] (Ryc. 1).

Kolejnym, dobrze poznanym mechanizmem przekazywania sygnałów przez tlenek azotu jest ścieżka z udziałem białka p21^{ras}. Należy ono do rodziny białek G, a gen kodujący je jest protoonkogenem. W formie związanej z guanozynotrifosforanem (GTP), p21^{ras} bierze udział w regulacji wielu procesów komórkowych, takich jak: apoptoza, wzrost i różnicowanie komórek. Badania wykazały, że tlenek azotu powoduje wzrost komórkowego poziomu Ras-GTP w wyniku S-nitrozylacji reszty cysteinowej w pozycji 118, ale dokładny mechanizm wymiany GDP na GTP w p21^{ras} za pośrednictwem NO nie jest znany [20-22]. Williams i wsp. zaobserwowali, że za wzmożoną wymianę nukleotydów guaninowych odpowiedzialny jest raczej sam chemiczny proces nitrozylacji, a nie końcowy produkt S-nitrozylacji Ras [20].

Miejszem bezpośredniej regulacji przez tlenek azotu jest również oksydaza cytochromu c – końcowy enzym łańcucha transportu elektronów w mitochondriach. Wykazano, że NO w sposób odwracalny hamuje funkcje oksydazy cytochromowej poprzez kompetycyjne wiązanie się w miejscu przyłączania tlenu. Wskutek tego następuje zahamowanie procesów oddychania komórkowego [23-25]. Głównym źródłem tlenu azotu jest tutaj mitochondrialna izoforma syntazy tlenu azotu (mtNOS) [26]. Mechanizm ten ma duże znaczenie w warunkach hipoksji. Łańcuch oddechowy wytwarza wówczas zwiększone ilości anionorodnika ponadtlenkowego, głównego czynnika odpowiedzialnego za uszkodzenia komórkowe związane z obniżonym poziomem tlenu. Generowany przez mtNOS tlenek azotu może w znacznym stopniu hamować mitochondrialny łańcuch oddechowy, a zatem i produkcję O₂⁻. Ponadto, NO z łatwością reaguje z anionorodnikiem, tworząc nadtlenuazotyn. Oba te efekty jego działania odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi obronnej organizmu na obniżony poziom tlenu [27]. Tlenek azotu reaguje również z cząsteczką katalazy, zawierającą żelazo hemowe, co skutkuje zmniejszeniem aktywności tego enzymu i, w konsekwencji, prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia nadtlenu wodoru [28].

REGULACJA EKSPRESJI GENÓW NA POZIOMIE TRANSKRYPCJI

Regulacja ekspresji genów na poziomie transkrypcji zachodzi z udziałem czynników transkrypcyjnych. Są to białka regulatorowe, wiążące się do określonych miejsc w cząsteczce DNA i „mobilizujące” polimerazę RNA do rozpoczęcia procesu transkrypcji. Posiadają sekwencje odpowiadające za wiązanie DNA oraz domenę transaktywacyjną. Wiadomo, że liczne czynniki transkrypcyjne mogą być regulowane przez stan redoks, czyli również przez tlenek azotu, zarówno potranslacyjnie – przez bezpośrednią modyfikację białka, jak również pośrednio – przez zmianę szybkości ich transkrypcji [29].

Najważniejszymi czynnikami transkrypcyjnymi, podlegającymi regulacji przez tlenek azotu, są: NF- κ B, AP-1, HIF-1 oraz czynniki transkrypcyjne z motywem palca cynkowego (Tab. 1).

Tabela 1. Udział tlenu azotu w regulacji czynników transkrypcyjnych [7,11,18,30].

Czynnik transkrypcyjny	Mechanizm działania NO	Efekt działania NO
NF-κB	S-nitrozyłacja Cys ⁶² w p50	zahamowanie wiązania się z DNA
	S-nitrozyłacja Cys ¹⁷⁹ w IKK	↓ aktywności
AP-1	S-nitrozyłacja Cys ¹¹⁸ w p21 ^{ras}	↑ aktywności
	S-nitrozyłacja Cys ²⁷² w c-Jun, S-nitrozyłacja Cys ¹⁵⁴ w c-Fos i S-glutationylacja Cys ²⁶⁹ w domenie wiążącej DNA	zahamowanie wiązania się z DNA
	S-nitrozyłacja Cys ¹¹⁶ w JNK	↑ aktywności
	wzrost ekspresji <i>c-fos</i> na drodze niezależnej od cGMP	↑ aktywności
HIF-1	wzrost aktywności hydroksylaz proлилowych (normoksja)	stabilizacja HIF-1α, zwiększone wiązanie się z DNA
	hamowanie cyt c (hipoksja, niskie stęż NO)	destabilizacja HIF-1α
Czynniki transkrypcyjne z motywem palca cynkowego	rozrywanie kompleksów Zn-S	↓ aktywności

TLENEK AZOTU A CZYNNIK TRANSKRYPCYJNY NF-κB

Czynnik transkrypcyjny NF-κB należy do rodziny NF-κB/Rel, której członkowie wykazują obecność regionu homologicznego, obejmującego pierwszych 300 N-końcowych aminokwasów, zwanego domeną homologiczną Rel (RHD). Domena ta odpowiedzialna jest za dimeryzację, wiązanie DNA oraz przemieszczanie NF-κB do jądra komórkowego. Składa się z 3 regionów: sekwencji lokalizacji jądrowej, domeny wiążącej DNA oraz regionu dimeryzacji. Funkcjonalny czynnik NF-κB jest dimerem złożonym wybiórczo z białek p50, p52, RelA (p65), RelB lub RelC (najczęściej jest kompleksem podjednostek p50 i RelA). Gdy nie działa bodziec stymulujący, sekwencja lokalizacji jądrowej blokowana jest przez białko hamujące IκB, utrzymujące czynnik transkrypcyjny NF-κB w cytosolu komórki [31,32]. Do rodziny białek IκB należą: IκB-α, IκB-β, Bcl-3, IκB-ε, p100/IκB-δ, p105/IκB-γ oraz IκB-R [33]. Pod wpływem czynników aktywujących białko NF-κB, dochodzi do fosforylacji inhibitora przez kinazę IκB (IKK) w miejscach reszt serynowych Ser-32 i Ser-36, co powoduje ubikwitylację za pomocą ligazy ubikwitylowej i, w konsekwencji, degradację białka IκB poprzez proteasom 26S [34]. Oddysocjowanie inhibitora odsłania sygnał lokalizacji jądrowej w domenie homologicznej Rel czynnika transkrypcyjnego NF-κB, wskutek czego ulega on szybkiej translokacji do jądra komórkowego, gdzie z dużym powinowactwem wiąże się z elementami κB promotorów odpowiednich genów [34,35].

Występuje kilka miejsc modulacji aktywności NF-κB przez tlenek azotu. Przede wszystkim NO hamuje zdolność NF-κB do wiązania się z DNA poprzez S-nitrozyłację kluczowej reszty cysteinowej w podjednostce p50. Poza tym zbadano, że tlenek azotu moduluje aktywność NF-κB poprzez oddziaływanie na kaskady sygnalizacyjne regulujące aktywację tego czynnika transkrypcyjnego. Przykładem może być białko p21^{ras} aktywowane przez stres oksydacyjny i powodujące wzrost aktywności NF-κB. Tlenek azotu aktywuje p21^{ras} poprzez S-nitrozyłację w miejscu Cys¹¹⁸. Inny mechanizm polega na nitrozyłacji kinazy IKK w miejscu Cys¹⁷⁹, co hamuje jej aktywność, a zatem i fosforylację inhibitora IκB. Wiąże się to ze zmniejszoną aktywnością czynnika NF-κB. NO powoduje także wzrost i stabilizację ekspresji mRNA IκBα oraz translokację IκBα z cytosolu do jądra komórkowego. I w końcu – tlenek azotu może reagować z anionorodnikiem ponadtlenkowym O₂⁻, zmniejszając w ten sposób ilość tworzonego H₂O₂, a tym samym aktywność NF-κB. Nadtlenek wodoru sprzyja bowiem fosforylacji inhibitora IκB i jego degradacji, co prowadzi do translokacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB do jądra komórkowego [7,11,29,36,37].

Tlenek azotu może zatem zarówno aktywować, jak i hamować transkrypcję genów zależną od NF-κB, w zależności od rodzaju komórek, czynników aktywujących, źródeł tlenu azotu i jego stężenia oraz stanu redoks komórki.

TLENEK AZOTU A CZYNNIK TRANSKRYPCYJNY AP-1

Tlenek azotu ma również wpływ na czynnik transkrypcyjny AP-1 (ang. *activator protein 1*) [38]. Jest on zbudowany z produktów protoonkogenów *c-jun* oraz *c-fos* i występuje w postaci kompleksu homodimersyjnego (Jun/Jun) lub heterodimersyjnego (Jun/Fos). Czynniki AP-1 wiąże się z elementem TRE (ang. *tetradecanoylphorbol-13-acetate response element*), obecnym w promotorach wielu różnych genów biorących udział w proliferacji komórek i procesie nowotworzenia. Wiązanie się AP-1 do TRE wymaga oddziaływania podjednostek Jun i Fos za pomocą domeny zamka leucynowego [34,35,39].

Wyniki badań wskazują na udział tlenu azotu w regulacji aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1, a efekt jego działania wydaje się być zależny od rodzaju komórek i stężenia NO. Tlenek azotu może w sposób odwracalny hamować wiązanie podjednostek AP-1 do DNA w wyniku S-nitrozyłacji kluczowych reszt cysteinowych w regionie wiążącym DNA zarówno c-Fos, jak i c-Jun. Natomiast zwiększenie aktywności AP-1 następuje w wyniku wzrostu ekspresji *c-fos* na drodze zależnej od cGMP lub poprzez aktywację kinazy JNK (ang. *c-jun-N-terminal kinase*) [11,40]. Nie do końca jednak poznane są warunki, w jakich tlenek azotu może wpływać aktywująco lub hamująco na czynnik AP-1.

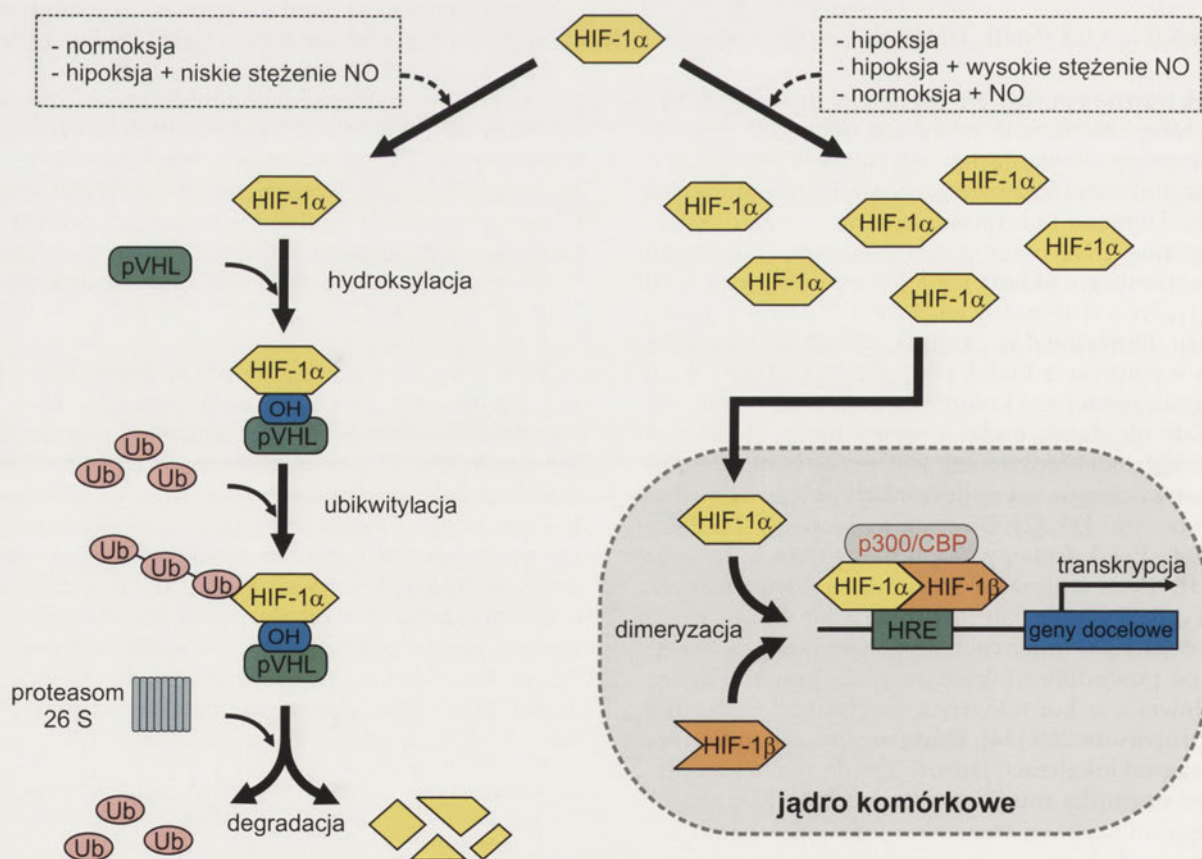
TLENEK AZOTU A CZYNNIK TRANSKRYPCYJNY HIF-1

Czynnik transkrypcyjny indukowany przez hipoksję (HIF-1, ang. *hypoxia-inducible factor-1*) jest kluczowym re-

regulatorem ekspresji genów biorących udział w odpowiedzi komórek i tkanek na obniżony poziom tlenu. Czynnikiem ten jest heterodimerem złożonym z podjednostek HIF-1 α oraz HIF-1 β . Białko HIF-1 β syntetyzowane jest w sposób ciągły, natomiast ekspresja podjednostki HIF-1 α zależna jest od poziomu tlenu. W warunkach normoksji (ok. 21% O₂) poziom mRNA i białka HIF-1 α jest bardzo niski. Następuje wówczas hydroksylacja (z udziałem tlenu cząsteczkowego jako substratu) dwóch reszt prolinowych (Pro⁴⁰² i Pro⁵⁶⁴) oraz acetylacja reszty lizynowej (Lys⁵³²) w domenie ODDD (ang. *oxygen-dependent degradation domain*) tej podjednostki, a następnie przyłączenie białka regulatorowego von Hippel-Lindau (pVHL). W konsekwencji prowadzi to do rozkładu HIF-1 α poprzez zależny od ubiquityny system degradacji białek w proteasomach. Z kolei hydroksylacja reszty asparaginowej w miejscu Asn⁸⁰³ C-końcowej domeny transaktywacyjnej hamuje wiązanie się podjednostki HIF-1 α z koaktywatorem transkrypcyjnym CBP/p300 (ang. *cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein/p300*) i zapobiega w ten sposób transkrypcji docelowych genów. W warunkach hipoksji (poniżej 5% O₂) białko HIF-1 α staje się stabilne i ulega przemieszczeniu z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie łączy się z podjednostką HIF-1 β , a powstały kompleks staje się transkrypcyjnie aktywny. Kompleks ten wiąże się następnie z sekwencjami odpowiedzi na hipoksję HRE (ang. *hypoxia response element*) w miejscach regulatorowych docelowych genów i w obecności odpowiednich koaktywatorów transkrypcyjnych powoduje indukcję ekspresji tych genów [41,42].

Jednym z regulatorów aktywności białka HIF-1 jest tlenek azotu. Badania dowodzą, że efekt działania NO na ten czynnik transkrypcyjny może być przeciwstawny w zależności od tego, w jakich warunkach tlenowych się odbywa (Ryc. 2). W warunkach prawidłowego poziomu tlenu, generowany endogennie lub dostarczany egzogennie NO, sprzyja stabilizacji HIF-1 α oraz wiązaniu się czynnika indukowanego przez hipoksję z sekwencjami HRE, co, w konsekwencji, prowadzi do zwiększenia ekspresji genów docelowych [43]. Metzzen i wsp. [44] zbadali, że podczas normoksji tlenek azotu powoduje zmniejszenie aktywności hydroksylaz prolinowych katalizujących hydroksylację reszt prolinowych w podjednostce HIF-1 α , co hamuje degradację w proteasomach i prowadzi do nagromadzenia się tego białka. Końcowym efektem działania NO jest w tym przypadku aktywacja transkrypcji genów regulowanych przez HIF-1. Z kolei z badań przeprowadzonych przez Palmer i wsp. [45] wynika, że w warunkach prawidłowego ciśnienia tlenu, tlenek azotu powoduje wzrost ekspresji genów zależnych od czynnika transkrypcyjnego HIF-1 w wyniku S-nitrozylacji grup tiolowych obecnych w domenie ODDD podjednostki HIF-1 α oraz w centrach katalitycznych enzymów aktywujących ubiquitynę.

W stanie hipoksji natomiast tlenek azotu wpływa na stabilizację podjednostki HIF-1 α oraz aktywność transkrypcyjną czynnika HIF-1 zależnie od jego stężenia. Według Mateo i wsp. [46] niskie stężenie NO zapobiega akumulacji podjednostki HIF-1 α w warunkach obniżonego poziomu tlenu w wyniku hamowania przez tlenek azotu oksydazy



Rycina 2. Schemat aktywności czynnika transkrypcyjnego HIF-1 w warunkach normoksji, hipoksji oraz w obecności tlenu azotu.

cytochromu c (kompleks IV mitochondrialnego łańcucha oddechowego). Jednakże przy większych ilościach tlenu azotu następuje stabilizacja tej podjednostki, a efekt ten jest niezależny od łańcucha oddechowego. Z badań przeprowadzonych przez Hagen i wsp. [47] wynika, że destabilizacja HIF-1 α , wskutek zahamowania łańcucha oddechowego w warunkach hipoksji, związana jest z aktywnością hydroksylaz prolinowych. Ponieważ inhibitory oddychania (jakim jest również tlenek azotu) powodują wzrost dostępności tlenu cząsteczkowego, to następuje zwiększenie aktywności tych enzymów (Ryc. 2).

Przeciwstawne efekty działania tlenu azotu na czynnik transkrypcyjny HIF-1 zostały zbadane na przykładzie regulacji ekspresji czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) [48-50]. W warunkach hipoksji efekt działania NO zależy głównie od jego stężenia. Małe ilości tlenu azotu powodują wzrost syntezy VEGF w komórkach mięśni gładkich naczyń, co z kolei – na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego – powoduje wzrost syntezy tlenu azotu przez śródbłonkową izoformę NOS. Jednakże duże stężenie NO działa hamująco na syntezę VEGF wskutek zmniejszenia aktywności HIF-1 [48]. Kimura i wsp. [51] zbadali natomiast, że w warunkach normoksji tlenek azotu przyczynia się do zwiększenia syntezy czynnika wzrostu śródbłonna naczyń poprzez aktywujący wpływ na wiązanie się białka HIF-1 z elementem HRE genu *VEGF* oraz akumulację tego białka.

TLENEK AZOTU A CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE Z MOTYWEM PALCA CYNKOWEGO

Wiele czynników transkrypcyjnych charakteryzuje się obecnością domeny palca cynkowego (ang. *zinc finger*), odpowiedzialnej za wiązanie się z DNA. Przykładami czynników zawierających kompleks siarkowo-cynkowy są Sp1 oraz Egr-1 (ang. *early growth response 1*). Tlenek azotu posiada zdolność odwracalnego rozrywania połączeń Zn-S i usuwania jonów cynku z różnych białek, co prowadzi do utraty pełnionych przez nie funkcji [52]. W ten sposób NO może zarówno hamować, jak i aktywować

transkrypcję genu za pomocą tego samego mechanizmu molekularnego w zależności od struktury promotora i uczestniczących czynników transkrypcyjnych (Ryc. 3) [53]. Jeżeli podlegający regulacji przez tlenek azotu czynnik transkrypcyjny jest dominującym aktywatorem transkrypcji genu, to rozerwanie kompleksu cynkowo-siarkowego przez NO powoduje zahamowanie transkrypcji (np. geny kodujące IL-2, ICAM-1) [54,55]. Natomiast w przypadku, gdy czynnik transkrypcyjny działa jako represor, zniszczenie połączenia Zn-S powoduje aktywację transkrypcji (np. gen dla TNF- α), pod warunkiem jednak, że główny aktywator transkrypcji nie jest wrażliwy na NO (Ryc. 3) [56].

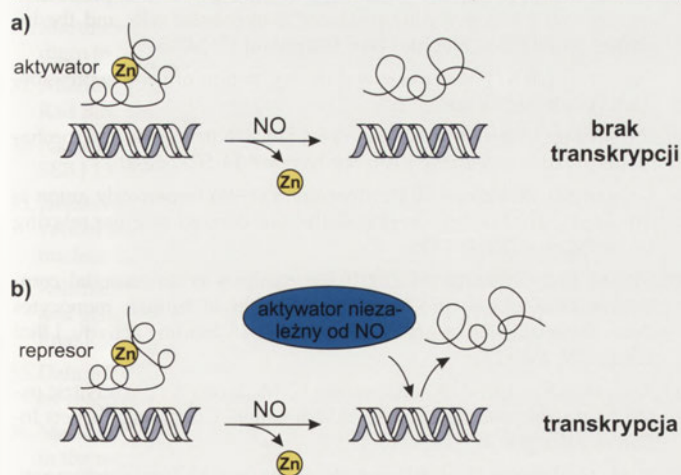
ROLA TLENEK AZOTU W METYLACJI DNA

Inny sposób regulacji ekspresji genów przez tlenek azotu został opisany przez Hmadcha i wsp. [57]. Zbadali oni, że generowany endogennie lub dodawany egzogennie tlenek azotu prowadzi do aktywacji metylotransferaz DNA, metylacji wysp CpG w obrębie genu *FMR1* i supresji mRNA *FMR1* w komórkach szczura produkujących insulinę, liniach komórek T i makrofagów mysich. W komórkach eukariotycznych metylacja 5'-cytozyny wysp CpG znajdujących się wewnątrz lub w otoczeniu genu, ma znaczący wpływ dla transkrypcji – sprzyja występowaniu chromatyny w postaci skondensowanej, co osłabia promotorowe wiązanie czynników transkrypcyjnych i, w konsekwencji, powoduje wyciszenie genu. Aktywacja metylotransferaz DNA przez tlenek azotu prawdopodobnie zachodzi w wyniku nitrozytacji reszt cysteinowych [58].

POTRANSKRYPCYJNA REGULACJA EKSPRESJI GENÓW PRZEZ TLENEK AZOTU

Najlepiej poznanym przykładem potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów z udziałem tlenu azotu jest wpływ tego rodnika na metabolizm żelaza w komórkach makrofagów. Komórkowa homeostaza żelaza u ssaków utrzymywana jest głównie poprzez działanie dwóch cytoplazmatycznych białek wiążących RNA – IRP1 oraz IRP2 (ang. *iron regulatory proteins 1 and 2*). Białka te wiążą się do swoistych sekwencji RNA, określanych jako sekwencje reagujące na żelazo IREs (ang. *iron responsive elements*), występujących w niepodlegających translacji regionach kilku mRNA, w tym kodujących ferrytynę i receptor transferyny. W warunkach niedoboru żelaza, IRP z dużym powinowactwem oddziałuje z sekwencjami IREs, powodując zahamowanie translacji ferrytyny oraz stabilizację mRNA receptora transferyny, a w konsekwencji zmniejszenie wydalania żelaza i nasilenie jego pobierania przez komórkę. Natomiast w komórkach o dużym stężeniu żelaza ma miejsce odwrotna regulacja zarówno ferrytyny, jak i receptora transferyny, wynikająca z braku oddziaływania białek IRP z sekwencjami IRE. Mechanizm ten ma na celu szybki powrót komórkowego poziomu żelaza do normy [58-60].

Tlenek azotu może regulować ekspresję genów kodujących receptor transferyny i ferrytynę poprzez oddziaływanie z białkiem reagującym na żelazo [61,62]. W badaniach prowadzonych z udziałem makrofagów stymulowanych



Rycina 3. Wpływ tlenu azotu na transkrypcję regulowaną przez czynniki transkrypcyjne z motywem palca cynkowego: a) wpływ na czynniki transkrypcyjne pełniące funkcję dominującego aktywatora transkrypcji genu; b) wpływ na czynniki transkrypcyjne działające jako represor.

interferonem γ (IFN- γ) i lipopolisacharydami (LPS) obserwuje się zwiększoną aktywność IRP1 [63,64], natomiast aktywność IRP2 oraz poziom RNA receptora transferyny są zazwyczaj zmniejszone [65]. Miejscem działania rodnika tlenu azotu są 4 centra żelazowo-siarkowe, obecne w białku IRP1 w warunkach dużego stężenia żelaza w komórce. Centra te ograniczają dostęp kluczowych reszt aminokwasowych, biorących udział w wiązaniu się do IREs. Rodnik tlenu azotu niszczy połączenia Fe-S, zwiększając aktywność białka IRP1, i, w konsekwencji, powoduje wzrost poziomu mRNA receptora transferyny oraz zahamowanie syntezy ferrytyny [66,67]. Z kolei jon nitrozo-niowy (NO^+) może nitrozylować kluczowe reszty tiolowe IRP2, co prowadzi do degradacji tego białka w proteasomach, uniemożliwiając jego oddziaływanie z sekwencjami reagującymi na żelazo [68].

WPLYW TLENU AZOTU NA MODYFIKACJE POTRANSLACYJNE

Wiele nowo zsyntetyzowanych białek musi najpierw ulec różnorodnym modyfikacjom potranslacyjnym, aby mogły one pełnić swoje funkcje biologiczne. Badania dowodzą, że tlenek azotu bierze udział w takich modyfikacjach. Znamiennym przykładem jest tutaj transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β , ang. *transforming growth factor β*), który wydzielany jest w formie latentnej, składającej się z dimeru polipeptydowego TGF- β , związanego niekowalencyjnie z peptydem sygnałowym LAP (ang. *latency associated peptide*). Czynniki, takie jak kwaśne pH, niektóre enzymy (np. plazmina) czy utleniacze, powodują rozszczepienie tego kompleksu i, w konsekwencji, aktywację transformującego czynnika wzrostu β . Peptyd związany z latentą posiada jednakże zdolność odwracalnego przyłączania się do TGF- β , a tym samym do jego dezaktywacji. Vodovotz i wsp. zbadali, że proces ten kontrolowany jest przez tlenek azotu, który nitrozyluje peptyd LAP, inaktywując go w ten sposób, a w konsekwencji – podtrzymując aktywność TGF- β [69].

Tlenek azotu reguluje również aktywność enzymów proteolitycznych, takich jak: enzym konwertujący interleukinę 1β (ICE, ang. *interleukin-1 β converting enzyme*) czy enzym konwertujący czynnik martwicy nowotworów α (TACE, ang. *tumor necrosis factor – α converting enzyme*). Konwertaza ICE należy do rodziny kaspaz (kaspaza 1) i bierze udział w uwalnianiu interleukin IL- 1β oraz IL-18 z błony komórkowej poprzez rozszczepienie proteolityczne. Kim i wsp. zaobserwowali, że NO produkowany przez indukowalną izoformę syntazy tlenu azotu hamuje ten proces poprzez S-nitrozylację aktywnych reszt cysteinowych kaspazy 1 i w związku z tym hamuje reakcje odpowiedzi immunologicznej [70].

Enzym TACE należy natomiast do rodziny transbłonowych metaloproteinaz wiążących cynk. Jest odpowiedzialny za uwalnianie z błony komórkowej m.in.: TNF- α , receptora II TNF- α (p75), TGF- α czy L-selektyny. Przeprowadzone badania dowodzą, że zarówno egzogenne, jak i endogenne tlenek azotu, odgrywa rolę w regulacji aktywności konwertazy TACE. NO aktywuje ten enzym poprzez S-nitrozylację reszty cysteinowej w jego prodo-

menie hamującej. Aminokwas ten tworzy kompleks z atomem cynku, co jest niezbędne do zahamowania aktywności enzymu. Jego nitrozylacja powoduje rozpad połączenia Cys-Zn $^{2+}$ i w konsekwencji, aktywację TACE. Enzymatyczna aktywność TACE zwiększa się również w wyniku nitrozytacji grup tiolowych bogatej w cysteinę domeny, znajdującej się w pobliżu segmentu transbłonowego [71].

UWAGI KOŃCOWE

Regulacja ekspresji genów jest bardzo złożonym procesem angażującym takie elementy jak ligandy, receptory czy wtórne przekaźniki. Wyzwalają one kaskady reakcji z udziałem kinaz białkowych, fosfataz, co ma na celu przeniesienie sygnału do jądra komórki i aktywację lub wyciszenie odpowiedniego genu. Wolne rodniki – jakim jest między innymi tlenek azotu – odgrywają ogromną rolę w komórkowych szlakach przekazywania sygnału, dzięki obecności niesparowanego elektronu w swej cząsteczce, charakteryzującego się wysoką reaktywnością. Licznie prowadzone badania dostarczają coraz to nowych dowodów potwierdzających ogromny wpływ tlenu azotu na regulację ekspresji genów. NO może działać na różnych poziomach ekspresji, a jego wpływ jest pośredni – poprzez modulację różnych czynników biorących w niej udział. Dotąd nie wykazano w regionach promotorowych genów eukariotycznych obecności elementów DNA bezpośrednio odpowiadających na tlenek azotu.

PIŚMIENNICTWO

1. Michel T, Feron O (1997) Nitric oxide synthases: which?, where?, how?, and why? *J Clin Invest* 100: 2146-2152
2. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615
3. Osajca K, Szemraj J, Bartkowiak J (2005) Wpływ tlenu azotu na regulację ekspresji inhibitora aktywatorów plazminogenu typu 1 oraz tkankowego aktywatora plazminogenu. *Postepy Biochem* 51: 407-413
4. Ghafourifar P, Cadenas E (2005) Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* 26: 190-195
5. Brookes PS (2004) Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion* 3: 187-204
6. Pfeilschifter J (2002) Nitric oxide triggers the expression of proinflammatory and protective gene products in mesangial cells and the inflamed glomerulus. *Nephrol Dial Transplant* 17: 347-348
7. Bogdan C (2001) Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol* 11: 66-75
8. Pfeilschifter J, Eberhardt W, Huwiler A (2003) Nitric oxide and mechanisms of redox signalling. *J Am Soc Nephrol* 14: S237-S240
9. Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320: 454-456
10. Matata BM, Galinanes M (2002) Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor- κ B DNA binding activity. *J Biol Chem* 277: 2330-2335
11. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E (2005) Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4: 471-479
12. Kojda G, Harrison D (1999) Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 43: 562-571

13. Channon KM (2004) Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 14: 323-327
14. Xia Y, Zweier JL (1997) Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6954-6958
15. www.whatislife.com/reader2/Metabolism/pathway/no.html
16. Hart CM (1999) Nitric oxide in adult lung disease. *CHEST* 115: 1407-1417
17. Zhang Y, Hogg N (2005) S-nitrosothiols: cellular formation and transport. *Free Rad Biol Med* 38: 831-838
18. Gaston BM, Carver J, Doctor A, Palmer LA (2003) S-nitrosylation signaling in cell biology. *Mol Interv* 3: 253-263
19. Pilz RB, Casteel DE (2003) Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res* 93: 1034-1046
20. Williams JG, Pappu K, Campbell SL (2003) Structural and biochemical studies of p21^{ras} S-nitrosylation and nitric oxide mediated guanine nucleotide exchange. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6376-6381
21. Lander HM, Hajjar DP, Hempstead BL, Mirza UA, Chait BT, Campbell S, Quilliam LA (1997) A molecular redox switch on p21^{ras}. Structural basis for the nitric oxide- p21^{ras} interaction. *J Biol Chem* 272: 4323-4326
22. Lander HM, Ogiste JS, Pearce SFA, Levi R, Novogrodsky A (1995) Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21^{ras}. *J Biol Chem* 270: 7017-7020
23. Moncada S, Erusalimsky JD (2002) Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 214-220
24. Brown GC (1997) Nitric oxide inhibition of cytochrome oxidase and mitochondrial respiration: Implications for inflammatory, neurodegenerative and ischaemic pathologies. *Biomed Life Sci* 174: 189-192
25. Brown GC (2001) Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1504: 46-57
26. Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB (1996) Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 40-44
27. Lacza Z, Puskar M, Figueroa JP, Zhang J, Rajapakse N, Busija DW (2001) Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. *Free Rad Biol Med* 31: 1609-1615
28. Brown GC (1995) Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur J Biochem* 232: 188-191
29. Merrill JE, Murphy SP (1997) Regulation of gene expression in the nervous system by reactive oxygen and nitrogen species. *Metab Brain Dis* 12: 97-112
30. Martinez-Ruiz A, Lamas S (2004) S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc Res* 2: 43-52
31. Allen RG, Tresini M (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad Biol Med* 28: 463-499
32. Nanxin L, Karin M (1999) Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *FASEB J* 13: 1137-1143
33. Janssen-Heininger YMW, Poynter ME, Baeuerle PA (2000) Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor κ B. *Free Rad Biol Med* 28: 1317-1327
34. Rahman I, MacNee W (2000) Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Rad Biol Med* 28: 1405-1420
35. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 67-101
36. Marshall HE, Merchant K, Stamler JS (2000) Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J* 14: 1889-1900
37. Marshall HE, Hess DT, Stamler JS (2004) S-nitrosylation: physiological regulation of NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 24: 8841-8842
38. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ (2001) Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 29: 345-350
39. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Rad Biol Med* 22: 269-285
40. Nikitovic D, Holmgren A, Spyrou G (1998) Inhibition of AP-1 DNA binding by nitric oxide involving conserved cysteine residues in Jun and Fos. *Biochem Biophys Res Commun* 242: 109-112
41. Ke Q, Costa M (2006) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) *Mol Pharmacol* 70: 1469-1480
42. Murphy MP (2003) Does interplay between nitric oxide and mitochondria affect hypoxia-inducible transcription factor-1 activity? *Biochem J* 376: e5-e6
43. Zagórska A, Dulak J (2004) HIF-1 α : the knowns and the unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol* 51: 563-585
44. Metzen E, Zhou J, Jelkmann W, Fandrey J, Brüne B (2003) Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1 α by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell* 14: 3470-3481
45. Palmer LA, Gaston B, Johns RA (2000) Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 expression and activity: redox-dependent effect of nitrogen oxides. *Mol Pharmacol* 58: 1197-1203
46. Mateo J, Garcia-Lecea M, Cadenas S, Hernandez C, Moncada S (2003) Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways. *Biochem J* 376: 537-544
47. Hagen T, Taylor CT, Lam F, Moncada S (2003) Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: Effect on HIF-1 α . *Science* 302: 1975-1978
48. Kimura H, Esumi H (2003) Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochim Pol* 50: 49-59
49. Józkwicz A, Cooke JP, Guevara I, Huk I, Funovics Ph, Pachinger O, Weidinger F, Dulak J (2001) Genetic augmentation of nitric oxide synthase increases the vascular generation of VEGF. *Cardiovasc Res* 51: 773-783
50. Dulak J, Józkwicz A, Dembińska-Kiec A, Guevara I, Zdzienicka A, Żmudzńska-Grochot D, Florek I, Wójtowicz A, Szuba A, Cooke JP (2000) Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 659-666
51. Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, Addeo R, Makuuchi M, Esumi H (2000) Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 95: 189-197
52. Kröncke KD, Carlberg C (2000) Inactivation of zinc finger transcription factors provides a mechanism for a gene regulatory role of nitric oxide. *FASEB J* 14: 166-173
53. Kröncke KD (2001) Cysteine-Zn²⁺ complexes: unique molecular switches for inducible nitric oxide synthase-derived NO. *FASEB J* 15: 2503-2507
54. Berendji D, Kolb-Bachofen V, Zipfel PF, Skerka C, Carlberg C, Kröncke KD (1999) Zinc finger transcription factors as molecular targets for nitric oxide-mediated immunosuppression: inhibition of IL-2 gene expression in murine lymphocytes. *Mol Med* 5: 721-730
55. Berendji D, Kolb-Bachofen V, Kröncke KD (2001) Nitric oxide inhibits endothelial IL-1 β -induced ICAM-1 gene expression at the transcriptional level decreasing Sp1 and AP-1 activity. *Mol Med* 7: 748-754
56. Wang S, Wang W, Wesley RA, Danner RL (1999) A Sp1 binding site of the tumor necrosis factor α promoter functions as a nitric oxide response element. *J Biol Chem* 274: 33190-33193
57. Hmadcha A, Bedoya FJ, Sobrino F, Pintado E (1999) Methylation dependent gene silencing induced by interleukin-1 β via nitric oxide production. *J Exp Med* 190: 1595-1603
58. Lipiński P, Starzyński RR (2006) Rola białek IRP (iron metabolism proteins) w regulacji ogólnoustrojowej homeostazy żelaza: lekcje płynące z badań na myszach z nokautem genów *IRP1* i *IRP2*. *Post Hig Med Dosw* 60: 322-330
59. Eisenstein RS (2000) Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu Rev Nutr* 20: 627-662

60. Starzyński RR, Lipiński P (2003) IRP1, białko kontrolujące homeostazę żelaza w komórkach ssaków: regulacja jego aktywności przez jony żelaza i tlenek azotu. *Post Biol Kom* 30: 497-514
61. Kim S, Ponka P (2002) Nitric oxide-mediated modulation of iron regulatory proteins: implication for cellular iron homeostasis. *Blood Cells Mol Dis* 29: 400-410
62. Kim S, Ponka P (2003) Role of nitric oxide in cellular iron metabolism. *Biomaterials* 16: 125-135
63. Oliveira L, Drapier J-C (2000) Down-regulation of iron regulatory protein 1 gene expression by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6550-6555
64. Gonzalez D, Drapier J-C, Bouton C (2004) Endogenous nitration of iron regulatory protein-1 (IRP-1) in nitric oxide-producing murine macrophages. *J Biol Chem* 279: 43345-43351
65. Kim S, Ponka P (2000) Effects of interferon-gamma and lipopolysaccharide on macrophage iron metabolism are mediated by nitric oxide-induced degradation of iron regulatory protein 2. *J Biol Chem* 275: 6220-6226
66. Bouton C (1999) Nitrosative and oxidative modulation of iron regulatory proteins. *Cell Mol Life Sci* 55: 1043-1053
67. Soum E, Drapier J-C (2003) Nitric oxide and peroxynitrite promote complete disruption of the [4Fe-4S] cluster of recombinant human iron regulatory protein 1. *J Biol Inorg Chem* 8: 226-232
68. Kim S, Ponka P (1999) Control of transferrin receptor expression via nitric oxide-mediated modulation of iron-regulatory protein 2. *J Biol Chem* 274: 33035-33042
69. Vodovotz Y, Chesler L, Chong H, Kim S-J, Simpson JT, DeGraff W, Cox GW, Roberts AB, Wink DA, Barcellos-Hoff MH (1999) Regulation of transforming growth factor β 1 by nitric oxide. *Cancer Res* 59: 2142-2149
70. Kim Y-M, Talanian RV, Li J, Billiar TR (1998) Nitric oxide prevents IL-1 β and IFN- γ -inducing factor (IL-18) release from macrophages by inhibiting caspase-1 (IL-1 β -converting enzyme). *J Immunol* 161: 4122-4128
71. Zhang Z, Kolls JK, Oliver P, Good D, Schwarzenberger PO, Joshi MS, Ponthier JL, Lancaster JR (2000) Activation of tumor necrosis factor- α -converting enzyme-mediated ectodomain shedding by nitric oxide. *J Biol Chem* 275: 15839-15844

Regulation of gene expression by nitric oxide

Katarzyna Oszajca[✉], Janusz Szemraj, Jacek Bartkowiak

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

[✉]e-mail: kasia_osz@o2.pl

Key words: nitric oxide, peroxynitrite, gene expression, S-nitrosylation, transcription factors

ABSTRACT

During the past over 20 years, nitric oxide has become a subject of intensive research in molecular biology and other fields of science. Conducted studies discover its important role both in physiological and pathophysiological processes. A significant feature of nitric oxide is its participation in the regulation of gene expression. Mechanisms of this regulation mainly are based on direct action and consist in the modulation of transcription factors, of the translation and stability of mRNA, as well as in the posttranslational modification of primary gene product. The aim of this review is to present current knowledge about the influence of nitric oxide on the regulation of eukaryotic gene expression.

STRESZCZENIE

Miejsca wytwarzania tlenu azotu w komórkach roślinnych to zagadnienia, które ciągle pozostają mało poznane i budzą wiele kontrowersji. W zależności od gatunku rośliny, rodzaju organu, stanu fizjologicznego i zmieniających się warunków środowiskowych tlenek azotu może być tworzony z różnych substratów przez zróżnicowane systemy enzymatyczne i nieenzymatyczne. Najlepiej udokumentowano wytwarzanie NO w komórkach roślinnych z dwóch substratów: azotynów i argininy, odpowiednio, przez reduktazy azotanowe (NR) – cytosolową, jak i związane z błonami komórkowymi, a także enzymy o aktywności syntazy tlenu azotu (NOS). W świetle ostatnich doniesień, ważnym miejscem wytwarzania tlenu azotu w komórkach roślin wydają się być mitochondria, w których NO może być tworzony z obu wymienionych substratów, zarówno na drodze redukcji azotynu przez enzymy zaangażowane w transport elektronów, jak również przez zależną od argininy roślinną syntazę tlenu azotu (AtNOS1). Inne potencjalne enzymatyczne źródła NO w roślinach to: oksydoreduktaza ksantynowa, peroksydaza, cytochrom p450.

WPROWADZENIE

Tlenek azotu (NO) jest niskocząsteczkowym, reaktywnym związkami o dużej lipofilności, który z łatwością przenikając przez błony komórkowe drogą pozareceptorową, pełni funkcję ważnego, uniwersalnego przekaźnika sygnałów w komunikacji wewnątrz- i międzykomórkowej. Wykrycie tlenu azotu w komórkach zwierzęcych w 1980 roku spowodowało lawinę badań dotyczących jego wytwarzania i funkcji w żywych komórkach. W 1992 r. czasopismo „Science” nadało tlenkowi azotu nazwę „cząsteczki roku” [1], a w 1998 roku przyznano Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii za odkrycia dotyczące roli NO w regulacji funkcjonowania układu krwionośnego człowieka.

W latach siedemdziesiątych ubiegłego stulecia zaobserwowano, że tlenek azotu wydzielany jest z liści roślin [2], w 1998 roku ukazały się pierwsze prace poświęcone udziałowi NO w odpowiedzi roślin na zakażenie patogenami [3,4], w ostatniej dekadzie tlenek azotu stał się jednym z najintensywniej badanych związków. Badania te dostarczyły wielu cennych informacji dotyczących jego funkcji w roślinach i wskazują, że jest ona o wiele bardziej złożona niż u zwierząt. Tlenek azotu wytwarzany endogennie w roślinach odgrywa ważną rolę w regulacji wielu procesów fizjologicznych w czasie całego cyklu życiowego rośliny [5,6], poczynając od kiełkowania nasion [7,8] aż do dojrzewania owoców i starzenia się roślin [9,10]. NO odgrywa ważną rolę w regulowanym przez auxyny procesie organogenezy korzeni [11], jak również w reakcjach grawitropowych tych organów [12]. W liściach NO zaangażowany jest w regulację z udziałem kwasu abscysynowego zamykania aparatów szparkowych [13-15], regulację procesu rozwoju blaszki liściowej [16] oraz w tak ważne procesy metaboliczne jak fotosynteza [17] i oddychanie [18]. Wiele danych wskazuje na zaangażowanie NO w procesie programowanej śmierci komórek w trakcie różnicowania ksylemu [19]. Ostatnio wykazano również regulacyjny udział tego związku w procesie kwitnienia roślin [20] i orientacji wzrostu łagiewki pyłkowej [21].

Tlenek azotu pełni w roślinach funkcję ważnego przekaźnika sygnałów w reakcjach roślin na stropy abiotyczne, takie jak: zasolenie, stres osmotyczny, promieniowanie UV, brak tlenu [22,23]. Wykazano, że zwiększa on odporność roślin na różne stropy abiotyczne, np. na stres solny i oksydacyjny [24,25]. Jedną z lepiej udokumentowanych funkcji NO w roślinach jest jego udział w oddziaływaniach roślin z mikroorganizmami patogenicznymi, niepatogenicznymi i symbiotycznymi.

Tlenek azotu, wraz z reaktywnymi formami tlenu, zaangażowany jest w indukcję obumierania komórek roślinnych w reakcji nadwrażliwości – ważnej, zależnej od genów reakcji obronnej roślin na patogeny awirulentne [3,26] jak również w rozprzestrzenianiu się międzykomórkowych sygnałów warunkują-

Urszula Małolepsza[✉]

Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki

[✉]Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; tel.: (042) 635 44 19, e-mail: ulmal@biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 8 lutego 2007 r.

Artykuł zaakceptowano 23 marca 2007 r.

Słowa kluczowe: NO, enzymy o aktywności syntazy NO, reduktaza azotanowa

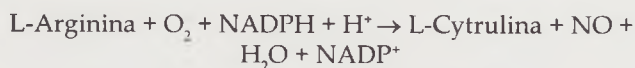
Wykaz skrótów: AtNOS – syntaza tlenu azotu u *Arabidopsis thaliana*; cNR – cytosolowa reduktaza azotanowa; GDC – kompleks enzymatyczny o aktywności dekarboksylazy glicyny; Hb – hemoglobina; MetHb-R – reduktaza methemoglobiny; NI-NOR – reduktaza azotyn-tlenek azotu; NiR – reduktaza azotynowa; NO – tlenek azotu; NOS – syntaza tlenu azotu: eNOS – śródbłonkowa, iNOS – indukowana, nNOS – neuronowa; pNOS – aktywność enzymatyczna syntazy tlenu azotu w peroksysomach; NR – reduktaza azotanowa; PCD – programowana śmierć komórki; PM-NR – reduktaza azotanowa związana z błonami komórkowymi; RFT – reaktywne formy tlenu; XOR – oksydoreduktaza ksantynowa

cych apoptotyczne obumieranie komórek [27,28]. NO, tworzony w oddziaływaniach roślin z patogenami, zaangażowany jest jako przekaźnik sygnałów regulujący ekspresję genów obrony w indukcji systemicznej odporności nabytej (SAR) [29]. Zwiększone wytwarzanie NO wykazano też w reakcjach roślin z patogenami nekrotroficznym [30,31] jak również w odpowiedzi na zranienia powodowane przez owady [32].

Biologicznej funkcji tlenu azotu w roślinach poświęcono w ostatnim czasie wiele obszernych prac przeglądowych [33-37]. Jednak pomimo wielu spektakularnych odkryć ciągle wiele szczegółów dotyczących działania NO, a przede wszystkim miejsc i źródeł jego wytwarzania, a także mechanizmów regulujących jego stężenie w komórkach roślinnych, nadal pozostaje słabo poznanymi. Niniejsza praca jest próbą podsumowania aktualnego stanu wiedzy na ten temat.

SYNTEZA TLENKU AZOTU W KOMÓRKACH ZWIERZĘCYCH

W komórkach zwierzęcych za syntezę tlenu azotu odpowiedzialna jest głównie dioksygenaza - syntaza tlenu azotu (NOS), która przy udziale zredukowanej formy fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) wprowadza tlen cząsteczkowy do L-argininy w wyniku czego powstaje L-cytrulina i tlenek azotu:



Aktywność NOS zależna jest od obecności licznych ko-faktorów: dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD), mononukleotydu flavinowego (FMN), tetrahydrobiopteryny (BH_3), hemu i kalmoduliny (CaM) [38,39]. Enzym ten występuje w trzech izoformach, będących produktami różnych genów: iNOS (indukowana NOS), eNOS (śródbłonkowa, ang. *endothelial*) i nNOS (neuronowa NOS). Izoenzymy te różnią się masą cząsteczkową, sekwencją aminokwasów, a ich aktywacja zależy lub nie zależy od obecności jonów wapnia w komórkach; mają też różne mechanizmy regulacji ekspresji na poziomie transkrypcji. Jednak każda z tych izoform zawiera wspólne komponenty: w rejonie N-końcowym domenę oksygenazową wiążącą hem, BH_4 i L-argininę, w rejonie C-końcowym domenę reduktazową wiążącą FMN, FAD i NADPH oraz obszar pomiędzy domenami wiążącą kalmodulinę.

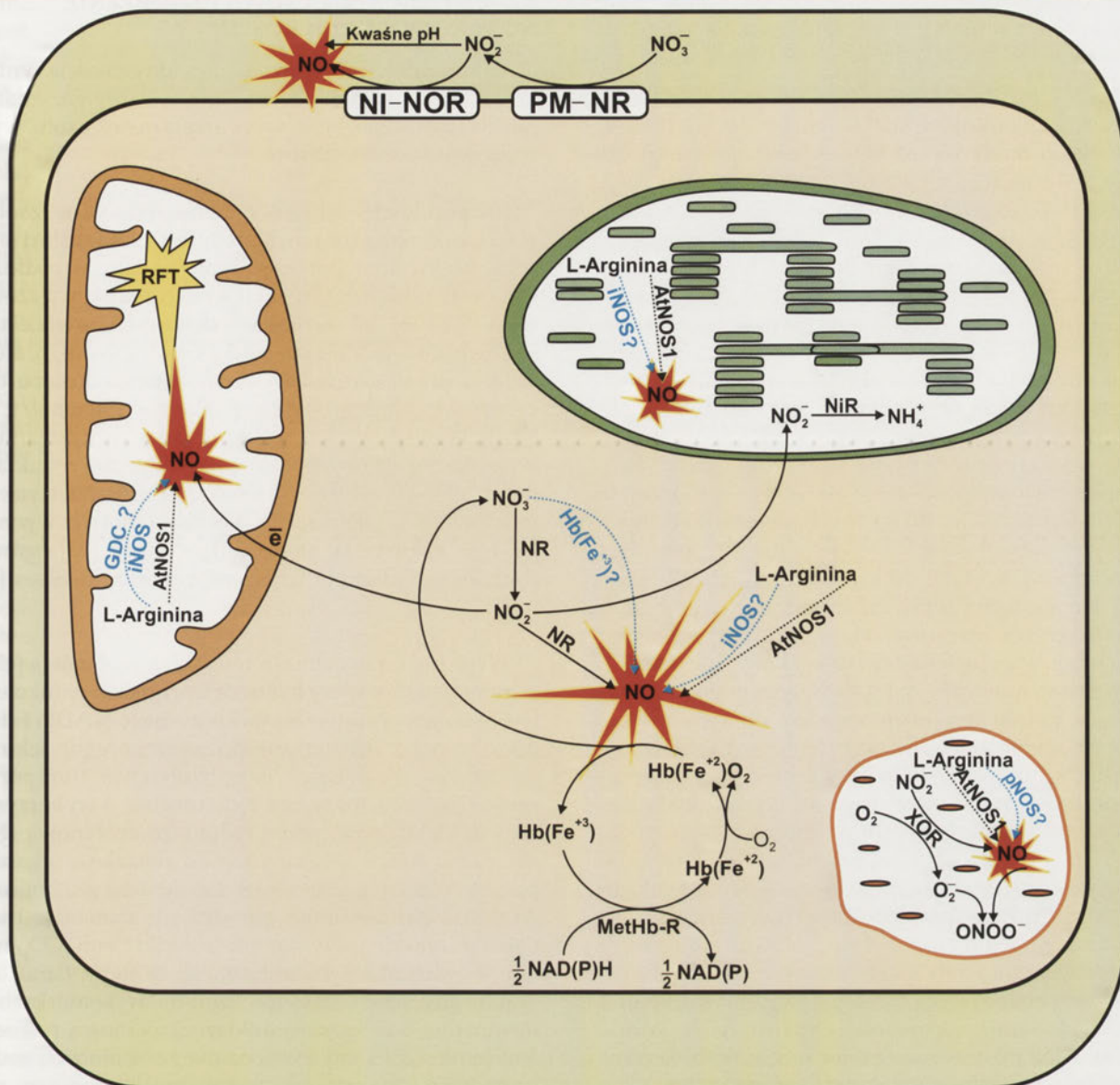
Neuronowa NOS (nNOS) występuje przede wszystkim w neuronach centralnego i obwodowego układu nerwowego, a tlenek azotu przez nią wytwarzany działa jako neuroprzekaźnik hamujący pobudzenie układu nerwowego. Śródbłonkowa NOS (eNOS) znajduje się głównie w błonach komórkowych śródbłonka naczyń, a także w komórkach mięśni gładkich i komórkach nerwowych. Tlenek azotu syntetyzowany przy jej udziale reguluje funkcjonowanie układu krwionośnego – rozszerza naczynia krwionośne, hamuje agregację płytek krwi i neutrofilów, hamuje wydzielanie czynnika aktywującego płytki krwi. nNOS i eNOS są enzymami konstytutywnymi, ich akty-

wacja jest ściśle uzależniona od obecności jonów wapnia i kalmoduliny w komórkach. iNOS – indukowana NOS nie występuje w komórkach w sposób ciągły, a jej synteza jest indukowana przez różne sygnały immunologiczne na poziomie transkrypcji mRNA. Izoenzym ten konstytutywnie wiąże wapń i kalmodulinę i jego aktywność nie jest regulowana potranslacyjnie. Enzym ten wytwarza duże ilości tlenu azotu głównie w komórkach linii monocytarno-makrofagowej, w hepatocytach, astrocytach, fibroblastach, komórkach nabłonkowych i neutrofilach. Tlenek azotu syntetyzowany z udziałem iNOS bierze udział w immunoregulacji i immunosupresji, jak również w wielu reakcjach patologicznych, w których we współdziałaniu z reaktywnymi formami tlenu, wykazuje cytostatyczne i cytotoksyczne działanie przeciwko patogenom i komórkom nowotworowym. Izoformy NOS u zwierząt posiadają masę cząsteczkową około 130-160 kDa, występują w formie dimerów i wykazują 50-60% identyczności.

W komórkach zwierzęcych, poza syntazami tlenu azotu, w tworzenie NO mogą być zaangażowane inne enzymy; możliwe jest również powstawanie tego związku bez udziału enzymów. Ważnym substratem wykorzystywanym w komórkach zwierzęcych do tworzenia tlenu azotu są azotyny, które mogą ulegać redukcji do NO przy udziale np. oksydazy ksantynowej [40]. Nieenzymatyczna redukcja bądź dysproporcjonacja azotynów również prowadzi do powstawania NO [41]. Możliwe jest też całkowicie niezależne od enzymów tworzenie NO z D- lub L-argininy przy udziale nadtlenu wodoru [42] lub z hydroksylaminy przez jej degradację do NO, potęgowaną w obecności reaktywnych form tlenu w komórkach ssaków [43].

ENZYMY O AKTYWNOŚCI SYNTAZ TLENKU AZOTU U ROŚLIN

Pomimo usilnych poszukiwań prowadzonych od wielu lat, jak dotąd nie udało się zidentyfikować w roślinach białka, nie wyizolowano też genu wykazującego homologię do genów kodujących zwierzęce syntazy tlenu azotu, choć na istnienie takich enzymów w komórkach roślinnych wskazuje wiele dowodów pośrednich. W ekstraktach otrzymanych z tkanek wielu gatunków roślin wykryto aktywność enzymatyczną, która podobnie jak syntazy tlenu azotu u zwierząt, wykorzystując argininę jako substrat, tworzy cytrulinę i tlenek azotu [44-46]. Aktywność ta jest hamowana przez analogi argininy – specyficzne inhibitory zwierzęcych syntaz tlenu azotu. Inhibitory te blokują szereg procesów fizjologicznych roślin, w których regulację zaangażowany jest tlenek azotu, jak np. w indukowany przez ABA proces regulacji zamykania aparatów szparkowych. Badania immunologiczne z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko izoformom syntaz tlenu azotu ssaków wydają się być niejednoznaczne. W różnych przedziałach komórkowych, np. chloroplastach i peroksysomach grochu [46,47], w jądrach komórkowych i cytosolu kukurydzy [45], stwierdzono występowanie białek rozpoznawanych przez te przeciwciała, jednak białka te nie wykazywały aktywności syntaz tlenu azotu, były to, między innymi, białka szoku cieplnego i enzymy glikolityczne.



Rycina 1. Schemat przedstawiający niektóre znane i sugerowane miejsca wytwarzania tlenku azotu w komórkach roślinnych. AtNOS1 – syntaza tlenku azotu u *Arabidopsis thaliana*, GDC – kompleks enzymatyczny o aktywności dekarboksylazy glicyny, Hb – hemoglobina, MetHb-R – reduktaza methemoglobiny, NR – reduktaza azotanowa, NI-NOR – reduktaza azotyn-tlenek azotu, NiR – reduktaza azotynowa, NO – tlenek azotu, iNOS – indukowana enzymatyczna aktywność syntazy tlenku azotu, pNOS – enzymatyczna aktywność syntazy tlenku azotu w peroksysomach, PM-NR – reduktaza azotanowa związana z błonami komórkowymi, RFT – reaktywne formy tlenu. XOR – oksydoreduktaza ksantynowa.

Silna aktywność syntazy tlenku azotu (pNOS) zależna od arginy, NADPH, BH_4 , kalmodyliny i Ca^{+2} została wykryta przez Barroso i wsp. w 1999 r. [44] w peroksysomach wyizolowanych z liści grochu. Specyficzna aktywność tego enzymu (5,6 nmol/min/mg) była znacznie hamowana przez analogi arginy, najsilniej przez L-aminoguanidynę, jak i podczas procesu starzenia się roślin. Karboksymetoksylamina (CM) i aminoacetonitryl (AAN), dwa charakterystyczne inhibitory białka P kompleksu enzymatycznego dekarboksylazy glicyny (GDC) i azydek – inhibitor reduktazy azotanowej, nie wywierały żadnego wpływu na aktywność pNOS [44].

W latach 2003–2004 pojawiły się prace opisujące indukowaną przez patogeny aktywność syntezy tlenku azotu (iNOS), np. w roślinach tytoniu i *Arabidopsis*, w odpowiedzi na zakażenie wirusem mozaiki tytoniu [47], a także w

roślinach pomidora – w odpowiedzi na zakażenia *Pseudomonas syringae* [48]. Wykazano, że aktywność iNOS posiada białko o masie ok. 120 kDa, aktywne jako dimer, wymagające do swego działania arginy, BH_4 , FAD, FMN, NADPH, O_2 , a także Ca^{+2} i CaM. Badania wskazywały, że jest to rodzaj białka P, będący kompleksem enzymatycznym o aktywności dekarboksylazy glicyny (GDC), katalizujący destrukcję cząsteczki glicyny napływającej z peroksysomów do mitochondriów w czasie fotooddychania. Specyficzna aktywność GDC (hamowana przez CM i AAN – inhibitory GDG) była wysoka (20–47 μ mol/min/mg), około 30 razy wyższa niż zwierzęcych iNOS [47], ale enzym ten nie wykazywał homologii z żadną ze znanych zwierzęcych syntaz NO. W krótkim czasie po opublikowaniu cytowanych wyżej prac [47,48], część ich współautorów zakwestionowała opublikowane wcześniej wyniki, motywując swoją decyzję brakiem powtarzalności

niektórych doświadczeń wykazujących aktywność NOS w rekombinowanym białku P; prace te zostały wycofane [49].

W 2003 r. Guo i wsp. [50] wykryli w genomie *Arabidopsis thaliana* gen kodujący białko syntazy NO (AtNOS1, NOS1), białko o masie ok. 60 kDa i dużej homologii do enzymu wytwarzającego NO u ślimaka *Helix pomatia*, wiążące się z przeciwciałami dla nNOS. AtNOS1 nie wymaga do swej aktywności flawin, BH₄ (jak dotąd nie wykryto BH₄ w tkankach roślin), do jego aktywności niezbędne są: Ca²⁺, CaM i NADPH. Białko AtNOS1 zlokalizowano głównie w wierzchołkach wzrostu korzeni *Arabidopsis thaliana*. AtNOS1 wydaje się być enzymem konstytutywnym, nie podlega regulacji na drodze transkrypcji. Specyficzna aktywność tego enzymu jest niska (5 nmol/min/mg), niższa niż wspomnianego wcześniej białka P, a zbliżona do aktywności peroksysomalnej pNOS [44]. Analiza sekwencji aminokwasów AtNOS1 wykazała, że jest ona bardzo zbliżona do grupy białek bakteryjnych zawierających domeny wiążące GTP i nie jest podobna do żadnej znanej syntazy NO w komórkach zwierzęcych [44]. Tlenek azotu wytwarzany przez ten enzym u *A. thaliana* odgrywa kluczową rolę w regulacji wzrostu i sygnalizacji hormonalnej. Badania z wykorzystaniem homozygotycznych mutantów pozbawionych genu AtNOS1 wykazały, że enzym ten jest niezbędny do syntezy NO na drodze utleniania argininy do cytruliny. Kielkowanie nasion roślin zmutowanych było znacznie ograniczone. Siewki mutantów charakteryzowały się znacznie obniżoną zdolnością do tworzenia NO w korzeniu – wytwarzały około 20% tlenu azotu w porównaniu z roślinami niezmutowanymi (co wskazuje jednocześnie na funkcjonowanie także innych mechanizmów wytwarzania NO w tych roślinach), ich wzrost był zahamowany, pierwsze liście żółte, zaburzone były mechanizmy kontrolujące ruchy aparatów szparkowych, a także proces tworzenia i drogi funkcjonowania hormonów, głównie ABA. Wykazano też, że AtNOS1 jest zaangażowana w wytwarzanie NO w odpowiedzi roślin na atak patogenów [51].

Doniesienia o komórkowej lokalizacji AtNOS1 są różne; w zależności od stosowanych technik badawczych stwierdzono jej występowanie w cytoplazmie, peroksysomach, chloroplastach. Jedna z ostatnich prac Guo i Crawford [52] wskazuje na jej lokalizację w mitochondriach. AtNOS1 związana z mitochondriami może odgrywać kluczową rolę w kontroli wytwarzania RFT, PCD i starzenia się roślin. NO, tworzony przy jej udziale, może przyczyniać się do hamowania procesów utleniania prowadzących do starzenia się i śmierci komórek.

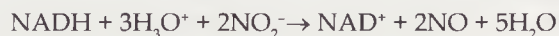
Wydawało się, że prace Guo i Crawford [50,52] stanowią ważny, zakończony sukcesem, etap w poszukiwaniu roślinnych syntaz tlenu azotu; AtNOS1 uznana została za jedyną zależną od argininy syntazę NO u roślin. W ciągu ostatnich miesięcy pojawiły się jednak doniesienia poddające w wątpliwość istnienie AtNOS1 [53]; na łamach „Trends in Plant Science” toczy się aktualnie dyskusja na ten temat [54,55,56]. Wiele wskazuje na to, że poszukiwanie roślinnych syntaz tlenu azotu to ciągle niedokończona kwestia.

REDUKTAZA AZOTANOWA I TWORZENIE NO W KOMÓRKACH ROŚLIN

W komórkach roślinnych, poza aktywnością syntaz tlenu azotu, funkcjonują także inne systemy enzymatyczne i nieenzymatyczne, które wytwarzają tlenek azotu, wykorzystując azotyn jako substrat.

Już pod koniec lat siedemdziesiątych XX w. zaobserwowano, że tlenek azotu uwalniany jest z liści roślin i jego ilość ściśle uzależniona jest od stężenia azotanu w podłożu, azotynu w tkankach roślin i aktywności reduktazy azotanowej (NR) [2,57,58]. W warunkach tlenowych, wydzielanie NO jest niskie, zwykle niższe niż 0,5 nmol/g św.m./h, ale znacznie wzrasta w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, w ciemności, osiągając wysoki poziom – 150 nmol/g św.m./h [22]. Wiele dowodów wskazuje, że w wytwarzaniu NO w komórkach roślinnych ważną rolę odgrywa reduktaza azotanowa [58-60]; wytwarzanie NO przez ten enzym udokumentowano u wielu roślin, nie tylko motylkowych, takich jak np.: kukurydza, słonecznik, szpinak [22] ogórek [61], *Arabidopsis thaliana* [13], pszenica, storczyki, aloes [61,62] i inne.

Występująca w cytosolu reduktaza azotanowa (cNR) jest enzymem, który w normalnych warunkach redukuje azotan (N+5) do azotynu (N+3), wykorzystując NADPH (fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego) jako donor elektronów. Powstające jony azotynowe transportowane są do chloroplastów i tam redukowane, z wykorzystaniem sześciu elektronów, przez reduktazę azotynową (NiR) do amoniaku, który włączany jest do związków organicznych przez syntetazę glutaminową lub syntazę glutaminianową. Aktywność ta dominuje, gdy stężenie azotanu jest wysokie i azotynu niskie (przy dużym stężeniu tlenu, CO₂, na świetle). W warunkach ograniczonego dostępu tlenu lub jego braku, gdy rośnie stężenie azotynu w komórkach roślin, uwalnianie NO przez reduktazę azotanową rośnie nawet stukrotnie [22] i jest to związane ze zdolnością reduktazy azotanowej do katalizowania jednoelektronowej redukcji azotynu do NO (N+2) przy udziale NADH (dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego):



Wytwarzanie NO przez reduktazę azotanową jest hamowane przez azydek sodu (NaN₃) – inhibitor reduktazy [58]. Ocenia się, że około 1% całkowitej aktywności reduktazowej reduktazy azotanowej jest wykorzystywany do wytwarzania NO z azotynów [22,63]

Wytwarzanie NO przy udziale cytosolowej reduktazy zależy od specyficznej regulacji aktywności enzymu, która ma miejsce na wielu poziomach. I tak, np. ekspresja genu reduktazy azotanowej podlega indukcji na poziomie transkrypcji przez azotan, światło i cukry [64].

Reduktaza azotanowa jest dużym homodimerycznym enzymem o masie cząsteczkowej 200-250 kDa. Każdy z monomerów wiąże trzy grupy prostetyczne: FAD, hem (cytochrom b557) i kofaktor molibdenowy (Moco) zaangażowane w przenoszeniu elektronów z NAD(P)H na substrat

(w normalnych warunkach – azotan). Reduktaza azotanowa jest flawoenzymem zaliczanym do grupy reduktaz ferredoksyna-NADP⁺. Aktywność reduktazy azotanowej podlega również regulacji na poziomie potranslacyjnym na drodze fosforylacji reszt serynowych (reszta Ser 543 u szpinaku, reszta Ser 521 u tytoniu), zlokalizowanych w miejscu rozdzielającym domenę hemowa od domeny Moco [65]. Ufosforylowana reduktaza azotanowa w obecności jonów magnezu lub spermidyny wiąże białko 14-3-3, co prowadzi do jej inaktywacji. W liściach roślin szybka inaktywacja reduktazy azotanowej ma miejsce w ciemności, przy niedobrze CO₂, co jak powszechnie uważano, ma na celu przeciwdziałanie nagromadzeniu się azotynów, gdyż do ich dalszej redukcji przez NiR niezbędna jest ferredoksyna jako donor elektronów, a ta wytwarzana jest w chloroplastach w trakcie fotosyntezy. Może to też być mechanizm regulujący wytwarzanie NO w komórkach roślin.

W korzeniach roślin reduktaza azotanowa jest szybko aktywowana (przez defosforylację), gdy redukcja azotynów jest zahamowana w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, które sprzyjają nagromadzeniu się i wydzielaniu azotynów. Redukcja azotynów do NO przez reduktazę azotanową może sprzyjać przeżywaniu korzeni roślin w warunkach beztlenowych [66].

W reakcjach katalizowanych przez reduktazę azotanową donorem elektronów jest NAD(P)H. Dwa elektrony z NAD(P)H przenoszone są na FAD w grupie hemowej reduktazy azotanowej, a stąd kolejno, jeden po drugim, na żelazo w grupie hemowej. Elektrony te z kolei redukują atom molibdenu z Mo +6 na Mo +4, który redukuje azotan do azotynu. Jak dotąd nie ustalono czy w redukcję azotynu do NO zaangażowany jest Mo +5 czy też Mo +4. Zakłada się, że możliwa jest sytuacja gdzie dwie cząsteczki azotynu mogą być zredukowane do NO przy udziale dwóch elektronów związanych z Moco, jak i taka, gdy jeden elektron przeniesiony na Mo wykorzystywany jest do redukcji jednej cząsteczki azotynu [64].

Zdolność reduktazy azotanowej do redukcji azotanów i azotynów podlega regulacji, odpowiednio, przez azotyny i azotany, które są kompetycyjnymi inhibitorami tych aktywności: K_i = 50 μM dla azotanu i K_i = 250 μM dla azotynów, co wskazuje, że zdolność do tworzenia NO w normalnych warunkach (wysokie stężenie azotanów, niskie stężenie azotynów) jest niska. Przemawia to również za tym, że redukcja azotynu i azotanu przez reduktazę azotanową odbywa się w tym samym miejscu enzymu, tj. w Moco.

Reduktaza azotanowa może brać udział w przenoszeniu elektronów z NADH na tlen [60], co, w konsekwencji, prowadzi do powstawania anionorodnika ponadtlenkowego (O₂^{•-}), który w reakcji z NO tworzy wysoce toksyczny i reaktywny nadtlenoazotyn (ONOO[•]). Aby uniknąć takiej sytuacji, wydaje się, że tworzenie NO przez reduktazę musi podlegać regulacji przez stężenie tlenu. Wykazano, że oczyszczona reduktaza wytwarza NO w znacznie większych stężeniach w warunkach beztlenowych [22].

Zwraca się uwagę na udział azotanu, NO i roślinnych hemoglobin niesymbiotycznych w podtrzymywaniu ży-

wotności komórek roślinnych w warunkach ograniczonego dostępu tlenu lub jego braku. Igamberdiew i Hill [67] zaproponowali model, w którym azotan pełni funkcje pośredniego akceptora elektronów w warunkach braku tlenu, ulegając redukcji przez reduktazę, kolejno do azotynów, a następnie do NO. Według autorów, NO może być utleniany do azotanów przez hemoglobiny indukowane w warunkach beztlenowych, które w tym cyklu odtwarzane są przez reduktazę methemoglobiny. Ten cykliczny przepływ elektronów może być pomocny w utrzymaniu właściwego stanu redoks w komórkach roślinnych przy bardzo niskim stężeniu tlenu i może być alternatywą dla procesu fermentacji. Wiele dowodów wskazujących, że hemoglobiny niesymbiotyczne odgrywają istotną rolę w utrzymaniu właściwego stężenia NO i jego detoksykacji w komórkach roślin, dostarczyli, między innymi, Perazzoli i wsp. [68], wykazując, że u *A. thaliana* niesymbiotyczne hemoglobiny pełnią funkcję dioksygenazy utleniającej NO do azotanu, ograniczając jego emisję z roślin w warunkach ograniczonego dostępu tlenu. Wykazali też, że s-nitrozohemoglobina jest endogennie tworzona w roślinach.

Wielu autorów postuluje, że reduktaza azotanowa jest głównym źródłem NO u roślin wyższych [62,69]. Jednak biorąc pod uwagę fakt, że azotan nie jest jedynym źródłem azotu dla roślin – mogą one wykorzystywać także inne źródła azotu nieorganicznego, powyższe stwierdzenie może budzić wątpliwości. Znane są przykłady prac, w których udział reduktazy azotanowej jako głównego źródła NO w roślinach jest kwestionowany. Wykazano na przykład, że u podwójnych mutantów *A. thaliana*: *nia1*, *nia2* z obniżoną aktywnością reduktazy azotanowej, wytwarzanie NO w odpowiedzi na zakażenie przez bakterie i uszkodzenie mechaniczne jest podobne, jak u roślin niezmutowanych [27,70].

Uważa się, że reduktaza azotanowa i roślinne syntazy NOS, takie jak AtNOS1, mogą być funkcjonalnymi homologami zwierzęcych syntaz NO: eNOS i nNOS, odpowiedzialnymi za podstawową produkcję NO w komórkach roślinnych, podczas gdy rodzaj białka P o aktywności dekarboksylazy glicyny mógłby być homologiem iNOS, tworzącym NO w wyższych stężeniach w odpowiedzi na atak patogenów. Jest to jeden z proponowanych schematów wytwarzania NO w komórkach roślinnych, ciągle korygowany przez nowe dane eksperymentalne. Wykazano na przykład, że reduktaza azotanowa zaangażowana jest w wytwarzanie NO w bulwach ziemniaka w odpowiedzi na zakażenie *Phytophthora* [60].

Na udział reduktazy azotanowej w wytwarzaniu NO w komórkach roślin nowe światło rzuciły badania z ostatnich lat, w których wykazano, że mitochondria komórek roślin, podobnie jak mitochondria komórek zwierząt [71], zawierają aktywność enzymatyczną reduktazy azotyn-NO. Azotyn wytwarzany przez reduktazę azotanową w cytosolu, transportowany do mitochondriów, zredukowany jest przez mitochondrialny transport elektronów. Mechanizm ten jest blokowany przez tlen. Inhibitory transportu elektronów hamują syntezę NO, co wskazuje, że elektrony z łańcucha transportu elektronów mogą być zaangażowane w redukcję NO. Synteza NO w mitochondriach jest uzależniona od stosunków ilościowych azotyn-azotan w cytosolu [72]. Zdol-

ność do tworzenia NO z azotynu zaobserwowano zarówno w mitochondriach komórek korzeni [73], jak i w mitochondriach komórek liści [26].

W błonach komórkowych komórek korzeni roślin tytoniu wykryto występowanie specyficznej dla tych organów aktywności enzymatycznej reduktazy azotynu – tlenek azotu (NI-NOR, 310 kDa) [74]. Aktywność reduktazy NI-NOR różni się znacznie od aktywności cytosolowej reduktazy azotanowej między innymi tym, że jest niewrażliwa na cyjanek – inhibitor reduktazy azotanowej, nie wykorzystuje też zredukowanego NADH jako źródła elektronów. Donor elektronów dla tego enzymu nie został jak dotąd jednoznacznie określony. Wykazano, że w warunkach *in vitro* może nim być zredukowany cytochrom c; jednak udział cytochromu c jako donora elektronów w błonach komórkowych *in vivo* wydaje się mało prawdopodobny. Sugeruje się udział innego cytochromu lub hemoglobiny w tym procesie. Optymalne pH do działania reduktazy NI-NOR jest bardziej kwaśne (pH 6.1) niż dla cytosolowej reduktazy (pH 8.0) i odpowiada pH apoplastycznemu. Aktywność NI-NOR jest odwracalnie hamowana w obecności tlenu; enzym ten traci ok. 78% swojej aktywności przy stężeniu tlenu 21%, co wskazuje, że tworzenie NO z azotynu może być regulowane dostępnością tlenu. Wskazuje się na ścisły związek pomiędzy reduktazą NI-NOR i, zlokalizowaną w błonach komórkowych, reduktazą azotanową (PM-NR, 200 kDa), która redukuje azotan do azotynu w apoplacie komórek korzenia, używając głównie bursztynianu, ale także NADH, jako donorów elektronów [75]. Aktywność błonowej formy reduktazy azotanowej znacznie przewyższa aktywność cytosolowej reduktazy, szczególnie w ciągu nocy. Jak dotąd nie zidentyfikowano białka tej reduktazy azotanowej; aktualnie prowadzone są prace nad jej oczyszczeniem i charakterystyką. Jednak ekstrakty z korzeni wykazują aktywność błonowej reduktazy silnie rosnącą w obecności wysokich zewnętrznych stężeń azotanu. Silne tworzenie NO w apoplacie może funkcjonować jako sygnał braku tlenu.

Reduktazy azotynowe związane z błonami komórkowymi bakterii denitryfikacyjnych są odpowiedzialne za wytwarzanie NO z azotynu [76]. Trwają prace nad oczyszczeniem białka NI-NOR i być może wkrótce wyjaśni się czy istnieje homologia między enzymami roślinnymi i bakteryjnymi.

Jak dotąd nie udało się ustalić czy te dwa enzymy związane z błonami komórkowymi: NI-NOR i PM-NR, są enzymami konstytutywnymi czy też indukowanymi. Ocenia się, że w korzeniach roślin tytoniu: 1/3 azotanów jest redukowana przez cNR, 2/3 – przez związane z błonami komórkowymi PM-NR.

INNE SYSTEMY WYTWARZAJĄCE NO W ROŚLINACH

NIEENZYMATYCZNE TWORZENIE NO

W roślinach tlenek azotu może być tworzony nieenzymatycznie, np. jako produkt uboczny utleniania N₂O w atmosferze tlenowej w procesach nityfikacji/denitryfikacji [33]. W przestrzeni apoplastycznej komórek roślinnych NO może być tworzony z azotynu nieenzymatycznie; kwaśny odczyn tego środowiska sprzyja dysmutacji azotynu do

NO i azotanu [77]. W kwaśnym środowisku (pH 3–6) azotyn może ulegać chemicznej redukcji przy udziale kwasu askorbinowego, co prowadzi do powstania NO i kwasu dehydroaskorbinowego [78]. Reakcja taka może mieć miejsce w przestrzeni apoplastycznej, chloroplastach i komórkach aleuronowych, gdzie stwierdzono obecność kwasu askorbinowego [79,80].

Inny nieenzymatyczny mechanizm tworzenia NO w komórkach roślinnych to zależna od karotenoidów redukcja azotanów w obecności światła [81]:



INNE ENZYMY GENERUJĄCE NO W KOMÓRKACH ROŚLIN

Oksydoreduktaza ksantynowa (XOR), zawierająca ko-faktor molibdenowy (Moco), jest enzymem biorącym udział w tworzeniu NO w komórkach zwierzęcych [82]. Enzym ten występuje w dwóch przechodzących w siebie, odwracalnych formach: jako oksydaza ksantynowa wytwarzająca anionorodnik ponadtlenkowy (forma O; EC 1.1.3.22) i dehydrogenaza ksantynowa (forma D; EC 1.1.1.204) [83].

Oksydoreduktazę ksantynową wykryto w peroksysomach liści grochu gdzie występuje ona głównie w formie oksydazy ksantynowej; tylko 30% w formie dehydrogenazy ksantynowej [84,85]. XOR może katalizować zarówno reakcje tworzenia O₂⁻, jak i NO, w zależności od tego, czy stężenie tlenu jest odpowiednio wysokie czy niskie [82,86], a to sprawia, że powinna być ona rozważana jako jeden z kluczowych enzymów będących źródłem cząstek sygnałowych w komórkach roślinnych.

Tlenek azotu i cytrulia mogą być tworzone w komórkach roślinnych przez peroksydazę chrzanową z N-hydroksyargininy (NOHA) przy udziale H₂O₂ [87]. Peroksydaza chrzanowa może też wytwarzać NO z hydroksymocznika i H₂O₂ [88]. Biorąc pod uwagę fakt powszechnego występowania peroksydaz w komórkach roślinnych i ich zaangażowanie w wielu ważnych procesach fizjologicznych [89], enzymy te mogą zajmować ważne miejsce w ogólnym mechanizmie wytwarzania NO w roślinach.

Inne enzymy, hemoproteiny, których udział w wytwarzaniu NO w komórkach roślinnych jest rozważany, to cytochromy P450. Białka te występują w roślinach i wykazano, że katalizują utlenianie NOHA przez NADPH i O₂, wytwarzając NO [90,91]. Wykazano również, że katalaza i hemoglobina tworzą NO i inne tlenki azotu, katalizując utlenianie NOHA [87].

UWAGI KOŃCOWE

W wyniku szeroko zakrojonych badań prowadzonych od wielu lat dostarczono szereg cennych informacji dotyczących tlenku azotu i jego roli w roślinach, ciągle jednak wiele zagadnień dotyczących tego związku pozostaje niewyjaśnionych. Najwięcej kontrowersji i tematów do nieustającej dyskusji dostarcza zagadnienie miejsc, a przede wszystkim mechanizmów, zaangażowanych w tworzenie tlenku azotu w roślinach. Choć aktywność syntaz NO wy-

krywa się w tkankach roślin, jak dotąd nie wykryto genu, ani też białka o sekwencji podobnej do jakiegokolwiek znanej syntazy NO u zwierząt. W latach 2003–2004 pojawiły się prace donoszące o występowaniu u roślin syntaz tlenku azotu: iNOS i AtNOS1 tworzących NO z argininy, jednak wkrótce po ich ukazaniu się, niektóre z nich zostały odwołane, a aktualnie toczy się dyskusja poddająca w wątpliwość istnienie AtNOS1 u roślin. Reduktaza azotanowa jest jedynym enzymem, którego udział w tworzeniu NO w komórkach roślin jest niekwestionowany. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że enzym ten generuje NO w roślinach w obecności azotanów w środowisku i azotynów w roślinie, głównie przy braku lub ograniczonym dostępie tlenu, trudno zakładać, że jest to jedyne, czy też główne źródło NO w roślinach rosnących w różnych, zmieniających się warunkach środowiska. Wydaje się, że istnienie specyficznych dla roślin syntaz tlenku azotu jest wysoce prawdopodobne. Być może w usilnych poszukiwaniach roślinnych syntaz tlenku azotu popełniany jest błąd ścisłego kopiowania i adaptowania do świata roślin metod używanych do ich wykrywania w komórkach zwierząt. Wiele wskazuje na to, że roślinne syntazy NO wymagają na przykład innych kofaktorów, warunkujących ich stabilność i wysoce specyficzną aktywność. Problemy metodologiczne w wykrywaniu NO w tkankach roślin mogą być przyczyną nieścisłości i niejednoznaczności otrzymywanych wyników. Aktualnie toczy się szeroka dyskusja nad poprawnością i skutecznością metod stosowanych w badaniach tlenku azotu w komórkach roślin. Być może ich solidna weryfikacja przyczyni się w niedalekiej przyszłości do ograniczenia ilości niejednoznacznych wyników, które przyczyniają się do wyciągania nie w pełni uzasadnionych wniosków. Biorąc pod uwagę wysiłki podejmowane aktualnie w wielu ośrodkach naukowych, można mieć nadzieję, że zakrojone na szeroką skalę badania z zastosowaniem nowych, w tym wielce obiecujących, metod, np. z zastosowaniem roślin ze zmodyfikowaną ekspresją genów kodujących reduktazę azotanową, NOS, Hb (wiele takich roślin jest już aktualnie dostępnych), przyczyni się do uzyskania jednoznacznych, niebudzących wątpliwości wyników, które pozwolą na rozwiązanie niewyjaśnionych do tej pory problemów. Istnieją poważne przesłanki pozwalające przypuszczać, że ważną, specyficzną dla komórek roślinnych rolę w homeostazie tlenku azotu w roślinach odgrywają niesymbiotyczne hemoglobiny, a także poliaminy.

PIŚMIENNICTWO

- Koshland DE Jr (1992) The molecule of the year. *Science* 258: 1861
- Klepper LA (1979) Nitric oxide (NO) and nitrogen-dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmosphere and Environment* 13: 537-542
- Delledonne M, Xia YJ, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) Defence gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10328-10333
- Crawford NM, Guo FQ (2005) New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci* 10: 195-200
- Perazzoli M, Romero-Puertas MC, Delledonne M (2006) Modulation of nitric oxide bioactivity by plant hemoglobins. *J Exp Bot* 57: 479-488
- Kopyra M, Gwóźdź EA (2003) Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiol Biochem* 41: 1011-1017
- Bethke PC, Gubler F, Jacobsen JV, Jones RL (2004) Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* 219: 847-855
- Leshem YY, Willis RBH, Veng-Va Ku V (1998) Evidence for the function of the free radical gas - nitric oxide (NO), as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol Biochem* 36: 825-833
- Beligni MV, Lamattina L (2001) Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environ* 24: 267-278
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lamattina L (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol* 132: 1241-1248
- Hu X, Neil SJ, Tang Z, Cai W (2005) Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol* 137: 663-670
- Desikan R, Griffiths R, Hancock JT, Neil SJ (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16314-16318
- Desikan R, Cheung MK, Bright J, Henson D, Hancock JT, Neill SJ (2004) ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J Exp Bot* 55: 205-212
- Garcia-Mata C, Lamattina L (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol* 128: 790-792
- Leshem YY, Haramathy E (1996) The characterization and contrasting effects of nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* foliage. *J Plant Physiol* 148: 258-263
- Hill AC, Bennet JH (1970) Inhibition of apparent photosynthesis by nitrogen oxides. *Atmospheric Environ* 4: 341-348
- Zottini M, Formentin E, Scattolin M, Carimi F, Lo Schiavo F, Terzi M (2002) Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *FEBS Lett* 515: 75-78
- Gabaldon C, Gomez Ros LV, Pedreno MA, Ros Barcelo A (2005) Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytologist* 165: 121-130
- He Y, Tang RH, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Gou F, Fiorani F, Jackson RB, Crawford NM, Pei ZM (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* 305: 1968-1971
- Prado A M, Porterfield DM, Feijo JA (2004) Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* 131: 2707-2714
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Bot* 53: 103-110
- Shimoda Y, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Sato S, Kato T, Tabata S, Hishashi S, Uchiumi T (2005) Symbiotic rhizobium and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* 46: 99-107
- Zhao L, Zhang F, Guo J, Yang Y, Li B, Zhang L (2004) Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiol* 134: 849-857
- Shi S, Wang G, Wang Y, Zhang L, Zhang L (2005) Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. *Nitric Oxide* 13: 1-9
- Modolo LV, Augusto O, Almeida IMG, Pinto-Magli CAF, Oliveira HC, Seligman K, Salgado I (2006) Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci* 171: 34-40
- Zhang C, Czymbek KJ, Shapiro AD (2003) Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the *Arabidopsis* hypersensitive response. *Mol Plant-Microbe Interact* 16: 962-972

28. Tada Y, Mori T, Shinogi T, Yao N, Takahashi S, Betsuyaku S, Sakamoto M, Park P, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S (2004). Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defense response of oat. *Mol Plant-Microbe Interact* 17: 245-253
29. Polverari A, Molesini B, Pezzotti M, Buonauro R, Marte M, Delledonne M (2003) Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact* 16: 1094-1105
30. Van Baarlen P, Staats M, Van Kann JAL (2004) Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol* 5: 559-574
31. Małolepsza U, Różalska S (2005) Nitric oxide modulates hydrogen peroxide level in o-hydroxyethylorutin-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Physiol Biochem* 43: 623-635
32. 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
33. Wojtaszek P (2000) Nitric oxide in plants: to NO or not to NO. *Phytochemistry* 54: 1-4
34. Matkowski A (2002) Tlenek azotu u roślin. *Post Biol Kom* 29: 613-626
35. del Rio LA, Corpas FJ, Barroso JB (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* 64: 783-792
36. Crawford NM, Guo FQ (2005) New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci* 10: 195-200
37. Delledonne M (2005) NO news is good news for plants. *Curr Opin Plant Biol* 8: 390-396
38. Stuehr DJ (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochem Biophys Acta* 1411: 217-230
39. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615
40. Zhang Z, Naughton D, Winjand PG, Benjamin N, Blake DR, Symons MCR (1998) Generation of nitric oxide by nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 767-772
41. Lepore DA (2002) Detection and quantification of nitric oxide (NO) synthase-independent generation of NO. *Methods Enzymol* 359: 180-186
42. Nagase S, Takemura K, Ueda A, Hirayama A, Aoyagi K, Kondoh M, Koyama A (1997) A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun* 233: 150-153
43. Klink M, Świerzko A, Sułkowska Z (2001) Nitric oxide generation from hydroxylamine in the presence of neutrophils and in the cell-free system. *AMPIS* 109: 493-499
44. Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Sandalio LM, Valderrama R, Palma JM, Lupianez JA, del Rio LA (1999) Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *J Biol Biochem* 274: 36729-36733
45. Ribeiro EA Jr, Cunha FQ, Tamashiro WM, Martins IS (1999) Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett* 445: 283-286
46. Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM, León AM, Sandalio LM, del Rio LA (2006) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* 224: 246-254
47. Chandok MR, Ytterberg AJ, van Wijk KJ, Klessig DF (2003) The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell* 113: 469-482
48. Chandok MR, Ekengren SE, Martin G, Klessig DF (2004) Suppression of pathogen-inducible NO synthase (iNOS) activity in tomato increases susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8239-8244
49. Klessig DF, Martin GB, Ekengren Sk (2004) Retraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 16081
50. Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302: 100-103
51. Zeidler D, Zahringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 44: 15811-15816
52. Guo FQ, Crawford NM (2005) *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* 17: 3436-3450
53. Zemojtel T, Fröhlich A, Palmieri MC, Kolanczyk M, Mikula I, Wyrwicz LS, Wanker EE, Mundlos S, Vingron M, Martasek P, Durner J (2006) Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci* 11: 524-525
54. Crawford NM, Galli M, Tischner R, Heimer YM, Okamoto M, Mack A (2006) Response to Zemojtel et al: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends Plant Sci* 11: 526-528
55. Guo FQ (2006) Response to Zemojtel et al: Plant nitric oxide synthase: ATNOS1 is just the beginning. *Trends Plant Sci* 11: 527-528
56. Yamasaki H, Cohen M (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci* 11: 522-524
57. Harper JE (1981) Evolution of nitrogen oxides(s) during *in vivo* nitrate reductase assay of soybean leaves. *Plant Physiol* 68: 1488-1493
58. Yamasaki H, Sakihama Y (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* 468: 89-92
59. Garcia-Mata C, Lamattina L (2003) Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure: is nitrate reductase one of the missing links? *Trends Plant Sci* 8: 20-26
60. Yamamoto A, Katou S, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K (2003). Nitrate reductase, a nitric oxide-producing enzyme: induction by pathogen signal. *J Gen Plant Pathol* 69: 218-229
61. Haba P, Agura E, Benitez L, Maldonado JM (2001). Modulation of nitrate reductase activity in cucumber (*Cucumis sativa*) roots. *Plant Sci* 161: 231-237
62. Xu YC, Zhao BL (2003) The main origin of endogenous NO in higher nonleguminous plants. *Plant Physiol Biochem* 41: 833-838
63. Kaiser WM, Huber SC (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J Exp Bot* 52: 1981-1989
64. Meyer C, Lea US, Provan F, Kaiser WM, Lillo C (2005) Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosynth Res* 83: 181-189
65. Lillo C, Lea US, Leydecker MT, Meyer C (2003) Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in constitutive activation of the enzyme *in vivo* and nitrite accumulation. *Plant J* 35: 566-573
66. Stoimenova M, Libourel IGL, Ratcliffe RG, Kaiser WM (2003) The role of nitrate reductase in the anoxia metabolism of roots. II. Anoxic metabolism of tobacco roots with or without nitrate reductase activity. *Plant Soil* 253: 155-167
67. Igamberdiev AU, Hill RD (2004) Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. *J Exp Bot* 55: 2473-2482
68. Perazzolli M, Dominici P, Romero-Puertas MC, Zago ED, Zeier J, Sonoda M, Lamb C, Delledonne M (2004) *Arabidopsis* non-symbiotic haemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* 16: 2785-2794
69. Raven JA (2003) Can plants rely on nitrate? *Trends Plant Sci* 8: 314-315
70. Garces H, Durzan D, Pedrosa MC (2001) Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot* 87: 567-574
71. Kozlov AV, Staniek K, Nohl H (1999) Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett* 454: 127-130
72. Tischner R, Planchet E, Kaiser WM (2004) Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. *FEBS Lett* 576: 151-155

73. Gupta KJ, Stoimenova M, Kaiser WM (2005) In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO *in vitro* and *in situ*. *J Exp Bot* 56: 2601-2609
74. Stöhr Ch, Stremlau S (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *J Exp Bot* 57: 463-470
75. Meyer C, Stöhr C (2002) Nitrate reductase and nitrite reductase. W: Foyer C, Noctor G (red) Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon metabolism. *Advances in Photosynthesis*. Kluwer, str. 49-62
76. Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 533-616
77. Stöhr C, Ulrich WR (2002) Generation and possible roles on NO in plant roots and their apoplastic space. *J Exp Bot* 53: 2293-2303
78. Henry YA, Ducastel B, Guissani A (1997) Basic chemistry of nitric oxide and related nitrogen oxides. W: Henry YA, Guissani A, Ducastel B (red) Nitric Oxide Research from Chemistry to Biology. Landes Co Biomed Publ, Austin, USA, str. 15-46
79. Horemans N, Foyer CH, Asard H (2000) Transport and action of ascorbate at the plasma membrane. *Trends Plant Sci* 5: 263-267
80. Beligni MV, Fath A, Bethke PC, Lamattina L, Jones RL (2002) Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiol* 129: 1642-1650
81. Cooney RV, Harwood PJ, Custer LJ, Franke AA (1994) Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environ Health Persp* 102: 460-452
82. Harrison R (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radical Biol Med* 33: 774-797
83. Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Romero-Puertas MC, McCarthy I, del Rio LA (2002) Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol Biochem* 40: 521-530
84. Sandalio LM, Fernández VM, Rupérez FL, del Rio LA (1998) Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes. *Plant Physiol* 87: 1-4
85. Corpas FJ, de la Colina C, Sánchez-Rasero F, del Rio LA (1997) A role for leaf peroxisomes in the catabolism of purines. *J Plant Physiol* 151: 246-250
86. Godber BLJ, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R, Harrison R, (2000) Reduction of nitrite to nitric oxide catalysed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem* 275: 7757-7763
87. Boucher JL, Genet A, Vadon S, Delaforge M, Mansuy D (1992a) Formation of nitrogen oxides and citrulline upon oxidation of N^w-hydroxy-L-arginine by hemoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 184: 1158-1164
88. Huang J, Sommers EM, Kim-Shapiro DB, King SB (2002) Horseradish peroxidase catalysed nitric oxide formation from hydroxyurea. *J Am Chem Soc* 124: 3473-3480
89. Veitch NC (2004) Horseradish peroxidase: a modern review of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65: 249-259
90. Boucher JL, Genet A, Vadon S, Delaforge M, Henry Y, Mansuy D (1992b) Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N^w-hydroxy-L-arginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 880-886
91. Mansuy D, Boucher JL (2002) Oxidation of N-hydroxyguanidines by cytochromes P450 and NO-synthases and formation of nitric oxide. *Drug Metab Rev* 34: 593-606

Nitric oxide production in plants

Urszula Małolepsza 

Department of Plant Physiology and Biochemistry, University of Lodz, 12/16 Banacha St., 90-237 Lodz, Poland

e-mail: ulmal@biol.uni.lodz.pl

Key words: NO, nitric oxide synthase activity, nitrate reductase

ABSTRACT

There are still many controversial observations and opinions on the cellular/subcellular localization and sources of endogenous nitric oxide synthesis in plant cells. NO can be produced in plants by non-enzymatic and enzymatic systems depending on plant species, organ or tissue as well as on physiological state of the plant and changing environmental conditions. The best documented reactions in plant that contribute to NO production are NO production from nitrite as a substrate by cytosolic (cNR) and membrane bound (PM-NR) nitrate reductases (NR), and NO production by several arginine-dependent nitric oxide synthase-like activities (NOS). The latest papers indicate that mitochondria are an important source of arginine- and nitrite-dependent NO production in plants. There are other potential enzymatic sources of NO in plants including xanthine oxidoreductase, peroxidase, cytochrome P450.

Magdalena Migocka[✉]

Ewa Nowojska

Grażyna Kłobus

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Roślin Uniwersytetu Wrocławskiego

[✉]Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Roślin Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław; tel.: (071) 375 41 11, e-mail: mmigocka@biol.uni.wroc.pl

Artykuł otrzymano 21 grudnia 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 5 kwietnia 2007 r.

Słowa kluczowe: transportery metali, detoksykacja, transport pierwotny i wtórny

Wykaz skrótów: ABC (ang. *ATP-binding cassette*) – kasetka wiążąca ATP; CAX (ang. *cation exchanger*) – wymiennik kationów; CDF (ang. *cation diffusion facilitator*) – przenośnik kationów; MHX (ang. *magnesium/proton exchanger*) – wymiennik magnez/proton; MTP (ang. *magnesium transporter*) – transporter magnezowy; P_{1B} -ATPazy (ang. *P1B-ATPases*) – ATPazy typu P_{1B} ; YSL (ang. *Yellow Strip-Like protein*)

STRESZCZENIE

W ostatnich latach kluczową rolę w pobieraniu, dystrybucji i detoksykacji metali ciężkich w komórkach roślinnych przypisuje się błonowym systemom transportowym [1,2]. Dotychczas zidentyfikowano i opisano u roślin liczne rodziny białek transportujących metale ciężkie [1]. Coraz więcej dowodów wskazuje, że większość z nich znajduje się w zewnętrznej i wakuolarnej błonie komórkowej [1,2]. Wykazano także, że transport metali przez błony może wykorzystywać energię pochodzącą z rozkładu ATP lub elektrochemiczny gradient protonów, wytwarzany przez pierwotne pompy protonowe. Obecność domen wiążących nukleotydy w niektórych białkach transporterowych sugeruje, że wykorzystują one ATP jako źródło energii. Na bazie sekwencji reszt aminokwasowych innych transporterów trudno wnioskować o mechanizmie ich działania. Jedynie badania funkcjonalne takich transporterów mogą wykazać, czy źródłem energii do przenoszenia metali przez błony może być tu gradient elektrochemiczny. W pracy przedstawiono krótką charakterystykę transporterów metalowych, dla których wykazano funkcję wtórnego transportu typu metal/ H^+ .

WPROWADZENIE

W ciągu ostatnich dziesięcioleci zanieczyszczenie środowiska metalami ciężkimi znacznie wzrosło. Ich nadmiar w środowisku wpływa negatywnie na funkcjonowanie coraz to większej i różnorodnej grupy ekosystemów. Rośliny, jako organizmy nie przemieszczające się w trakcie całego cyklu życiowego, są szczególnie narażone na niekorzystne działanie jonów metali obecnych w glebie. Aby uchronić się przed toksycznym działaniem metali ciężkich i jednocześnie utrzymać w komórce optymalne poziomy metali niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania, rośliny wytworzyły mechanizmy regulujące w sposób kompleksowy pobieranie, akumulację i usuwanie metali z komórki. Kluczową rolę przypisuje się tutaj błonowym systemom transportowym zlokalizowanym w plazmolemie i błonach wewnątrzkomórkowych [1,2]. Transport metali przez błony może wykorzystywać energię pochodzącą z rozkładu ATP (transport pierwotny) lub pierwotną siłę protonomotoryczną (pmf), wytwarzaną przez pompy protonowe (transport wtórny). W ostatnich latach pojawiło się wiele prac dotyczących transporterów pierwotnych i ich roli w utrzymaniu homeostazy jonowej w komórkach. Wyróżnia się wśród nich dwie rodziny białek, charakteryzujące się obecnością specyficznych domen wiążących nukleotydy: transportery typu ABC oraz pompy metalowe, P_{1B} -ATPazy [1,3,4]. Jednak znakomita większość zidentyfikowanych do tej pory rodzin białkowych transporterów metalowych nie posiada zdolności hydrolizy ATP. Należą tu białka z rodzin: CAX, CDF, Nramp i YSL, dla których źródłem energii jest prawdopodobnie elektrochemiczny gradient protonów, tworzony w błonach przy udziale pierwotnych pomp protonowych [1]. Poza wymienionymi białkami, w transporcie rozmaitych metali ciężkich przez błony prawdopodobnie uczestniczą również transportery magnezowe, działające jako antyportery [1,5]. W przeciągu ostatnich dziesięciu lat, coraz liczniej prezentowano dowody na obecność transporterów wtórnych metali u roślin. W związku z tym, w artykule przedstawiono pokrótce najlepiej dotąd zbadane rodziny białek zaangażowanych w transport typu metal/ H^+ w błonach komórek roślinnych.

TRANSPORTERY CAX

Transportery CAX (ang. *Cation exchanger*) należą do jednej z pięciu podrodzin białek tworzących dużą rodzinę antyporterów kationowych CaCA (ang. *Calcium/Cation Antiporters*) [6]. Białka CAX występują u roślin, grzybów i bakterii, ale jak dotąd nie stwierdzono ich obecności u ssaków [6]. Nie znaleziono genów kodujących transportery CAX w genomach człowieka, myszy, *Drosophila* czy *Caenorhabditis elegans*, aczkolwiek sekwencje homologiczne do roślinnych CAX występują u niższych kręgowców: płazów i ryb [7].

Geny kodujące transportery CAX u roślin należą do wielogenowej rodziny. Pierwsze doniesienia, pochodzące z badań na *Arabidopsis thaliana*, sugerowały, że w genomie tej rośliny występuje aż 11 sekwencji typu CAX [8]. Jednak późniejsze analizy filogenetyczne dowiodły, że spośród zidentyfikowanych genów tylko sekwencje CAX1-6 kodują właściwe białka CAX. Pozostałe sekwencje (geny CAX7 do 11) wykazywały znacznie większe podobieństwo do zależnych od potasu antyporterów $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ niż do innych genów CAX i dlatego zostały włączane do tej właśnie rodziny antyporterów [7]. Na podstawie składu aminokwasowego, roślinne białka CAX1-6 podzielono na dwie różne filogenetycznie grupy: typ IA obejmujący: CAX1, CAX3 i CAX4 oraz typ IB, do którego zaliczono: CAX2, CAX5 i CAX6 [7]. Prawdopodobnie obydwa typy białek pełnią odmienne funkcje w komórkach roślinnych.

U roślin wszystkie dotąd badane białka CAX występują w błonach tonoplastowych, a energię do wtórnego transportu jonów do wakuoli czerpią z gradientu pH, wytwarzanego przez pompy protonowe tonoplastu, V-ATPazę i PPAzę [7]. Przedstawiciele grupy CAX1-6 prezentują podobny typ budowy z niewielkimi różnicami w długości sekwencji i składzie aminokwasowym. Pojedynczy łańcuch polipeptydowy transporterów, złożony z 400 aminokwasów, tworzy w błonie tonoplastu 11 transbłonowych α -helis i posiada kilka charakterystycznych domen wyróżniających białka CAX spośród innych antyporterów kationowych (Ryc. 1). Domeny te regulują aktywność i prawdopodobnie decydują o specyficzności substratowej poszczególnych białek CAX. Należą tu: domena autoinhibitorowa, motyw kwaśnych aminokwasów, domena wapniowa (CaD), domena manganowa oraz domeny c-1 i c-2.

Domena autoinhibitorowa, obecna w długim, eksponowanym do cytoplazmy N-końcowym fragmencie łańcucha,

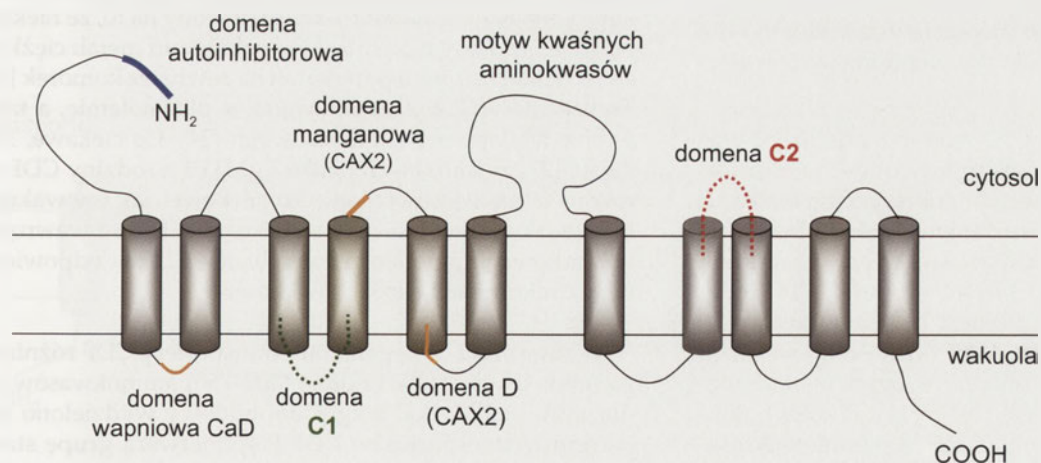
odpowiada za regulację aktywności białek [9-11]. Kiedy transformowano drożdże roślinnymi genami CAX1 i CAX2, kodującymi białka pozbawione domeny autoinhibitorowej, obserwowano podwyższoną akumulację wapnia w wakuolach grzybów [9,11]. Tak więc domena autoinhibitorowa wpływa negatywnie na aktywność białek CAX: prawdopodobnie poprzez oddziaływanie z inną funkcjonalną domeną białka blokuje funkcję białek [10,11]. Podobna domena funkcjonuje w białkach Ca^{2+} -ATPaz typu IIB, przy czym aktywacja pomp wapniowych polega na przyłączeniu kalmoduliny do domeny autoinhibitorowej [7], czego nie obserwowano dotąd w przypadku białek CAX. Domeny autoinhibitorowe są nieco odmienne w poszczególnych izoformach CAX, w związku z czym uważa się, że białka regulatorowe wiążące się do tych domen i aktywujące CAX mogą także się różnić [7,10].

Motyw kwaśnych aminokwasów, złożony z ok. 20 reszt aminokwasowych, występuje w dużej, hydrofilowej pętli eksponowanej do cytoplazmy, dzielącej białko na dwie, niemal równe, części. Niewiele wiadomo o funkcji tej domeny, jakkolwiek nie wyklucza się jej udziału w wiązaniu transportowanych kationów i determinacji specyficzności substratowej białka [7].

Domena wapniowa (CaD) jest obecna tylko w roślinnych CAX1, pomiędzy helisami 1 i 2 [7]. Prawdopodobnie jest niezbędna w transporcie wapnia przez białka CAX1, bowiem produkcja w komórkach drożdży pozostałych rekombinowanych białek CAX (zawierających domenę CaD CAX1) prowadziła do wzrostu aktywności transportu wapnia do wakuoli grzybów [12]. Ekspresja sekwencji genów CAX pozbawionych motywu CaD nie dawała podobnych efektów.

Domena manganowa to region złożony z 3 reszt aminokwasowych (Cys-Ala-Phe), zlokalizowanych w hydrofilowej

Transporter typu CAX



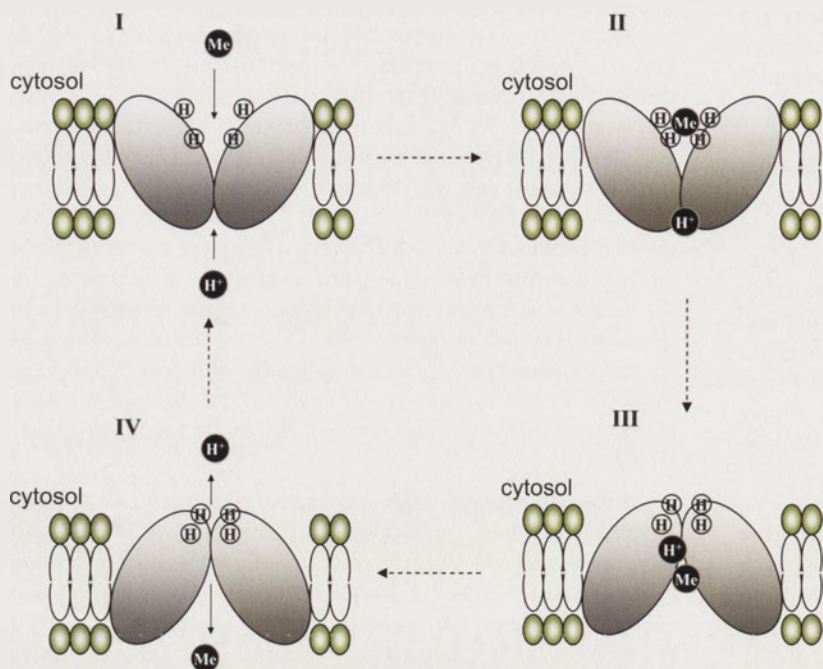
C1: GNVTELIISIFALKNGMIRVVQLTLLGSILSNMLLV

C2: GNAAEHAGAIMFAMKDKLDLSLGVAGSSIQISMF

Rycina 1. Model budowy transportera typu CAX (wg Shigaki i Hirschi [7], zmodyfikowane). Polipeptyd przecina błonę tonoplastową 12 razy. Domena autoinhibitorowa (niebieska) uczestniczy w negatywnej regulacji aktywności białek CAX; domeny c-1 i c-2 (kropkowane), prawdopodobnie biorą udział w selekcji specyficznych kationów, transportowanych przez białka CAX; domeny CaD, manganowa i D (pomarańczowe) oraz motyw kwaśnych aminokwasów mogą determinować specyficzność substratową poszczególnych białek Cax (powinowactwo do wapnia, manganu i innych metali).

pętli pomiędzy helisą 4 i 5, charakterystyczny dla białek CAX2. Prawdopodobnie jest on niezbędny w transporcie manganu, katalizowanym przez te białka [13]. Co ciekawe, podobny region występuje w sekwencjach białek AtCAX5 i AtCAX6 *Arabidopsis thaliana* oraz ZCAX2 *Zea mays*, co wskazuje na potencjalną rolę tych białek w transporcie Mn [13].

Domeny c-1 i c-2 zlokalizowane są w małych hydrofilowych pętlach, położonych, odpowiednio, pomiędzy 3 i 4 helisą (strona wakuolarna) oraz 8 i 9 helisą (strona cytoplazmatyczna). Mu-



Rycina 2. Mechanizm działania transporterów CDF (wg Vazquez-Ibar i wsp. [25], zmodyfikowane). Dimeryczne białka CDF, zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej, mogą przyjmować dwa stany konformacyjne, zróżnicowane pod względem powinowactwa do przenoszonych substratów. W jednym z nich kanał transportera, „otwarty” w kierunku do cytoplazmy (I), wykazuje wysokie powinowactwo do kationów metali (Me), które są wiązane prawdopodobnie poprzez reszty histydynowe (H) białka (II). Protony (H^+) z przestrzeni otaczającej komórkę wiążą się do negatywnie naładowanych reszt aminokwasowych białek w pozycji *trans* w stosunku do substratu (II), co zapoczątkowuje zmianę konformacji transporterów (III). Po osiągnięciu drugiego stanu konformacyjnego białka, protony są uwalniane do cytoplazmy, natomiast jony metalu przedostają się na zewnątrz komórki (IV), co powoduje powrót białka do pierwszego stanu konformacyjnego (I).

tacje w tych domenach prowadziły do częściowej lub całkowitej redukcji transportu Ca^{2+} i/lub Mn^{2+} z udziałem białek CAX, stąd przypisuje się im rolę filtra w selekcji specyficznych kationów [14]. Prawdopodobnie, w procesie selekcji kluczową rolę odgrywają reszty histydynowe obecne w regionie c-2 [14]. Reszty histydynowe obecne w polipeptydach CAX mogą być również zaangażowane w percepcję zmiany pH w środowisku komórki i związane z tym modyfikacje konformacji białek [15]. Takie działanie udowodniono dla reszty histydynowej 11-aminokwasowej domeny D występującej u CAX2 [15].

Funkcję roślinnych białek CAX badano, analizując ekspresję genów kodujących te transportery u roślin i transformowanych drożdży. Wykazano, że poszczególne białka tej rodziny mogą transportować różne jony metali (Ca, Mn – OsCAX1 i OsCAX3; Ca, Mn, Cd – AtCAX2-4) do wakuoli drożdży na drodze antyportu kation/proton [7,9,14,16,17]. Ekspresja genów CAX4 u *A. thaliana* była indukowana w obecności zwiększonych stężeń Mn i Ni w środowisku, co wskazuje na udział białek tej rodziny w deponowaniu różnych metali także w wakuolach roślin [16]. Z kolei traktowanie roślin egzogennym wapniem silnie stymulowało ekspresję CAX1 i CAX3, sugerując udział kodowanych przez geny białek w transporcie wapnia. Powyższą hipotezę potwierdzają badania, które wykazały, że nadekspresja genów CAX2 u tytoniu powodowała zwiększoną akumulację Mn i Cd w transformowanych roślinach [7,18]. Dotychczasowe przypuszczenia, dotyczące udziału białek CAX w transporcie metali ciężkich, potwierdziły wyniki ostatnich badań

KoRenkov'a i wsp. [19]. Badacze wprowadzili geny CAX1-4 *Arabidopsis* do *Nicotiana tabacum* i wykazali, że pęcherzyki tonoplastowe, izolowane ze wszystkich transformowanych roślin, wykazywały aktywności transportu Ca, Mn, Cd i Zn na drodze antyportu metal/proton [19].

Co ciekawe, zwiększone stężenie Na^+ w środowisku także stymulowało ekspresję genów CAX (CAX1-4), co wskazuje na udział białek kodowanych przez te geny w odpowiedzi na stres solny [7,20,21]. Z kolei działanie niskiej temperatury indukowało silnie akumulację transkryptów CAX w liściach *Arabidopsis*, sugerując udział białka w aklimatyzacji roślin do stresu chłodu. Wiele badań wskazuje także, że specyficzne mutacje rozmaitych CAX (CAX1, CAX2 i CAX3) objawiają się nie tylko zaburzeniami transportu metali do wakuoli, ale również drastycznym spadkiem aktywności V-ATPazy. Takie wyniki sugerują, że w tonoplaście komórek roślinnych transport H^+ jest regulowany na zasadzie sprzężenia zwrotnego przez wtórny transport metali [22,23].

TRANSPORTERY CDF

Geny kodujące białka z rodziny CDF (ang. *Cation Diffusion Facilitator*) zidentyfikowano u bakterii, Archea i Eucaryota [24]. Białka tej rodziny prawdopodobnie odpowiadają za transport metali, takich jak: cynk, kobalt, nikiel, mangan i kadm [24]. Mechanizm działania transporterów CDF, zaproponowany przez Vazquez-Ibar i wsp. [25], przedstawiono na Ryc. 2. Prawdopodobnie transport jonów metali jest tu sprzężony z równoczesnym przeniesieniem protonów w przeciwnym kierunku. Również Delhaize i wsp. [26] wykazali, że białko należące do tej rodziny (ShMTP1) funkcjonuje na zasadzie antyportu Mn^{2+}/H^+ w błonach wewnątrzkomórkowych tropikalnej rośliny motylkowej *Stylosanthes hamata*. Istnieją dowody na to, że niektóre białka tej rodziny uczestniczą w pobieraniu metali ciężkich, a inne katalizują transport metali na zewnątrz komórek [24].

Transportery CDF zlokalizowano w plazmolemie, a także w błonach wewnątrzkomórkowych [24]. Co ciekawe, Kim i wsp. [27] zlokalizowali białko TgMTP1 z rodziny CDF zarówno w zewnętrznej błonie komórkowej, jak i w wakuoli. W związku z tym, autorzy sugerują możliwość wewnątrzkomórkowego przemieszczania białek CDF w odpowiedzi na nadmiar metali ciężkich w komórce.

W zależności od organizmu, transportery CDF różnią się zarówno jakością, jak i ilością (300–750) aminokwasów budujących białko. Pod względem budowy wydzielono trzy podgrupy transporterów CDF [24]. Pierwszą grupę stanowią ZAT1 i ZAT2, występujące u *Arabidopsis* oraz białka zwierząt – ZnT. Drugą podgrupę tworzą pozostałe białka CDF eukariotów, włącznie z białkami drożdży; natomiast trzecia podgrupa zawiera wszystkie CDF prokariotów. Najlepiej dotąd scharakteryzowane białka tej rodziny, to transportery wydzielające Zn z cytosolu komórek ssaków, nazwane ZnT: ZnT-1, -2, -3 i -4 [24]. Pierwszą rośliną, u któ-

rej zidentyfikowano geny kodujące białka tej rodziny: ZAT1 i ZAT2 (ang. *Zinc Arabidopsis Transporter*) była *Arabidopsis thaliana*, przy czym sekwencja ZAT1 wykazuje największy stopień podobieństwa w stosunku do ZnT2 (69%), natomiast sekwencja ZAT2 jest najbardziej podobna (64%) do sekwencji ZnT4 [24].

Występujące u ssaków geny *ZnT* kodują białka błonowe zbudowane z 6 transbłonowych domen [24]. Analizy sekwencji genów zidentyfikowanych u *Arabidopsis* wskazują, że kodują one białka o budowie zbliżonej do białek ZnT [24] (Ryc. 3). Wydaje się, że cztery amfipatyczne helisy polipeptydów CDF (1, 2, 5 i 6) tworzą wewnętrzny rdzeń białka, który formuje kanał, a pozostałe dwie hydrofobowe helisy eksponowane są na zewnątrz, do frakcji lipidowej błony [24]. W transbłonowych helisach 2, 5 i 6 białek ZnT występują zachowane w ewolucji reszty asparaginianowe, które mogą brać udział w tworzeniu miejsc wiążących kationy wewnątrz kanału [24]. W białkach rodziny CDF, zarówno u ssaków, jak i u roślin, występuje zachowana w ewolucji domena sygnałowa, charakterystyczna tylko dla tej rodziny transporterów (Ryc. 3): SLAI(V)MTDAAHLLTD [24].

Białka ZnT posiadają również domenę zbudowaną z wielu reszt histydynowych, zlokalizowaną w dużej pętli cytoplazmatycznej, występującej pomiędzy helisami 4 i 5. Domena ta może funkcjonować jako region wiążący cynk [24]. Podobna domena występuje również w białkach ZAT1 i ZAT2 u *Arabidopsis*, jakkolwiek u roślin jest ona znacznie

dłuższa [24]. Podobny, bogaty w histydyny, motyw występuje u białek z rodziny ZIP [24] i u niektórych ATPaz metalowych [24].

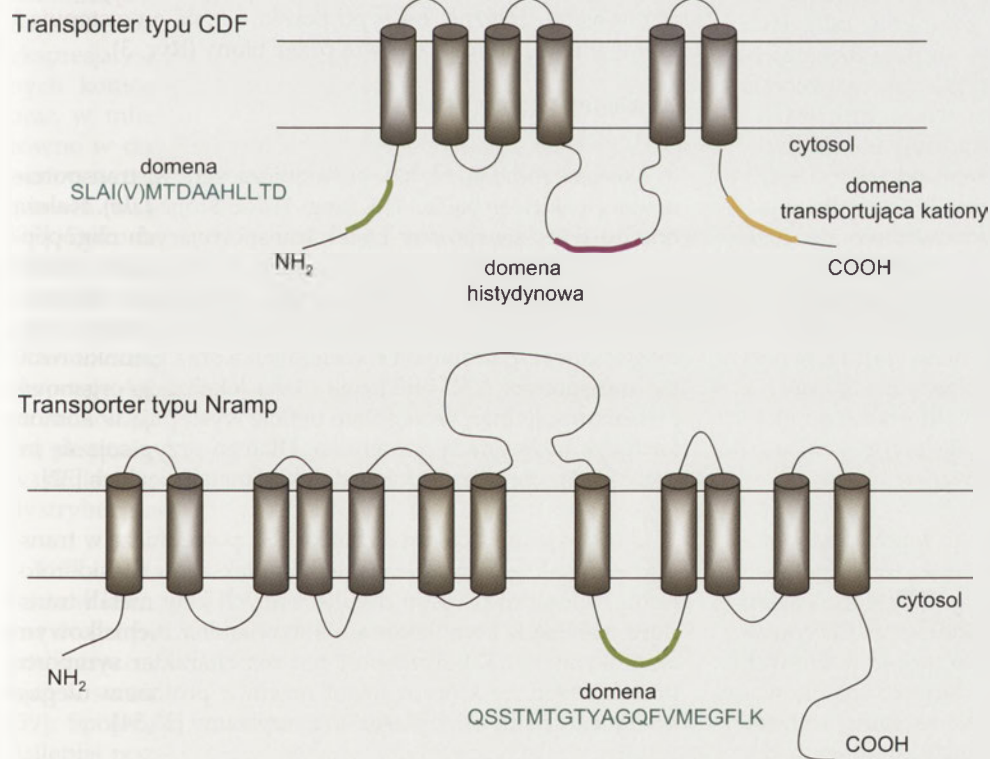
Jak dotąd, zidentyfikowano wielu przedstawicieli rodziny CDF u różnych gatunków roślin, ale pod względem funkcjonalnym opisano nieliczne białka roślinne tego typu (Ryc. 2). W tabeli 1 przedstawiono dotychczasowe rezultaty badań nad białkami CDF u roślin.

TRANSPORTERY Nramp

Rodzina Nramp (ang. *Natural resistance macrophage protein*) to stosunkowo nowa rodzina białek, którym przypisuje się funkcje transporterów dwuwartościowych jonów metali. Geny kodujące białka Nramp występują zarówno w komórkach bakterii, drożdży, owadów, ssaków, jak i roślin i charakteryzują się wysokim stopniem zachowania w ewolucji [24]. Pierwszy gen kodujący białko Nramp, gen *Nramp1*, zidentyfikowano u ssaków. Wykazano, że koduje on integralne białko błonowe występujące w lizosomach komórek makrofagów [24]. Podczas fagocytozy białko jest wbudowywane w błonę fagosomu i, przypuszczalnie, poprzez kontrolę stężenia kationów dwuwartościowych w kompartmentcie, reguluje replikację sfagocytowanych bakterii [24]. Mutacja w genie kodującym to białko prowadzi do podatności na zakażenia przez wewnątrzkomórkowe patogeny jak *Mycobacterium*, *Salmonella* i *Leishmania* [24].

Badania nad białkami Nramp u roślin wyższych zapoczątkowano u *Oryza sativa*, gdzie zidentyfikowano trzy geny podobne do *Nramp1*: *OsNramp1*, *OsNramp2* i *OsNramp3* [24]. Później zidentyfikowano podobne geny u *Arabidopsis thaliana*: *AtNramp1*, *AtNramp2*, *AtNramp3*, *AtNramp4*, *AtNramp5* i *EIN2* [24]. Także *EIN2* (ang. *ethylene-insensitive 2*), białko uczestniczące w transdukcji sygnału inicjowanej etylenem, wykazuje znaczące podobieństwo do białek Nramp w hydrofobowym regionie transporterów [24]. Na podstawie podobieństwa sekwencji nukleotydowych wyodrębniono dwie podrodziny genów *Nramp*. Do pierwszej zaliczono: *OsNramp1*, *OsNramp3* i *AtNramp5*, a do drugiej: *OsNramp2*, *AtNramp1*, *AtNramp2*, *AtNramp3* i *AtNramp4* [24].

Budowa transportera typu Nramp przedstawiona jest na rycinie 3. Podobnie jak u innych organizmów, roślinne białka Nramp zbudowane są z 12 transbłonowych helis, przy czym cechą charakterystyczną tych białek jest długi, hydrofilowy rejon C-końcowy łańcucha polipeptydowego,



Rycina 3. Proponowane modele strukturalne wtórnych transporterów metalowych z rodzin: CDF (TgMTP1) i Nramp (AtNramp3). Modele sporządzono przy użyciu algorytmu TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>), na podstawie sekwencji reszt aminokwasowych transporterów dostępnych w bazie NCBI: AAK91869 (TgMTP1) i NP179896 (AtNramp3) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). W obrębie struktury białek wyróżniono motywy reszt aminokwasowych charakterystyczne dla rodzin transporterów typu CDF i Nramp. Na schemacie transportera CDF zaznaczono dodatkowo dwie domeny: histydynową i wiążącą kationy, które bezpośrednio uczestniczą w wiązaniu i transporcie jonów metalowych.

Tabela 1. Funkcja i lokalizacja wybranych białek z rodziny CDF zidentyfikowanych u różnych gatunków roślin.

Białko CDF (nr dostępu)	Roślina	Funkcja	Lokalizacja komórkowa
ZAT1 (NP850459)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	udział w pobieraniu Zn , sekwestracja Zn w wakuoli i/lub innych organellach wewnątrzkomórkowych, udział w tolerancji na nadmiar Zn i utrzymaniu homeostazy Zn w komórce [24]	blony organelli wewnątrzkomórkowych
ZTP1 (AAK69428)	<i>Thlaspi caerulescens</i>	sekwestracja Zn w wakuoli i/lub innych organellach wewnątrzkomórkowych, udział w tolerancji na nadmiar Zn , Cd i Pb w środowisku [1]	blony organelli wewnątrzkomórkowych
MTP1 (AAK91869)	<i>Thlaspi goesigense</i>	sekwestracja Zn , Cd , Co i Ni w wakuoli, wydzielanie nadmiaru metali do apoplastu, udział w tolerancji na nadmiar metali w środowisku [1,27]	blony plazmolemy i wakuoli
(AAO38708)	<i>Stylosanthes hamata</i>	sekwestracja Mn w wakuoli i/lub innych organellach wewnątrzkomórkowych, udział w tolerancji na nadmiar Mn w środowisku [26]	blony organelli wewnątrzkomórkowych

ekspozowane do wnętrza komórki [24]. Po stronie cytoplazmatycznej znajdują się także 4 hydrofilowe pętle transportera [24]. W czwartej pętli białka, łączącej domeny 8 i 9, występuje zachowany w ewolucji dla tej rodziny motyw, odpowiadający za transportową funkcję białek Nramp: QS-STMTGTGTYAGQFVMEGFLK [24]. Jest to najlepiej zachowana sekwencja w obrębie rodziny Nramp, co wskazuje na jej kluczowe znaczenie dla funkcji białek [24]. Różnice w sekwencji aminokwasowej białek należących do tej rodziny, polegające między innymi na obecności, bądź braku motywów ulegających N-glikozylacji, sugerują lokalizację transporterów tego typu w różnych błonach komórkowych [24].

Podobieństwo genów kodujących białka należące do rodziny Nramp, pochodzących od gatunków odległych ewolucyjnie, wskazuje na podstawową funkcję fizjologiczną tych transporterów, świetnie zachowaną w procesie ewolucji [24]. W badaniach prowadzonych na drożdżach i ssakach dowiedziono, że Nramp transportują metale dwuwartościowe. Należące do tej rodziny białka drożdży, SMF1 i SMF2, uczestniczą w pobieraniu jonów Mn^{2+} , wykazując, odpowiednio, wysokie i niskie powinowactwo do tego metalu [24]. Wykazano również powinowactwo obydwu transporterów do jonów Cu^{2+} i Co^{2+} [24]. Z kolei transportery Nramp u ssaków stanowią główny, niezależny od transferyny, system pobierania żelaza przez nerki [24]. Transport Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} i innych dwuwartościowych kationów z udziałem Nramp jest u ssaków zależny od gradientu elektrochemicznego, stąd przypisuje mu się cechy wtórnego transportu H^+ /metal [24].

Transportery Nramp wykazują wysoki stopień podobieństwa w obrębie swojej rodziny, co sugeruje, że w roślinach przedstawiciele tej grupy białek pełnią podobne funkcje do swoich zwierzęcych i drożdżowych homologów. Przypuszczenia te potwierdziła heterologiczna ekspresja roślinnych genów Nramp w mutantach drożdży, w których zablokowano ekspresję genów SMF, należących do tej samej rodziny transporterów [28]. W transformowanych komórkach dochodziło do zniesienia efektów mutacji, co dowodziło, że roślinne białka Nramp funkcjonalnie zastąpiły drożdżowe białka SMF [28]. Geny *AtNramp1*, -3 i -4 ulegały wzmocnionej ekspresji w korzeniach *Arabidopsis* w warunkach deficytu Fe w środowisku [28], co sugeruje udział kodowanych przez nie białek w zaopatrywaniu roślin w żelazo. *AtNramp3*

ramp3 ulega ekspresji zarówno w wiązках przewodzących korzeni, jak i łodygach i liściach, w związku z czym postuluje się udział białka *AtNramp3* w dalekim transporcie metali w roślinach [29]. Białko z rodziny Nramp u pomidora, *LeNramp1*, jest także syntetyzowane w parenchymie naczyń korzenia, a ekspresję *LeNramp1* również indukuje deficyt Fe w środowisku [30]. To wskazuje, że białko *LeNramp* może uczestniczyć w mobilizacji Fe w parenchymie naczyń korzenia w warunkach niedoboru tego pierwiastka w środowisku. Z kolei analizy Northern Blot dowiodły, że geny *OsNramp1* i *OsNramp2* ulegają ekspresji, odpowiednio, w korzeniach i liściach, podczas gdy *OsNramp3* koduje białko występujące w obydwu organach [24], co dowodzi, że aktywność transporterów Nramp może być w różny sposób regulowana, zależnie od typu tkanki, w jakiej występują i jonów metali, które przenoszą przez blony (Ryc. 3).

TRANSPORTERY YSL

Kolejną rodziną białek pośredniczących w transporcie metali ciężkich są białka YSL (ang. *Yellow Stripe-Like*). Należą one do większej rodziny białek transportujących oligopeptydy, OPT (ang. *Oligopeptide Transporter Family*) [31]. Białka YSL wykryto dotąd u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*), tobołków (*Thlaspi caerulescens*), kukurydzy (*Zea mays*) i ryżu (*Oryza sativa*). Zależnie od rodzaju białka oraz gatunku rośliny, transportery YSL wykazują różną lokalizację organową i tkankową, jednak szczególnie obficie występują w komórkach towarzyszących naczyniom. Dlatego przypisuje się im szczególną rolę w transporcie dalekim metali ciężkich [32].

U roślin jednoliściennych białka YSL pośredniczą w transporcie metali, głównie żelaza, w kompleksach z fitosideroforami. Natomiast u roślin dwuliściennych jony metali transportowane są w kompleksie z nikotynoaminą, niebiałkowym aminokwasem [32]. Transport ten ma charakter symportu protonowego, w którym metal razem z protonem ulegają przemieszczeniu z apoplastu do cytoplazmy [33,34].

Pojedynczy łańcuch polipeptydowy transporterów YSL składa się z około 700 aminokwasów i przecina błonę 14-15 razy, zależnie od gatunku rośliny [32]. Rejon N-końcowy łańcucha z wolną grupą aminową jest rejonem bogatym w reszty kwaśnych aminokwasów, glutaminian i asparaginian [32,35,36].

Najlepiej poznane pod względem kinetycznym są białka YSL kukurydzy. Wykazano, że odpowiadają one za pobieranie żelaza w kompleksie z fitosideoroforami, a ich synteza jest stymulowana w warunkach niedoboru Fe. Heterologiczna ekspresja *ZmYSL* w oocytach *Xenopus* i komórkach drożdży dowiodła, że białka te, poza żelazem, mogą także transportować inne metale, takie jak: Zn, Ni i Cu [33-35].

W genomie ryżu stwierdzono aż 19 sekwencji kodujących białka OsYSL [2]. Ich ekspresja wykazuje różną specyficzność organową i jest w różny sposób regulowana przez status żelazowy środowiska. I tak, ekspresja *OsYSL2* zachodzi tylko w liściach i rozwijających się nasionach ryżu i jest stymulowana w warunkach deficytu żelaza. Z kolei ekspresja genu *OsYSL13* zachodzi głównie w liściach, ale nie zależy od dostępności żelaza. Fundamentalny charakter ma także ekspresja genów *OsYSL6* oraz *OsYSL14*, a kodowane przez nie białka zidentyfikowano zarówno w liściach, jak i korzeniach. Z kolei ekspresja genu *OsYSL15* ma miejsce tylko w korzeniach i jest indukowana w warunkach deficytu żelaza w środowisku [36]. Substratami białek OsYSL są kompleksy żelaza lub manganu z nikotynoaminą, a ich funkcja prawdopodobnie polega na regulacji transportu metali we floemie. Dowodzi tego wysoka ekspresja przynajmniej niektórych genów *OsYSL* w komórkach towarzyszących sitom [36].

W genomie *Arabidopsis thaliana* znaleziono 8 genów z rodziny YSL, które najprawdopodobniej kodują białka transportujące metale (Fe, Zn, Cu) w kompleksie z nikotynoaminą [32]. Jedynie dwa z nich, *AthYSL1* oraz *AthYSL2*, badano pod względem funkcjonalnym. I tak wykazano, że ekspresja *AthYSL1* zachodzi głównie w parenchymatycznych komórkach liści otaczających wiązki przewodzące oraz w młodych strąkach, co sugeruje udział białka zarówno w dalekim transporcie żelaza, jak i zaopatrywaniu nasion w ten pierwiastek. Obniżona akumulacja Fe w nasionach mutantów *ysl1* potwierdziła taką funkcję *AthYSL1* [37]. Dużo lepiej scharakteryzowano transporter *AthYSL2*. Deficyt żelaza w środowisku powodował znaczne zahamowanie syntezy *AtYSL2*, natomiast optymalny poziom żelaza stymulował ekspresję genu kodującego białko [38]. Dowiedziano także pozytywnego wpływu jonów miedzi na ekspresję *AthYSL2* [32]. Pokazano ponadto, że synteza białka zachodzi we wszystkich częściach rośliny [32]. Najwyższą ekspresję *AthYSL2* zanotowano w komórkach systemu waskularnego korzeni i liści, co sugeruje udział *AtYSL2* w dystrybucji metali w obrębie różnych organów [32].

Kilka białek należących do klasy YSL zidentyfikowano także w komórkach *Thlaspi cearulescens*. Roślina ta zaliczana jest do grupy tzw. hiperakumulatorów i charakteryzuje się podwyższoną tolerancją na metale ciężkie: może akumulować w swoich tkankach duże ilości cynku, kadmu i niklu [39]. Spośród genów zidentyfikowanych u *T. cearulescens* najlepiej poznano *TcYSL3*, *TcYSL5* oraz *TcYSL7*. Ekspresja genów typu YSL u *T. cearulescens* ma charakter ciągły (nie zależy od obecności metali w środowisku) [40]. Podobnie jak YSL *Arabidopsis*, białka *TcYSL3*, *TcYSL5* i *TcYSL7* pośredniczą w transporcie jonów metali w kompleksach z nikotynoaminą z apoplastu do cytoplazmy i zlokalizowane są w komórkach związanych z systemem waskularnym [40].

Stosunkowo wysoka ekspresja białek YSL u *Thlaspi* może warunkować tolerancję tej rośliny na stres metali ciężkich w środowisku [40].

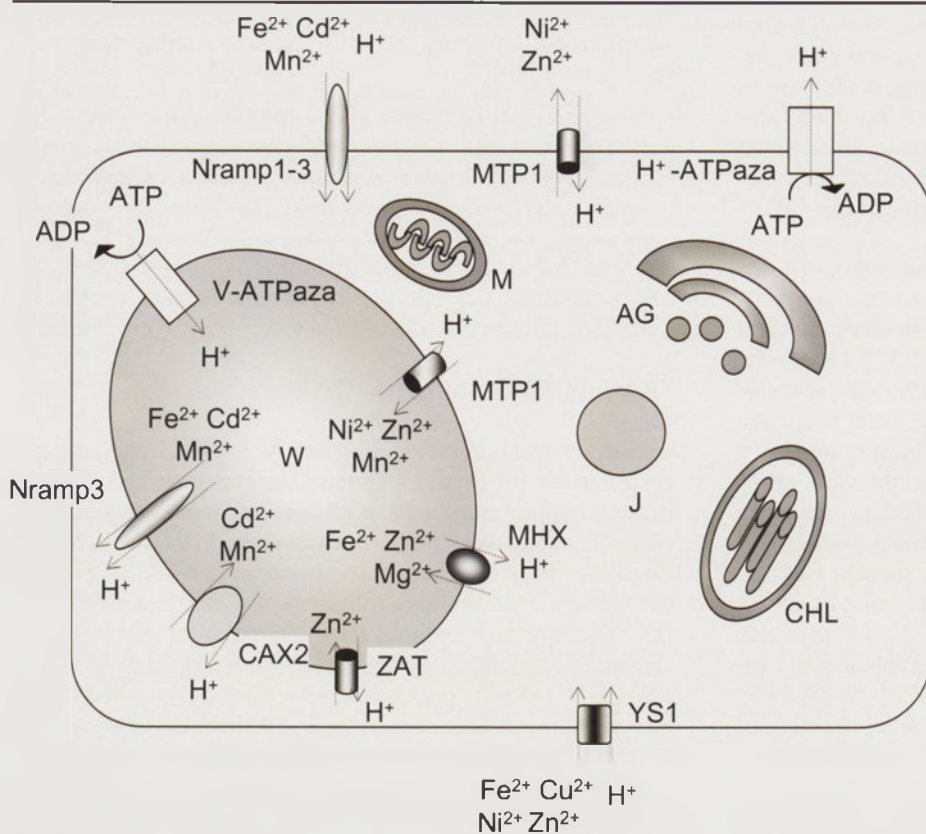
Charakterystyka białek YSL u różnych gatunków roślin wykazuje, iż mogą one być syntetyzowane w odpowiedzi na niedobór żelaza lub w warunkach dostatecznego dostępu tego pierwiastka w środowisku. Dodatkowo, ekspresja genów YSL zachodzi w różnych tkankach, zależnie od rodzaju białka oraz od gatunku rośliny. Wydaje się, że białka YSL pośredniczą w ogólnej dystrybucji żelaza, a także innych metali ciężkich, takich jak: cynk, mangan czy miedź.

TRANSPORTERY MAGNEZOWE

Najpowszechniej występującym w komórkach kationem dwuwartościowym jest magnez. Metal ten jest niezbędny do prawidłowego przebiegu wielu procesów metabolicznych, zwłaszcza w reakcjach enzymatycznych zużywających ATP. Reguluje aktywność enzymów (fosfatazy, ATPazy, polimerazy RNA), a także stabilizuje strukturę błon komórkowych [5]. W komórkach roślinnych jest kluczowym składnikiem cząsteczek chlorofilu. Transportery uczestniczące w pobieraniu i dystrybucji jonów magnezu zidentyfikowano u bakterii, drożdży, roślin i zwierząt [5,41,42]. Białka te występują w błonach plazmolemy, tonoplastu i mitochondrium [1,41]. W ostatnich latach wykazano, że transportery magnezowe uczestniczą także w transporcie innych metali, w tym metali ciężkich [5]. Shaul i wsp. [42] wykazali, że w komórkach *Arabidopsis* białko tonoplastu, *AtMHX*, na zasadzie antyportu przenosi do wakuoli nie tylko Mg^{2+} , ale także Zn^{2+} i Fe^{2+} . Dostatecznie szeroka specyficzność substratowa białka może wynikać z tego, że promienie jonowe transportowanych metali mają podobne rozmiary [43]. Ekspresja *AtMHX* zachodzi głównie w tkankach naczyniowych, tak więc transporter ten może odgrywać kluczową rolę w dystrybucji Mg^{2+} , Zn^{2+} i Fe^{2+} pomiędzy różne organy roślinne [43]. Również transporter magnezowy *AtMGT1*, który występuje w zewnętrznej błonie komórkowej, obok magnezu transportuje także jony Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} i Cu^{2+} przez plazmolemę. Jednakże w przypadku metali ciężkich aktywność transportowa białka była widoczna tylko przy bardzo dużych stężeniach tych metali, przekraczających stężenia fizjologiczne (0.1 mM-1 mM dla Cu i Co, >1 mM dla Fe i Mn, 1-10 mM dla Cd) [5]. Nie ma także dowodów wskazujących, że transport metali katalizowany przez *AtMGT1* ma charakter aktywny.

PODSUMOWANIE

Znaczny postęp badań nad transportem metali ciężkich w tkankach i komórkach roślinnych w przeciągu ostatnich 10 lat, a także sekwencjonowanie genomów roślinnych (*Arabidopsis thaliana* i *Oryza sativa*) przyczyniły się do poznania kilku rodzin genów, kodujących transportery metali ciężkich w organizmach roślinnych. Dzięki temu wiemy, że komórki roślin są wyposażone w liczne i różnorodne białka zaangażowane zarówno w pierwotny, jak i wtórny transport metali. Białka te pełnią kluczową funkcję w precyzyjnej kontroli stężenia metali w cytoplazmie, odpowiadając zarówno za dystrybucję niezbędnych metali do poszczególnych kompartmentów komórki, jak i za usuwanie nadmiaru metali do wakuoli lub apoplastu. O ile pierwotny, zależny od ATP, transport metali



Rycina 4. Rozmieszczenie transporterów wtórnych metali ciężkich w komórce roślinnej. Uproszczony schemat komórki roślinnej zawiera główne organelle komórkowe: wakuolę (W), jądro (J), aparat Golgiego (AG), mitochondrium (M) i chloroplast (CHL) otoczone zewnętrzną błoną komórkową. Dotychczasowe badania wykazały występowanie wtórnych transporterów metali w zewnętrznej błonie komórkowej: transportery typu Nram, CDF (MTP1) i YSL oraz w tonoplastcie: transportery typu Nram, Cax, CDF (MTP1 i ZAT) i magnezowe (MHX). Wydaje się, że białka typu CDF i CAX funkcjonują jako antyportery metal/H⁺ [25,26], natomiast białka typu Nram i transportery YSL działają na zasadzie symportu metal/H⁺ [1,2]. Źródłem energii dla tych transporterów jest gradient elektrochemiczny generowany przez pompy protonowe plazmolemy i tonoplastu (H⁺-ATPazę i V-ATPazę).

w komórkach roślinnych jest coraz lepiej udokumentowany, jak dotąd niewiele wiemy o potencjalnych kotransporterach typu metal/proton. Burzyński i wsp. [44], a także Migocka i Klobus [45], wykorzystując błony plazmolemy izolowane z korzeni ogórków, wykazali, że w zewnętrznej błonie komórkowej tych roślin występuje aktywny system transportowy wydzielający Cu, Cd, Pb, Mn i Ni z komórki na drodze antyportu metal/proton. Dowodów na występowanie podobnych aktywności w tonoplastcie dostarczyli wcześniej Gries i Wagner [46] oraz Gonzales i wsp. [47], wykazując, zależny od siły protonomotorycznej, transport Cd, Mn i Zn do wakuoli owa. Nie określono jak dotąd, które białka mogłyby odpowiadać za te aktywności, ale wykazano, że przedstawiciele niektórych rodzin transporterów metali funkcjonują jako transportery wtórne, zależne od gradientu elektrochemicznego wytwarzanego przez pompy protonowe plazmolemy i tonoplastu. Co więcej, wykazano plazmolemową i tonoplastową lokalizację potencjalnych wtórnych transporterów metali ciężkich w komórkach roślinnych (Ryc. 4).

Obecnie, badania nad poszczególnymi rodzinami transporterów metali u roślin koncentrują się na potwierdzeniu ich roli w przenoszeniu jonów metali, określeniu ich specyficzności substratowej, lokalizacji wewnątrzkomórkowej, a także wyjaśnieniu mechanizmu ich działania.

PIŚMIENNICTWO

- Hall JL, Williams LE (2003) Transition metal transporters in plants. *J Exp Biol* 54: 2601-2613
- Colangelo EP, Guerinot ML (2006) Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Curr Opin Plant Biol* 9: 322-330
- Theodoulou FL (2000) Plant ABC transporters. *Biochim Biophys Acta* 1465: 79-103
- Williams LE, Mills RF (2005) P1B-ATPases – an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends Plant Sci* 10: 491-502
- Li L, Tutone AF, Drummond RSM, Gardner RC, Luan S (2001) A novel family of magnesium transport genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 2761-2775
- Cai X, Lytton J (2004) The cation/Ca²⁺ exchanger superfamily: phylogenetic analysis and structural implications. *Mol Biol Evol* 21: 1692-1703
- Shigaki T, Hirschi KD (2006) Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H⁺ exchangers in plants. *Plant Biol* 8: 419-29
- Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis JM, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126: 1646-1667
- Kamiya T, Akahori T, Maeshima M (2005) Expression profile of the genes for rice cation/H⁺ exchanger family and functional analysis in yeast. *Plant Cell Physiol* 46: 1735-1740
- Pittman JK, Hirschi KD (2001) Regulation of CAX1, an *Arabidopsis* Ca²⁺/H⁺ antiporter: identification of an N-terminal autoinhibitory domain. *Plant Physiol* 127: 1020-1029
- Pittman JK, Shigaki T, Cheng NH, Hirschi KD (2002) Mechanism of N-terminal autoinhibition in the *Arabidopsis* Ca²⁺/H⁺ antiporter CAX1. *J Biol Chem* 277: 26452-26459
- Shigaki T, Sreevidya C, and Hirschi KD (2002) Analysis of the Ca²⁺ domain in *Arabidopsis* H⁺/Ca²⁺ antiporters. *Plant Mol Biol* 50: 475-483
- Shigaki T, Pittman JK, Hirschi K (2003) Manganese specificity determinants in the *Arabidopsis* metal/H⁺ antiporter Cax2. *J Biol Chem* 278: 6610-6617
- Kamiya T, Maeshima M (2004) Residues in internal repeats of the rice cation/H⁺ exchanger are involved in the transport and selection of cations. *J Biol Chem* 279: 812-819
- Shigaki T, Barkla BJ, Miranda-Vergara MC, Zhao J, Pantoja O, Hirschi KD (2005) Identification of a crucial histidine involved in metal transport activity in the *Arabidopsis* cation/H⁺ exchanger CAX1. *J Biol Chem* 280: 30136-30142
- Cheng N, Pittman JK, Shigaki T, Hirschi KD (2002) Characterization of CAX4, an *Arabidopsis* H⁺/Cation antiporter. *Plant Physiol* 128: 1-10
- Shigaki T, Pittman JK, Hirschi KD (2003) Manganese specificity determinants in the *Arabidopsis* metal/H⁺ antiporter CAX2. *J Biol Chem* 278: 6610-6617
- Hirschi KD, Korenkov VD, Wilganowski NL, Wagner GJ (2002) Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol* 124: 125-133
- Korenkov V, Park S, Cheng N-H, Sreevidya C, Lachmansingh J, Morris J, Hirschi K, Wagner GJ (2006) Enhanced Cd²⁺-selective root-tonoplast-

- transport in tobaccos expressing *Arabidopsis* cation exchangers. *Planta* 225: 403-411
20. Shigaki T, Hirschi KD (2000) Cloning and characterization of CAX-like genes in plants: implications for functional diversity. *Gene* 257: 291-298.
 21. Cheng N, Pittman JK, Zhu K, Hirschi KD (2004). The protein kinase SOS2 activates the *Arabidopsis* H⁺/Ca²⁺ antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance. *J Biol Chem* 279: 2922-2926
 22. McDiarmid CW, Milanick MA, Eide DJ (2002) Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277: 39187-39194
 23. Cheng NH, Pittman JK, Shigaki T, Lachmansingh J, LeClere S, Lahner B, Salt DE, Hirschi KD (2005) Functional association of *Arabidopsis* CAX1 and CAX3 is required for normal growth and ion homeostasis. *Plant Physiol* 138: 2048-2060
 24. Williams LE, Pittman JK, Hall JL (2000) Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim Biophys Acta* 1465: 104-126
 25. Vazquez-Ibar JL, Guan L, Weinglass AB, Verner G, Gordillo R, Kaback HR (2004) Sugar recognition by the lactose permease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 279: 49214-49221
 26. Delhaize E, Kataoka T, Hebb DM, White RG, Ryan RR (2003) Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *Plant Cell* 15: 1131-1142
 27. Kim D, Gustin JL, Lahner B, Persans MW, Baek D, Yun DJ, Salt E (2004) The plant CDF family member TgMTP1 from the Ni/Zn hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant J* 39: 237-251
 28. Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4991-4996
 29. Thomine S, Lelievre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygou H (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J* 34: 685-695
 30. Berezky Z, Wang HY, Schubert V, Ganai M, Bauer P (2003) Differential regulation of nramp and irt metal transporter genes in wild type and iron uptake mutants of tomato. *J Biol Chem* 278: 24697-24704
 31. Yen M-R, Tseng Y-H, Saier MH Jr (2001) Maize Yellow Stripe1, and iron-phytosiderophore uptake transporter, is a member of the oligopeptide transporter (OPT) family. *Microbiol* 147: 2881-2883
 32. DiDonato RJ Jr, Roberts LA, Sanderson T, Easley RB, Walker EL (2004) *Arabidopsis* YELLOW STRIPE-LIKE2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J* 39: 403-414
 33. Roberts LA, Pierson AJ, Panaviene Z, Walker EZ (2001) Yellow stripe1, expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter. *Plant Physiol* 135: 112-120
 34. Schaaf G, Ludewig U, Erenoglu BE, Mori S, Kitahara T, von Wiren N (2004) ZmYS1 functions as a proton coupled symporter for phyto siderophore- and nicotianamine-chelated metals. *J Biol Chem* 279: 9091-9096
 35. Curie C, Panaviene Z, Lourgue C, Dellaporta ST, Briat JF, Walker EL (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* 409: 346-349
 36. Koike S, Inoue H, Mizuno D, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2004) OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *Plant J* 39: 415-424
 37. Le Jean M, Schikora A, Mari S, Briat JF, Curie C (2005) A loss of function for the mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. *Plant J* 44: 769-782
 38. Schaar G, Schikora A, Haberie J, Vert G, Ludewig U, Briat JF, Curie C, von Wiren N (2005) A putative function for the *Arabidopsis* Fe-phyto siderophore transporter homolog AtYSL2 in Fe and Zn homeostasis. *Plant Cell Physiol* 46: 762-782
 39. Clemens S, Palmgren MG, Kramer U (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci* 7: 309-315
 40. Gendre D, Czernic P, Conejero G, Pianelli K, Briat J, Lebrun M, Mari S (2006) TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine Ni/Fe transporter. *Plant J* 49: 1-15
 41. Kolisek M, Zsurka G, Samaj J, Weghuber J, Schweyen RJ, Schweigel M (2003) Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria. *EMBO J* 22: 1235-1244
 42. Shaul O, Hilgemann DW, De-Almeida-Engler J, Van Montagu M, Inze D, Galili G (1999) Cloning and characterization of a novel Mg²⁺/H⁺ exchanger. *EMBO J* 18: 3973-3980
 43. Gardner RC (2003) Genes for magnesium transport. *Curr Opin Plant Biol* 6: 263-267
 44. Burzynski M, Migocka M, Klobus G (2005) Cu and Cd transport in cucumber (*Cucumis sativus* L.) root plasma membranes. *Plant Sci* 168: 1609-1614
 45. Migocka M, Klobus G (2007) The properties of the Mn, Ni and Pb transport operating at plasma membranes of cucumber roots. *Physiol Plant* 129: 578-587
 46. Gries GE, Wagner GJ (1998) Association of nickel versus transport of Cd and calcium in tonoplast vesicles of oat roots. *Planta* 204: 390-396
 47. Gonzales A, Korenkov VD, Wagner GJ (1999) A comparison of Zn, Mn, Cd and Ca transport mechanism in oat root tonoplast vesicles. *Physiol Plant* 106: 203-209

H⁺-coupled heavy metal transport in plants

Magdalena Migocka[✉], Ewa Nowojaska, Grażyna Kłobus

Institute of Plant Biology, Department of Plant Physiology, Wrocław University, 6/8 Kanonia St., 50-328 Wrocław, Poland

✉ e-mail: mmigocka@biol.uni.wroc.pl


Key words: metal transporters, detoxification, primary transport, H⁺-coupled transport

ABSTRACT

It has been recently well documented that metal transport systems play a crucial role in the uptake, distribution and detoxification of heavy metals throughout the plant [1,2]. A range of gene families that are likely to be involved in essential and non-essential metal transport has been now identified and their plasma membrane and/or tonoplast localization in plant cells has been recently confirmed [1,2]. These include the primary metal transporters, using ATP as the source of energy and H⁺-coupling transporters, utilizing the electrochemical gradient previously generated by plasma membrane and tonoplast proton pumps. As the presence of nucleotide binding domains in the protein sequence may indicate its ATP-hydrolytic activity, it is more difficult to determine the H⁺-coupling activity of protein on the base of its structure. Thus, the H⁺-coupling activity of protein may be only proved by functional analysis of the protein. In this work, we briefly review the structure, regulation and function of the metal transporters operating as H⁺/metal cotransporters.

Jolanta Jerzykiewicz 

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski

 Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski, ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław; tel.: (071) 375 41 09, e-mail: jerzykj@biol.uni.wroc.pl

Artykuł otrzymano 24 stycznia 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 2 kwietnia 2007 r.

Słowa kluczowe: alkaloidy, psiankowate, alkaloidy tropanowe, biosynteza, właściwości

Wykaz skrótów: H6H – hydroksylaza 6β-hioscyjaminowa; ODC – dekarboksylaza ornitynowa; PMT – metylotransferaza putrescynowa; TR I – reduktaza tropinonu I (EC.1.1.1.206); TR II – reduktaza tropinonu II (EC. 1.1.1.236)

STRESZCZENIE

Alkaloidy należą do metabolitów wtórnych produkowanych przez rośliny. Stanowią one bardzo niejednorodną grupę, gdyż wywodzą się z różnych substancji pierwotnych. Zainteresowanie właściwościami chemicznymi i możliwością wykorzystania alkaloidów przez człowieka datuje się od czasów starożytnych. Do dziś drogi biosyntezy wielu z nich pozostają niewyjaśnione. Każdy z przedstawicieli rodziny psiankowatych zawiera alkaloidy. Kolebką tych roślin są Ameryka Południowa i Ameryka Środkowa. Obecnie jest to jedna z grup roślin szeroko rozpowszechnionych na całym świecie i bardzo intensywnie wykorzystywanych przez człowieka. Z tego względu wydaje się interesujące zebranie wiadomości na temat alkaloidów, swoistych substancji roślin z rodziny psiankowatych.

WPROWADZENIE

Od czasów prehistorycznych do teraźniejszości alkaloidy, bądź wyciągi roślinne bogate w alkaloidy, były wykorzystywane jako środki o właściwościach farmakologicznych lub trucizny. Sokrates zmarł w roku 399 przed naszą erą po spożyciu napoju zawierającego koniinę. Żony niektórych cesarzy rzymskich, np. Klaudiusza, bez skrupułów używały wyciągów z roślin psiankowatych do usuwania „niewygodnych” obywateli Imperium. Również kobietom zawdzięczamy rozpowszechnienie naturalnej atropiny jako środka rozszerzającego źrenice. Jako pierwsza ten „kosmetyk”, pochodzący z *Hyoscyamus niger*, stosowała Kleopatra. W okresie Renesansu do tych samych celów kobiety używały wyciągów z *Atropa belladonna*. Stosowane przez Starożytnych środki farmakologiczne były najczęściej mieszaniną różnych alkaloidów. Najstarszym znanym środkiem farmakologicznym jest mieszanina alkaloidów zawarta w opium, soku mlecznym otrzymanywanym z niedojrzałych owocni (makówek) *Papaver somniferum*. Używanie opium w mieszaninie z winem, jako środka usypiającego i uśmierzającego ból, zostało odnotowane przez Sumerów na glinianych tabliczkach pochodzących z ok. 2500 r. przed naszą erą. Nazwę gatunkową *somniferum* mak zawdzięcza Linneuszowi, który nadał ją, sugerując się właściwościami usypiającymi ekstraktów z tej rośliny. Na półkuli zachodniej Aztekowie i inne kultury z tego regionu używali kaktusa „peyote” (*Lophophora williamsii*), zawierającego meskalinę, jako środka halucynogennego podczas obrzędów religijnych. Z tego regionu geograficznego pochodzi rodzina psiankowatych (*Solanaceae*). Gatunki należące do psiankowatych zawierają wysoki poziom toksycznych alkaloidów. Z drugiej strony, większość gatunków jest dobrze znana człowiekowi od czasów historycznych i wykorzystywana przez niego do celów gospodarczych, jako źródło środków farmakologicznych, używek, pokarmu i jako rośliny ozdobne.

Rodzina psiankowatych (*Solanaceae*) obejmuje rośliny występujące głównie w klimacie subtropikalnym i tropikalnym, nieliczne w klimacie umiarkowanym. Kolebką większości gatunków jest Ameryka Południowa. Wśród ok. 2500 gatunków spotykane są formy jednoroczne, dwuletnie, jak i wieloletnie. Najczęściej są to rośliny zielne, rzadziej krzewy, niskie drzewa lub pnącza. U większości przedstawicieli kwiaty są promieniste, obupłciowe o koronie zrosłopłatkowej, często tworzą kwiatostany typu wierzchołki. Pręciki często zrastają się nitkami, otaczając jeden górny, dwukrotny słupek. Dwukomorowa zalążnia przekształca się w owoc typu jagody lub torebki. Liście są pojedyncze, skrętoległe bez przylistków. Pędy i liście niektórych gatunków pokryte są włoskami gruczołowymi lub kolcami.

Liczne gatunki psiankowatych wykorzystywane były od stuleci po dzień dzisiejszy jako źródło pokarmu, przyprawy, lekarstwa, używki i trucizny. Rośliny znane i wykorzystywane już w starożytności to np.: tytoń, lulek czarny, ziemiak, mandragora czy *Withania somnifera*. Rośliny z rodziny *Solanaceae* często wytwarzają atrakcyjne, duże kwiaty o różnych kolorach i są wykorzystywane do celów ozdobnych. Przykładem może być rodzaj *Petunia*, obejmujący rośliny

roczne i wieloletnie, rosnące w stanie dzikim w Ameryce Południowej, a u nas uprawiane, głównie mieszańce międzygatunkowe. Inną grupę roślin ozdobnych tworzą krzewiaste i drzewiaste gatunki zaliczane dawniej do rodzaju *Datura*, a obecnie wydzielone w osobny rodzaj *Brugmansia*, np. *Brugmansia x insignis*, zwana anielskimi trąbkami ze względu na wyjątkowo duże i ozdobne kwiaty. Wiele gatunków psiankowatych spotykanych jest tylko w określonych regionach, gdzie, rosnąc dziko bądź w uprawie, dostarczają jadalnych owoców (*Cyphomandra*, *Lycopersicon*, *Capsicum*, *Solanum*), bulw (*Solanum*), środków odorujących (*Iochroma*, *Solandra*, *Brugmansia*) czy surowców leczniczych (*Scopolia lurida*, *Datura metel*, *D. innoxia*, *Withania somnifera*). Wybrane gatunki uprawiane są na dużą skalę, na całym świecie w celu pozyskania surowców pokarmowych, leczniczych i przemysłowych. Dzięki nowoczesnym technikom inżynierii genetycznej powstały nowe odmiany bardziej odporne na patogeny i inne szkodliwe czynniki środowiska. Uzyskano również rośliny transgeniczne o zwiększonych możliwościach syntezy określonych substancji chemicznych. W Polsce występuje kilkanaście gatunków psiankowatych, są to rośliny uprawne i dziko rosnące. Większość została krótko omówiona poniżej, ponadto spotykane są: lulecznica kraińska (*Scopolia carniolica*), miechunka rozdęta (*Physalis alkekengi*), kolcowój szkarłatny (*Lycium halimifolium*). Szczęśliwie w częściach jadalnych ziemniaków i pomidorów, dwóch najbardziej rozpowszechnionych obecnie i wykorzystywanych gospodarczo gatunków psiankowatych, zawartość substancji szkodliwych jest poniżej poziomu toksyczności dla człowieka. Obecnie wybrane gatunki psiankowatych uprawiane są na dużą skalę. Ich znaczenie gospodarcze, a także cechy gatunkowe sprawiają, że są częstym obiektem badań naukowych.

ALKALOIDY

Słowo alkaloid (od arabskiego *al-kali* – potaż i od greckiego *eidos* – postać) oznacza „przybiera postać zasady.” Nazwa ta obejmuje dużą grupę związków organicznych, głównie produktów metabolizmu wtórnego roślin, zawierających atom azotu w pierścieniach heterocyklicznych. Większość alkaloidów ma charakter zasadowy, chociaż istnieją alkaloidy wykazujące odczyn obojętny, np. kolchicina czy kapsaicyna.

Oprócz roślin wyższych, występowanie alkaloidów odnotowano u grzybów (np. *Claviceps purpurea*), paprotników (np. *Lycopodium*) i nagozalążkowych (np. *Taxus*, *Ephedra*). U zwierząt również występują związki zaliczane do alkaloidów. Najbardziej znane są alkaloidy płazów, np. samandryna u *Salamandra maculosa*, bufoteina u *Bufo bufo*, batrachotoksyna u *Phyllobates aurotenia*, histrionikotoksyna u *Dendrobates histrionicus*. Postuluje się jednak, że płazy nabywają te związki z zewnątrz wraz z pokarmem, zjadając na przykład owady. W świecie zwierząt alkaloidy mogą pełnić funkcję na przykład feromonów lub są składnikami trujących wydzielin gruczołów skórnych.

Biogenetycznie alkaloidy pochodzą z aminokwasów. Sporadycznie są to pochodne innych substancji (terpenów, puryn). W komórce mogą występować w stanie wolnym lub jako rozpuszczalne w wodzie sole. Po ekstrakcji są to

substancje stałe (z wyjątkiem nikotyny, która jest bezbarwną cieczą, łatwo ulegającą utlenieniu na powietrzu i wtedy jej barwa zmienia się na brunatną). Mają gorzki smak. Alkaloidy wykazują silne działanie fizjologiczne na organizm człowieka, od stymulującego, poprzez narkotyczne do toksycznego. Budziły zainteresowanie ludzi od czasów starożytnych, ale dopiero w roku 1806 udało się wyizolować pierwszy z nich. Była to morfina wydzielona z opium, której budowa została wyjaśniona dopiero w 1952 r. Rozwój metod analitycznych pozwolił na oszacowanie tej grupy związków na ok. 15000. Dużym utrudnieniem w uporządkowaniu wiedzy o alkaloidach jest niska zawartość w materiale roślinnym tych substancji oraz różnorodna i skomplikowana budowa chemiczna [1,2].

Alkaloidy, jako swoiste produkty metabolizmu wtórnego, spotykane są głównie u roślin dwuliściennych, bardzo rzadko u jednoliściennych czy iglastych. Nie znaleziono ich dotąd w rodzinach różowatych (*Rosaceae*), pierwiosnkowatych (*Primulaceae*), wrzosowatych (*Ericaceae*) i storczykowatych (*Orchidaceae*). Do najbogatszych w te związki należą między innymi: makowate (*Papaveraceae*), motylkowe (*Fabaceae*) oraz psiankowate (*Solanaceae*). U psiankowatych alkaloidy wykryto we wszystkich rodzajach należących do tej rodziny. Najczęściej w roślinie spotyka się mieszaninę kilku alkaloidów, której skład zależy w dużym stopniu od wieku rośliny i badanego organu [3]. Związki te występują w całej roślinie lub w określonych jej częściach, np.: w korze (cholina), w owocni (papaweryna), liściach (kokaina, nikotyna), podczas gdy inne jej części są wolne lub zawierają tylko śladowe ilości alkaloidów.

Podwyższony poziom alkaloidów jest charakterystyczny dla tkanek o wzmożonym metabolizmie, tj. merystemów pędu i korzenia, młodych liści. Biosynteza zachodzi w cytoplazmie, a jej intensywność zależy od stadium ontogenetycznego rośliny. Stwierdzono, że w miarę starzenia się rośliny maleje na ogół ilość alkaloidów w tkankach. Wytworzone związki mogą być odkładane w wakuoli w miejscu biosyntezy lub transportowane do innych tkanek i tam zużywane albo magazynowane w wakuolach. Podczas transportu lub w miejscu docelowym mogą ulegać wzajemnym przekształceniom [2,3]. Biosynteza alkaloidów, podobnie jak innych związków chemicznych produkowanych przez komórki, podlega kontroli genetycznej, a cały proces jest modyfikowany zarówno przez czynniki wewnętrzne, jak i zewnętrzne. Do czynników wewnętrznych należy poziom i wzajemne relacje fitohormonów w komórce [4-6]. Fitohormonem regulującym biosyntezę wielu metabolitów wtórnych u roślin wyższych jest kwas jasmonowy i jego metylowa pochodna. Jasmoniany mogą działać na dwóch różnych poziomach. Z jednej strony mogą aktywować geny odpowiedzialne za produkcję określonego białka enzymatycznego, z drugiej strony działać bezpośrednio na dany enzym, modulując jego aktywność [7]. Wykorzystując do badań hodowle tkankowe komórek korzeni niektórych gatunków roślin psiankowatych (*Hyoscyamus muticus*, *Hyoscyamus niger*, *Datura stramonium*, linia BY-2 komórek tytoniu), zaobserwowano wzrost aktywności enzymów szlaku biosyntezy alkaloidów tropanowych. Wrażliwe na działanie jasmonianów były tylko komórki korzeni i tam obserwowano akumulację skopolaminy i hioscyjminy. W komórkach

kalusa nie obserwowano tego typu efektów, co dodatkowo wskazywało na korzeń jako główne miejsce biosyntezy alkaloidów [8-10].

Także parametry środowiska zewnętrznego, takie jak np. temperatura, nasłonecznienie czy wilgotność, mają wpływ na ilość i jakość alkaloidów w roślinie. Szczególnie wpływ środowiska zewnętrznego jest widoczny u roślin z rodziny psiankowatych, pochodzących z klimatu subtropikalnego. Aklimatyzacja tych roślin do klimatu umiarkowanego często prowadziła do spadku lub wręcz braku syntezy alkaloidów.

Klasyfikacja alkaloidów zawsze sprawiała pewne kłopoty. Zanim dokładnie poznano ich budowę chemiczną, głównym kryterium podziału na grupy było biologiczne źródło pozyskiwania tych substancji. I tak mówiono o alkaloidach maku, szaleju, itp. Obecna klasyfikacja opiera się głównie na budowie chemicznej tych związków. Wyróżnia się trzy typy alkaloidów: 1) alkaloidy właściwe (zawierają azot w pierścieniu heterocyklicznym); 2) protoalkaloidy (zawierają azot w łańcuchu bocznym, poza pierścieniem heterocyklicznym). Oba typy to pochodne aminokwasów; 3) pseudoalkaloidy (zawierają azot w pierścieniu heterocyklicznym), nie są pochodnymi aminokwasów.

Bardziej szczegółowy podział bierze pod uwagę także drogę biosyntezy i prekursorzy danej grupy alkaloidów w komórce. Mamy więc: alkaloidy pirolidynowe, alkaloidy pochodne pirydyny i piperydyny, alkaloidy pochodne tropanu, alkaloidy pochodne indolu, alkaloidy pochodne steroidowe, alkaloidy pochodne puryny, alkaloidy pochodne chinolinowe, alkaloidy pochodne chinolizydyny oraz alkaloidy pochodne izochinolinylu.

Jeżeli za główne kryterium podziału przyjmujemy aminokwas, z którego pochodzi grupa alkaloidów, otrzymujemy podział na alkaloidy pochodne przykładowo: ornityny (alkaloidy tropanowe), tyrozyny (alkaloidy izochinolinowe), tryptofanu (alkaloidy indolowe), lizyny (alkaloidy piperydynowe lub chinolizydynowe). U psiankowatych występują głównie alkaloidy tropanowe (hioscyjamina, skopolamina, atropina), alkaloidy zawierające pirol (nikotyna, nornikotyna), pochodne pirydyny i piperydyny (anabazyna), glikoalkaloidy sterydowe (α -solanina, α -czakonina) oraz fenyloalkiloaminy (kapsaicyna), należące do protoalkaloidów [1,6]

BIOSYNTENZA ALKALOIDÓW

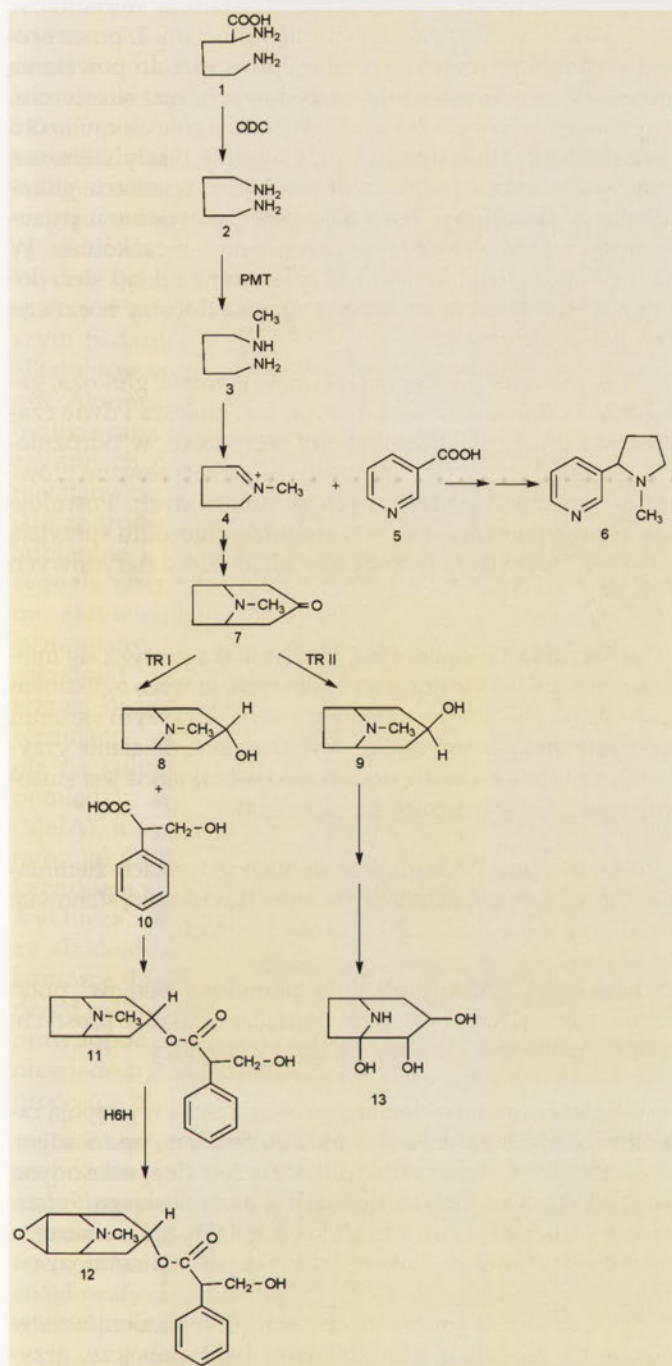
BIOSYNTENZA ALKALOIDÓW TROPANOWYCH

Głównym miejscem biosyntezy alkaloidów tropanowych jest system korzeniowy rośliny. Prekursorem jest ornityna, aminokwas niebiałkowy o charakterze zasadowym. Procesem zapoczątkowującym biosyntezę jest dekarboksylacja ornityny prowadzona przez enzym dekarboksylazę ornitynową (ODC). Produktem jest poliamina putrescyna. Ten etap biosyntezy jest wspólny dla syntezy alkaloidów tropanowych, nikotyny i jej pochodnych oraz poliamin. Pierwszym enzymem specyficznym dla szlaku syntezy alkaloidów jest N-metylotransferaza putrescynowa (PMT). Przeprowadza ona reakcję metylacji azotu, co prowadzi do powstania N-metyloputrescyny. Grupa metylowa pochodzi

z S-adenozylometioniny. Zmetylowana forma putrescyny ulega oksydacyjnej dezaminacji, dalej spontanicznej cyklizacji, której efektem końcowym jest N-metylo- Δ' -pirolina, produkt pośredni w syntezie alkaloidów tropanowych i pirolidynowych. Kondensacja N-metylo- Δ' -piroliny z dwoma cząsteczkami acetylo-S-CoA daje tropinon. W tym miejscu szlak biosyntezy ulega rozgałęzieniu. Tropinon może być substratem dwóch stereospecyficznych oksydoreduktaz: reduktazy tropinonowej TR I (EC 1.1.1.206) lub reduktazy tropinonowej TR II (EC 1.1.1.236). Oba enzymy to niewielkie białka, których sekwencja aminokwasowa jest w 50% identyczna, co przemawia za wspólnym pochodzeniem tych cząsteczek. Kofaktorem TR I jak i TR II jest NADPH. Aktywność katalityczna TR I prowadzi do powstania tropiny i dalej, poprzez estryfikację kwasem tropowym (pochodnym fenyloalaniny), do powstania hioscyjminy. W roślinach powstaje optycznie czynny stereoizomer L-hioscyjamina, główny alkaloid wielu przedstawicieli psiankowatych. Atropina to mieszanina racemiczna izomerów hioscyjminy, optycznie nieczynna. Hydroksylacja hioscyjminy i utworzenie mostka epoksydowego prowadzi do powstania skopolaminy (hioscyny). Jest to wynik katalitycznej działalności hioscyjmino-6 β -hydroksylazy (H6H). Druga reduktaza TR II prowadzi reakcję powstawania pseudotropiny, a z niej polihydroksynortropowego alkaloidu kalisteginy. Kalistegina nie jest estrem i nie zawiera grupy metylowej.

Wszystkie enzymy zaangażowane w biosyntezę alkaloidów tropanowych zostały zlokalizowane w części apikalnej korzeni wielu gatunków psiankowatych. Dokładna lokalizacja tych cząsteczek oraz ich charakterystyka stała się możliwa dzięki technikom kultur tkankowych, badaniom immunologicznym, histochemicznym i genetycznym. Wiadomo, że w perycyklu aktywne są dwa z wyżej opisanych enzymów: N-metylotransferaza putrescynowa (PMT) i hydroksylaza 6 β -hioscyjaminowa (H6H). Sprzyja to pozyskaniu substratów (ornityny, putrescyny) dla ODC i PMT z floemu oraz usuwaniu produktu H6H skopolaminy do ksylemu. Aktywność reduktazy TR I zaobserwowano w endodermie i korze pierwotnej, zaś reduktazy TR II zarówno w endodermie, korze pierwotnej, jak i w perycyklu. Taka lokalizacja podstawowych enzymów biosyntezy wymaga transportu produktów pośrednich pomiędzy poszczególnymi tkankami korzenia. Tak więc produkt katalizy PMT musi być przetransportowany z perycyklu do endodermy, a po reakcji z TR I z powrotem do perycyklu, gdzie czeka na niego hydroksylaza H6H. Ukierunkowanie procesu biosyntezy zależy w dużym stopniu od dostępności wspólnego dla obu reduktaz (TR I i TR II) substratu tropinonu, a czynnikiem limitującym jest obecność kwasu tropowego. Badania na kulturach tkankowych wykazały regulującą rolę jasmonianów i auksyn w procesie syntezy alkaloidów.

Typowe alkaloidy tropanowe są estrami tropiny z kwasami alifatycznymi bądź aromatycznymi, np. apoatropina jest estrem tropiny i kwasu apoatropowego i powstaje podczas alkalicznej racemizacji hioscyjminy. Belladonna to ester 2 cząsteczek tropiny i kwasu izotropowego. Z kolei kondensacja N-metylo- Δ' -piroliny z kwasem octowym lub acetylo-CoA daje początek alkaloidom z grupy kuskohigryny, które towarzyszą alkaloidom tropanowym w wielu rodzajach roślin [2,10-20].



Rycina 1. Biosynteza alkaloidów tropanowych i nikotyny u psiankowatych. 1. ornityna, 2. putrescyna, 3. N-metyloputrescyna, 4. N-metylo- Δ^1 -pirolina, 5. kwas nikotynowy, 6. nikotyna, 7. tropinon, 8. tropina, 9. pseudotropina (ψ tropina), 10. kwas tropowy, 11. hioscyjamina, 12. skopolamina, 13. kalistegina. Enzymy: ODC – dekarboksylaza ornitynowa, PMT – metylotransferaza putrescynowa, TR I i TR II – reduktazy tropinonu, H6H – hydroksylaza hioscyjaminowa.

Hioscyjamina. Aktywny chemicznie jest lewoskrętny izomer hioscyjminy. Hioscyjamina, tak jak pozostałe alkaloidy tropanowe, działa poprzez blokowanie receptorów cholinoergicznych, konkurując z acetylocholiną o miejsca wiązania, tym samym hamuje przekazywanie sygnałów przez neurony. Przy niewielkich stężeniach ta właściwość może być wykorzystana jako ochrona komórek przed pestycydami, a nawet gazami bojowymi, takimi jak sarin.

Atropina. Racemiczna, optycznie nieczynna forma hioscyjminy, stanowi mieszaninę izomerów D i L. Wykazuje stymulujące działanie na ośrodkowy układ nerwowy i na akcję serca, nieznacznie podwyższa ciśnienie krwi. Działając na układ przywspółczulny zmniejsza napięcie mięśni gładkich, rozszerza źrenicę oka i oskrzeliki, hamuje wydzielanie śluzu.

Skopolamina. Ma wpływ na układ przywspółczulny, ale w odróżnieniu od atropiny działa uspokajająco i depresyjnie na układ nerwowy i silniej hamuje wydzielanie śliny. Podobnie jak atropina, rozszerza źrenicę oka. Wywołuje rozkurcz mięśni.

ALKALOIDY POCHODNE PIRYDYNY I PIPERYDYNY

Ornityna jest związkami wyjściowymi także do syntezy głównych alkaloidów tytoniu – nikotyny i nornikotyny. Drugim składnikiem potrzebnym do utworzenia cząsteczki nikotyny jest pierścień pirydyny pochodzący od kwasu nikotynowego. Kondensacja N-metylo- Δ^1 -piroliny z pirydyną zachodzi w komórkach korzeni rośliny i wymaga dekarboksylacji kwasu nikotynowego oraz metylacji pierścienia pirolidynowego. Nornikotyna powstaje w wyniku demetylacji nikotyny. W roślinach tytoniu spotyka się również alkaloid piperydynowy – anabazynę. Prekursorem pierścienia piperydynowego jest aminokwas lizyna, związkami pośrednimi zaś – kadaweryna i Δ^1 -piperydeina. Anabazyna powstaje przez kondensację pierścienia pirydynowego (z kwasu nikotynowego) i piperydynowego [2,4,21].

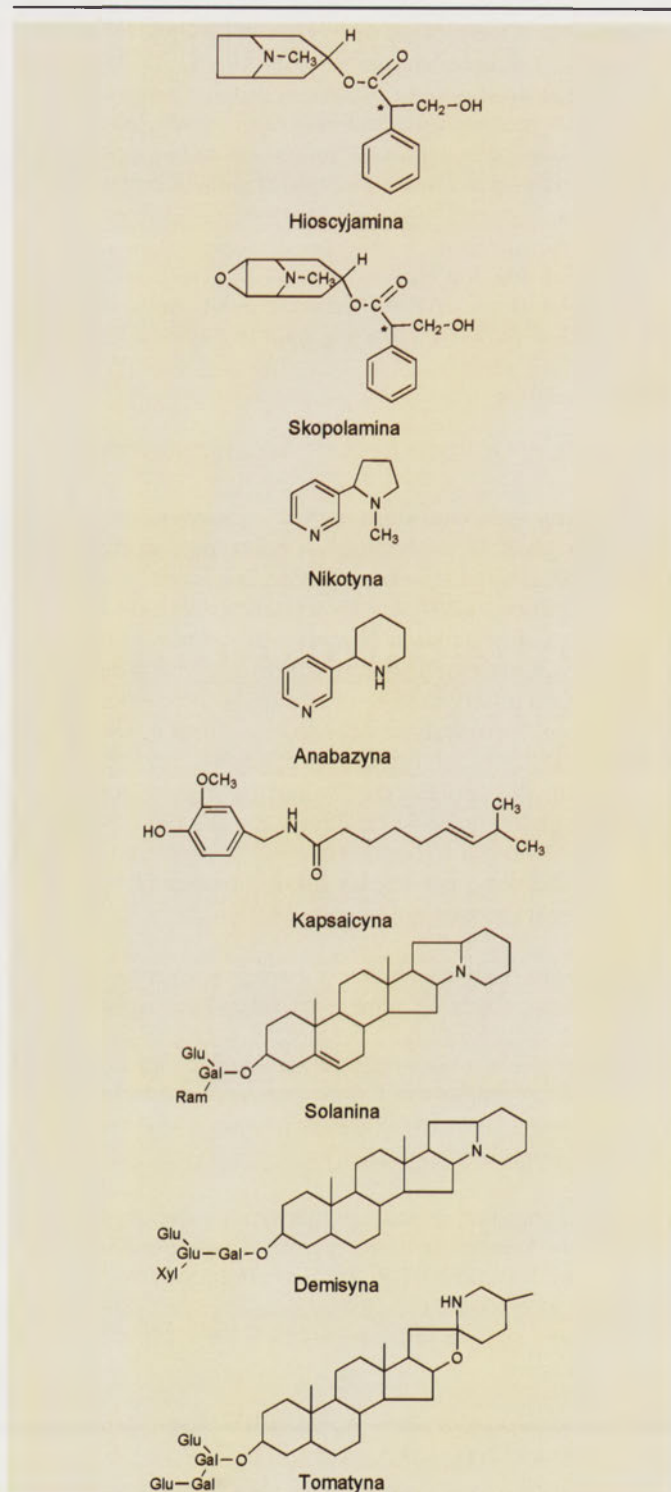
Nikotyna. Najbardziej znany i rozpowszechniony alkaloid psiankowatych. W niewielkich dawkach działa pobudzająco na receptory cholinoergiczne, przyspiesza wydzielanie adrenaliny, a także powoduje zwiększoną aktywność wydzielniczą gruczołów i przyspieszenie oddechu. Może być stosowana jako środek owadobójczy. Nie jest używana w farmakologii lecz jako używka.

Anabazyna. Jest izomerem nikotyny. Jeden z głównych alkaloidów *Anabasis aphylla* i tytoniu sinego (*Nicotiana glauca*), w innych gatunkach tytoniu występuje w niewielkich ilościach. Aktywność owadobójcza anabazyny jest większa niż nikotyny i przez pewien czas była stosowana do zwalczania owadów.

FENYLOALKILOAMINY – ALKALOIDY POCHODNE FENYLOALANINY I TYROZYNY

Hydroksylacja aromatycznego pierścienia aminokwasu tyrozyny prowadzi do powstania dihydroksyfenyloalaniny (DOPA). Z kolei dekarboksylacja DOPA daje DOPA-aminę, prekursor między innymi: alkaloidów izochinolinowych, benzochinolinowych i wielu protoalkaloidów. Interesującym nas protoalkaloidem jest kapsaicyna występująca w częściach nadziemnych roślin z rodzaju *Capsicum* (papryka). Związek ten zawiera pierścień aromatyczny pochodzący z DOPA-aminy i długi łańcuch alifatyczny zawierający atom azotu.

Kapsaicyna. Nie jest toksyczna dla zwierząt, nie mniej jednak u ssaków pobudza specyficznie receptory bólu, dając



Rycina 2. Wybrane wzory alkaloidów roślin z rodziny psiankowatych.

uczucie pieczenia, drażni błony śluzowe i powoduje przekrwienie skóry. Pobudza wydzielanie soków trawiennych i kwasu solnego w żołądku. Ma charakter hydrofobowy. Nie działa na ptaki, które, zjadając owoce różnych gatunków papryki wraz z nasionami bogatymi w kapsaicynę, przyczyniają się do rozprzestrzeniania tych roślin.

GLIKOALKALOIDY STERYDOWE

Pod względem chemicznym glikoalkaloidy sterydowe są glikozydowymi pochodnymi steroidów, zawiera-

jących atom azotu w cząsteczce. Biosynteza sterydów w komórkach roślinnych zaczyna się od octanu i, przez szereg skomplikowanych przemian, prowadzi do powstania pierścieniowych związków sterydowych, np.: sitosterolu, stigmasterolu czy cholesterolu. Wbudowanie atomu azotu do cząsteczki cholesterolu i przyłączenie reszty cukrowej poprzez wiązanie β -glikozydowe daje w rezultacie glikoalkaloidy sterydowe. Dwa najczęściej spotykane u psiankowatych glikoalkaloidy to α -solanina i α -czakonina. W obu związkach aglikonem jest solanidyna (układ sterydowy z wbudowanym azotem), a różnica dotyczy bocznego łańcucha cukrowego.

W α -solaninie występują trzy cukry proste: glukoza, galaktoza i ramnoza; w α -czakoninie zaś glukoza i dwie cząsteczki ramnozy. Glikoalkaloidy sterydowe, w odróżnieniu od alkaloidów tropanowych, są syntetyzowane głównie w częściach nadziemnych psiankowatych. Postuluje się, że warunki sprzyjające biosyntezie chlorofilu sprzyjają również biosyntezie glikozydów alkaloidów sterydowych [21-24].

α -Solanina i α -czakonina. U ziemniaka spotyka się mieszaninę 8 glikoalkalooidów sterydowych, których aglikonem jest solanidyna. Dwa występujące w największym stężeniu to α -solanina i α -czakonina. Wykazują one działanie grzybobójcze i owadobójcze, dodatkowo α -czakonina jest stosowana jako środek przeciwko nicieniom.

α -Demisyjna. Występuje w dzikich gatunkach ziemniaka. Aglikonem jest demisydyna, a resztę cukrową stanowią: galaktoza, dwie cząsteczki glukozy i ksyloza.

Tomatyna. Główny alkaloid pomidora. Stanowi połączenie tomatydy i czterech cząsteczek cukrów prostych: dwóch cząsteczek glukozy, galaktozy i ksylozy.

α -Solasonina i α -solamargina. Najczęściej występują razem w różnych gatunkach z rodzaju *Solanum*, np.: *S. nigra*, *S. melongena*, *S. dulcamara*. Aglikonem jest tutaj solasodyna otrzymywana w dużych ilościach z australijskiego *S. laciniatum*. Solasonina zawiera glukozę, galaktozę i ramnozę, a solamargina zawiera glukozę i dwie cząsteczki ramnozy.

Wszystkie z wymienionych tutaj glikoalkalooidów sterydowych wykazują silne działanie bakteriobójcze, grzybobójcze, antywirusowe i owadobójcze. Wykazują właściwości hemolityczne, są inhibitorami esterazy cholinowej i mogą wywoływać apatię, drgawki, a nawet paraliż. Glikoalkaloidy zawierające solasodynę są stosowane jako leki sterydowe, na przykład przy rakowych naroślach skórnych [1,25,26].

PODSUMOWANIE

Alkaloidy są produktami specyficznej przemiany materii wielu roślin. Przez pewien czas były traktowane jako swoiste „odpady”; uważano, że roślina w ten sposób pozbywa się nadmiaru azotu z komórki. Dziś te poglądy są ostro krytykowane, bo czyż opłaca się roślinie zużyć energię, aby w skomplikowanym cyklu biosyntezy otrzymać jako produkt cząsteczkę alkaloidu zawierającą

jeden atom azotu? Zastanawiające jest również zjawisko wytwarzania alkaloidów identycznych lub o bardzo zbliżonej budowie chemicznej przez rośliny o różnej przynależności systematycznej (alkaloidy tropanowe *Solanaceae* i *Erythroxylon coca*), często rosnące w odmiennych warunkach środowiska i klimatu. Z drugiej strony, spotyka się w jednej roślinie alkaloidy należące do dwóch różnych pod względem budowy chemicznej grup, na przykład w maku są alkaloidy pochodne indolu i pochodne izochinoliny. Wydaje się, że alkaloidy są syntetyzowane celowo przez roślinę w wiadomym jej celu [1-3,27]. Dzięki dokładniejszym badaniom zaobserwowano zwiększoną produkcję alkaloidów w roślinach poddanych stresowi zewnętrznemu. Akumulacja tych substancji w tkankach rośliny była indukowana najczęściej przez atak szkodników, grzybów czy innych patogenów, ale także promieniowaniem UV, metalami ciężkimi czy szokiem osmotycznym. Napływające ze środowiska sygnały o zagrożeniu są przez roślinę odbierane i przekazywane dalej do komórki w postaci sygnału chemicznego. Takimi cząsteczkami sygnałowymi, aktywującymi produkcję metabolitów wtórnych, są jasmoniany. Zaobserwowano, że zaatakowanie przez szkodniki części nadziemnych tytoniu powodowało wzrost stężenia jasmonianów w komórkach, a następnie wzmożoną syntezę nikotyny w korzeniach rośliny. Badania na kulturach tkankowych potwierdziły powiązania pomiędzy zewnętrznym podaniem metylojasmonianu (MeJA), a syntezą nikotyny i aktywnością takich enzymów, jak ODC i PMT. Jasmonian okazał się szybkim przekaźnikiem sygnałów pomiędzy pędem a korzeniem. Nie wyklucza się również zaangażowania w indukcję syntez alkaloidów innych dróg przekazywania sygnałów w komórce (białka zależne od GTP, jony wapnia). Ochrona przed roślinożercami i patogenami to bardzo ważna, lecz prawdopodobnie nie jedyna funkcja alkaloidów. Wiele niewiadomych kryje nie tylko celowość, ale i regulacja procesów biosyntezy alkaloidów.

Psiankowate to zróżnicowana i ważna pod względem gospodarczym rodzina, której przedstawiciele byli od dawna wykorzystywani przez człowieka. Należące tu gatunki stanowią element pożywienia ludzi, są źródłem surowców wielu gałęzi przemysłu, a także źródłem używek. Zawsze znajdowały się w centrum uwagi człowieka, ale nadal kryją wiele tajemnic [28-34].

PIŚMIENNICTWO

- Kafarski P, Lejczak B (1994) Chemia bioorganiczna, PWN, Warszawa
- Facchini PJ (2001) Alkaloid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 29-66
- Iranbakhsh A, Oshaghi M, Majd A (2006) Distribution of atropine and scopolamine in different organs and stages of development in *Datura stramonium* L. (*Solanaceae*) Structure and ultrastructure of biosynthesizing cells. *Acta Biol Cracov* 48: 13-18
- Sato F, Hashimoto T, Hachiya A, Tamura K, Choi K, Morishige T, Fujimoto H, Yamada (2001) Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 367-372
- Shoji T, Yamada Y, Hashimoto T (2000) Jasmonate induction of putrescine N-methyltransferase genes in the root of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Physiol* 41: 831-839
- Shoji T, Nakajima K, Hashimoto T (2000) Ethylene suppressed jasmonate-induced gene expression in nicotine biosynthesis. *Plant Cell Physiol* 41: 1072-1076
- Goossens A, Hakkinen S, Laakso I, Biondi S, Lammertyn F, Nuutila A, Soderlund H, Zabeau M, Inze D, Oksman-Caldentey K (2003) A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8595-8600
- Biondi S, Scaramagli S, Oksman-Caldentey K, Poli F (2002) Secondary metabolism in root and callus cultures of *Hyoscyamus muticus* L. the relationship between morphological organization and response to methyl jasmonate. *Plant Sci* 163: 563-569
- Zabetakis J, Edwards R, O'Hagah D (1999) Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry* 50: 53-56
- Griffin WJ, Lin GD (2000) Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry* 53: 623-637
- Nakajima K, Hashimoto T (1999) Two tropinone reductases that catalyze opposite stereospecific reduction in tropane alkaloid biosynthesis are localized in plant root with different cell-specific patterns. *Plant and Cell Physiol* 40: 1099-1107
- Richter U, Rothe G, Fabian A, Rahfeld B, Drager B (2005) Overexpression of tropinone reductases alters alkaloid composition in *Atropa belladonna* root cultures. *J Exp Bot* 56: 645-652
- Portsteffen A, Draeger B, Nahrstedt A (1994) The reduction of tropinone in *Datura stramonium* root cultures by two specific reductases. *Phytochemistry* 37: 391-400
- Moyano E, Jouhikainen K, Tammela P, Palazon J, Cusido RM, Pinol MT, Teeri TH, Oksman-Caldentey KM (2003) Effect of pmt gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. *J Exp Bot* 54: 203-211
- Suzuki K, Yamada Y, Hashimoto T (1999) Expression of *Atropa belladonna* putrescine N-methyltransferase gene in root pericycle. *Plant Cell Physiol* 40: 289-297
- Suzuki K, Yun DJ, Chen XY, Yamada Y, Hashimoto T (1999) An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6 β -hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers. *Plant Mol Biol* 40: 141-152
- Rothe G, Hachiya A, Yamada Y, Hashimoto T, Drager B (2003) Alkaloids in plants and root cultures of *Atropa belladonna* overexpressing putrescine N-methyltransferase. *J Exp Bot* 54: 2065-2070
- Zhang L, Ding R, Chai Y, Bonfill M, Moyano E, Oksman-Caldentey KM, Xu T, Pi Y, Wang Z, Zhang H, Kai G, Liao Z, Sun X, Tang K (2004) Engineering tropane biosynthesis pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6786-6791
- Drager B (2006) Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry* 67: 327-337
- Kaiser H, Richter U, Keiner R, Brabant A, Hause B, Drager B (2006) Immunolocalisation of two tropinone reductases in potato (*Solanum tuberosum* L.) root, stolon, and tuber sprouts. *Planta* 225: 127-137
- Bartholomeusz TA, Bhogal RK, Molinier R, Felpin FX, Mathe-Allainmat M, Meier AC, Drager B, Lebreton J, Roscher A, Robins RJ, Mesnard F (2005) Nicotine demethylation in *Nicotiana glauca* cell suspension cultures: N'-formylornicotine is not involved. *Phytochemistry* 66: 2432-2440
- De Luca V, St-Pierre B (2000) The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends Plant Sci* 4: 168-173
- Zimowski J (1998) Glikoalkaloidy sterydowe rodziny *Solanaceae*. *Postępy Biochem* 44: 254-261
- Eltayeb EA, Al-Ansari AS, Roddick JG (1997) Changes in the steroidal alkaloid solasodine during development of *Solanum nigrum* and *Solanum incanum*. *Phytochemistry* 46: 489-494
- Roddick JG, Weissenberg M, Leonard AI (2001) Membrane disruption and enzyme inhibition by naturally-occurring and modified chactriose-containing *Solanum* steroidal glycoalkaloids. *Phytochemistry* 56: 603-610
- Kączkowski J (1985) *Biochemia roślin. Tom 2. Metabolizm wtórny*. PWN, Warszawa
- Harborne JB (1997) *Ekologia biochemiczna*. PWN, Warszawa
- Palczyński A, Podbielkowski Z, Polakowski B (1995) *Botanika*. PWN, Warszawa
- Lewkowicz-Mosiej T (2003) *Leksykon roślin leczniczych. Świat książki*. Warszawa

30. Kohlmuncer S (1998) Farmakognozja. PZWL. Warszawa
31. Mueller MJ, Brodschelm W, Spannagl E, Zenk MH (1993) Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. Proc Natl Acad Sci USA 90: 7490-7494
32. Baldwin IT (1998) Jasmonate induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. Proc Natl Acad Sci USA 95: 8113-8118
33. Sachan N, Falcone DL (2002) Wound-induced gene expression of putrescine N-methyl-transferase in leaves of *Nicotiana tabacum*. Phytochemistry 61: 797-805
34. Pichersky E, Gang DR (2000) Genetics and biochemistry of secondary metabolites in planta. An evolutionary perspective. Trends Plant Sci 5: 439-445

Alkaloids of *Solanaceae* (nightshade plants)

Jolanta Jerzykiewicz 

Plant Physiology Department, Institute of Plant Biology, Wrocław University, 6/8 Kanonia St., 50-328 Wrocław, Poland

✉ e-mail: jerzykj@biol.uni.wroc.pl

Key words alkaloids, *Solanaceae*, tropane alkaloids, biosynthesis

ABSTRACT

Alkaloids are nitrogen containing compounds found in many plants. They are products of plants secondary metabolism derived from amino acids, purines, pyrimidines or terpene. Most of them are drugs. The biological activity of some alkaloids has led to their intensive exploitation by humans, as pharmaceuticals, narcotics or poisons. During the past 30 years, major technical advances have led to substantial progress in our understanding of alkaloid biochemistry, but since then biosynthetic pathways of some alkaloids are not explained. The nightshade (*Solanaceae*) are widespread family of plants containing tropane alkaloids or glycoalkaloids. Both of them are naturally produced, as a defense mechanism against insects, predator and disease. On the other hand, most of the species of *Solanaceae* family have been used by human since several centuries.

5-*n*-alkilorezorcynole ziaren zbóż i pełnoziarnistych produktów spożywczych jako biomarkery zdrowej żywności

STRESZCZENIE

Badania epidemiologiczne potwierdzają, że konsumpcja całych ziaren zbóż i pełnoziarnistych produktów spożywczych wiąże się z obniżeniem ryzyka zachorowania na cukrzycę, otyłość, chorobę wieńcową serca, udar, a nawet niektóre typy nowotworów. Dokładne poznanie mechanizmów działania ochronnych składników zawartych w ziarnach zbóż wymaga obecności biomarkera (biologicznego markera, wskaźnika), który umożliwiłby śledzenie losów pełnowartościowych produktów zbożowych już po ich spożyciu i wchłonięciu. 5-*n*-alkilorezorcynole (główna frakcja związków fenolowych w ziarnach zbóż), ze względu na występowanie jedynie we frakcji otrębowej, uzyskiwanej w procesach przemiału ziaren zbóż, wydają się być doskonałym kandydatem do pełnienia tej funkcji. Są wchłaniane i metabolizowane w organizmach zwierzęcych i człowieka; mogą być oznaczane w postaci natywnej w osoczu i jako metabolity w moczu. Ponieważ skład nasyconych homologów 5-*n*-alkilorezorcynoli różni się w ziarnach pszenicy i żyta, można je również zastosować do oznaczenia różnic pomiędzy wchłanianiem pełnoziarnistych produktów pszenicznych i żytnich.

WPROWADZENIE

Szybkie tempo życia, tak charakterystyczne dla współczesnego świata, prowadzi do wielu zaniedbań, które pozornie wydają się nieszkodliwe, ale mogą okazać się fatalne w skutkach. Czynniki, takie jak: nieprawidłowa dieta, nieregularne posiłki i jedzenie w pośpiechu, przyczyniają się do wzrostu zachorowań na niektóre choroby nękające współczesny świat. Dlatego niezwykle istotnym wydaje się być fakt, uwidoczniiony przez badania epidemiologiczne, potwierdzający nieoceniony wpływ diety opartej na całych ziarnach zbóż i produktach pełnoziarnistych na ochronę zdrowia [1-11]. Zalecane spożywanie co najmniej pięciu posiłków dziennie składających się z warzyw, owoców i ziaren zbóż, związane bezpośrednio ze zmniejszaniem ryzyka zachorowań na choroby serca [3-5], niektóre typy nowotworów [6,7], cukrzycę oraz zmniejszeniem prawdopodobieństwa rozwoju nadwagi i otyłości [8,9]. Określenie związku pomiędzy spożywaniem produktów pełnoziarnistych a poprawą ogólnej kondycji wydaje się możliwe dzięki zastosowaniu specyficznego biologicznego markera diety (biomarkera, wskaźnika). 5-*n*-alkilorezorcynole, główna frakcja związków fenolowych w całych ziarnach pszenicy i żyta, pod wieloma względami spełniają wymagania, jakie stawia się związkom kandydującym do roli biomarkera pełnoziarnistych produktów spożywczych. Stanowią one istotny składnik ziaren zbóż [12,13], w których występują jedynie we frakcji otrębowej, są wchłaniane i metabolizowane w organizmach zwierzęcych i człowieka [14,15]; mogą być oznaczane w postaci natywnej w osoczu [16] i jako metabolity w moczu [17]. Ponieważ skład poszczególnych homologów 5-*n*-alkilorezorcynoli różni się w ziarnach pszenicy i żyta, można je również zastosować do oznaczenia różnic pomiędzy wchłanianiem tych ziaren zbóż [13].

SKŁADNIKI OCHRONNE ZIAREN ZBÓŻ I PEŁNOZIARNISTYCH PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH

Dieta bogata w całe ziarna zbóż i produkty pełnoziarniste dostarcza organizmowi wielu substancji biologicznie czynnych (Ryc. 1). Należą do nich m. in.: błonnik pokarmowy, witaminy, pierwiastki śladowe, przeciwutleniacze i fitoestrogeny [1,2]. Wszystkie powyższe związki, poprzez szeroki zakres mechanizmów ochronnych, zmniejszają ryzyko występowania chorób dotykających współczesny świat: choroby naczyniowej serca, cukrzycy, otyłości oraz niektórych typów nowotworów [3-9]. Mechanizmy ochronnego działania diety opartej na spożywczych produktach pełnoziarnistych nie zostały jednak do tej pory dokładnie zbadane i poznane. Wynika to zarówno ze złożonej natury chorób, których występowaniu zapobiegają lub których skutki łagodzą, jak również z trudności, jakie konsumenci zmuszeni są pokonywać podczas identyfikacji produktów pełnoziarnistych.

Mariola Kulawinek[✉]

Arkadiusz Kozubek

Zakład Lipidów i Liposomów, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski

[✉]Zakład Lipidów i Liposomów, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; tel: (071) 375 62 03, e-mail: mariolak@ibmb.uni.wroc.pl

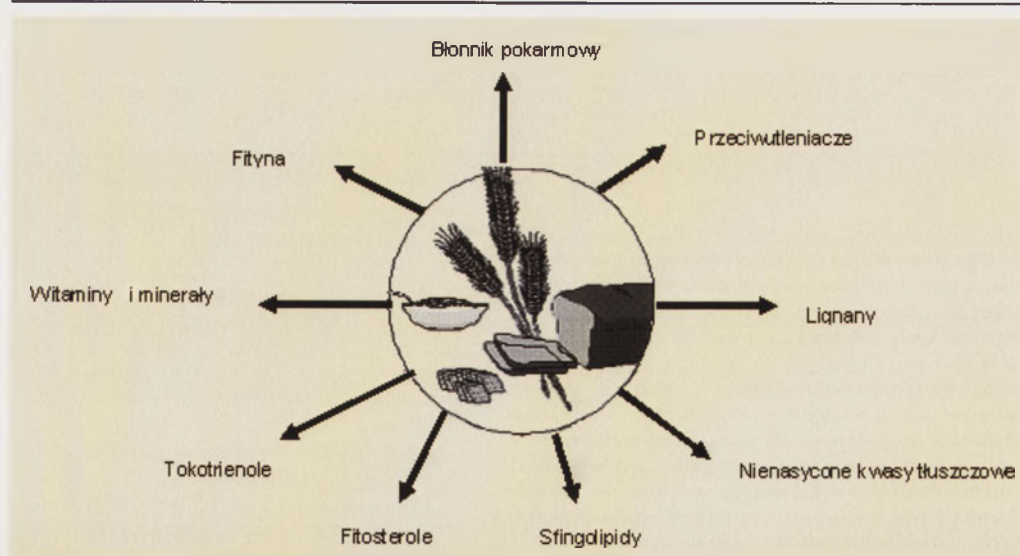
Artykuł otrzymano 5 marca 2007 r.

Artykuł zaakceptowano 23 kwietnia 2007 r.

Słowa kluczowe: 5-*n*-alkilorezorcynole, żyto, pszenica, dieta pełnoziarnista, biomarker, choroby przewlekłe

Wykaz skrótów: AR – 5-*n*-alkilorezorcynole; DHBA – kwas 3,5-dihydroksy-benzenowy; DHPPA – kwas 3-(3,5-dihydroksyfenylo)-1-propionowy; HDL – lipoproteina o dużej gęstości (ang. *high-density lipoprotein*); LDL – lipoproteina o małej gęstości (ang. *low-density lipoprotein*); SM – suchy materiał; VLDL – lipoproteina o bardzo małej gęstości (ang. *very low density lipoprotein*)

Podziękowanie: Artykuł powstał w trakcie realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N312 049 32/2699



Rycina 1. Ochronne składniki całych ziaren zbóż i produktów pełnoziarnistych. Ziarna zbóż i produkty pełnoziarniste dostarczają organizmowi wielu substancji biologicznie czynnych, do których należą: błonnik pokarmowy, witaminy, pierwiastki śladowe, przeciwutleniacze i fitoestrogeny [1,2].

Ziarno zboża składa się z: warstwy okrywowej (perikarp), zarodka i części zapasowej (bielmo). Substancje aktywne znajdują się w okrywie nasiennej ziarna (warstwa aleuronowa), dlatego procesy przemiału znacznie redukują ich zawartość (Tab. 1) w produkcie końcowym, czyli mąkach typów jasnych o niskim wyciągu. Charakteryzują się one obniżoną zawartością błonnika pokarmowego, zwłaszcza jego nierozpuszczalnej frakcji, zmniejszonym poziomem minerałów (cynku, żelaza i selen), witamin (witaminy B₆, kwasu foliowego), przeciwutleniaczy (tokotrienoli, kwasu ferulowego) oraz fosforu [1,2,10].

W lipcu 1999 r. FDA (ang. *Food and Drug Administration*) określiło pełnoziarniste produkty zbożowe (wysokobłonnikowe) jako takie, które zawierają przynajmniej 51 % wagowych nierozdrobnionych ziaren zbóż oraz charakteryzują się niską zawartością tłuszczów całkowitych, tłuszczów nasyconych i cholesterolu [18]. Ze względu na

Tabela 1. Różnice w składzie całych ziaren zbóż i mąkach typów jasnych o niskim wyciągu [11].

Składnik	Całe ziarna	Mąki typów jasnych
Frakcja aleuronowa	14%	<0,1%
Zarodek	2,5%	<0,1%
Całkowity błonnik	13%	3%
Nierozpuszczalny błonnik	11,5%	1,9%
Rozpuszczalny błonnik	1,1%	1,0%
Białko	14%	14%
Tłuszcz	2,7%	1,4%
Skrobia i inne cukry	70%	83%
Minerały (%)	1,8	0,6
Cynk (µg/g)	29	8
Żelazo (µg/g)	35	13
Selen (µg/g)	0,06	0,02
Witamina B ₆ (mg/g)	7,5	1,4
Kwas foliowy (mg/g)	0,57	0,11
Kwas ferulowy (mg/g)	5	0,4
B – tokotrienol (µg/g)	32,8	5,7
Fosfor (mg/g)	2,9	0,1

tę stosunkowo niską wartość, produkty pełnoziarniste mogą znacznie różnić się zawartością całych ziaren, mimo iż spełniają wymogi powyższej definicji. Warto również wspomnieć o nieuczciwej praktyce części producentów żywności, którzy stosując niewielkie ilości mąki o wysokim ciągu (mąki razowej), zastępują ją mąkami typów jasnych o niskim wyciągu z dodatkiem różnego rodzaju barwników, w celu nadania pieczywu razowemu ciemnej barwy [12,13]. Jedną z możliwości zdobycia pewniejszych dowodów na związek pomiędzy spożywaniem produktów pełnoziarnistych a spadkiem zachorowalności na choroby cywilizacyjne jest zastosowanie specyficznego bio-

markera (biologicznego markera, wskaźnika) żywności. W przypadku zbożowych produktów pełnoziarnistych idealny biomarker powinien być związkiem, którego występowanie ograniczone jest jedynie do perikarpu, głównego składnika frakcji otrębowej, gdyż to właśnie ona jest usuwana w procesach przemiału ziarna na mąkę. Obecnie kilka związków spełniających powyższe oczekiwania jest poddawanych intensywnym badaniom. Zalicza się do nich m.in.: błonnik pokarmowy, enterolakton (ENL) oraz 5-*n*-alkilirezorcynole [12,13,19].

BIOLOGICZNE MARKERY ZDROWEJ ŻYWNOCI

Większość wyników uzyskiwanych w badaniach epidemiologicznych, określających wpływ spożywania całych ziaren zbóż i produktów wysokobłonnikowych na kondycję i zdrowie człowieka, bazuje na przeprowadzaniu ankiet i sporządzaniu raportów na podstawie jadłospisów badanych ochotników. Wyniki uzyskiwane w tego typu badaniach w zasadniczym stopniu zależą od liczby ankietowanych oraz ich zaangażowania i pamięci, a wieloznaczność uzyskiwanych danych jest związana z szerokim zakresem eksperymentów [20-22]. W badaniach epidemiologicznych, takie informacje jak: rodzaj i skład spożywanych posiłków, sposób ich przygotowania oraz liczba posiłków w ciągu dnia, są niezwykle istotne. Najczęściej jednak nie są one dostarczane jako informacje dotyczące indywidualnych przypadków, ale większej grupy, np. kobiety – mężczyźni, dzieci – dorośli [23]. Tabele pokarmowe, przygotowywane na podstawie tego typu badań, dostarczają informacji na temat zasadniczych składników pożywienia, ale mogą zawierać istotne błędy i uogólnienia wynikające z natury badań epidemiologicznych [23].

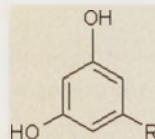
Długotrwały wpływ spożywania produktów wysokobłonnikowych na organizm człowieka i związana z tym profilaktyka niektórych chorób przewlekłych, wymaga dokładnego poznania, ale trudności w zdefiniowaniu produktów pełnoziarnistych są zasadniczą przeszkodą w określaniu

ich znaczenia w diecie [23-25]. Rozwiązaniem tego problemu wydaje się być możliwość zastosowania specyficznego markera biologicznego zdrowej żywności [26]. Wartościowy biomarker produktów pełnoziarnistych powinien dostarczać informacji o korzyściach wynikających ze spożycia tej grupy pokarmów i umożliwiać odróżnienie ich od innych składników diety, np. warzyw i owoców. Wskaźnik taki powinien charakteryzować się wysoką wrażliwością i specyficzną, minimalną inwazyjnością, niską ceną. Ponadto, do jego badania w organizmach zwierząt i człowieka powinny być zostać ustalone, sprawdzone i wystandaryzowane analityczne metody badawcze [21,27,28]. Absorpcja, metabolizm oraz oddziaływanie w organizmie człowieka mogą wpływać w istotnym stopniu na przydatność potencjalnego biomarkera. Wybór środowiska, w którym analizuje się zastosowanie danego wskaźnika (osocze, błony komórkowe, tkanki), jak i końcowe produkty jego metabolizmu, również mają duże znaczenie w ustaleniu związku pomiędzy ochronnym działaniem badanych substancji a poprawą ogólnej kondycji i zdrowia [21,27].

Istotne informacje na temat absorpcji, dystrybucji oraz magazynowania w organizmach żywych składników nieodżywczych diety do tej pory nie zostały określone i uporządkowane [21]. Prowadzone obecnie eksperymenty są niewystarczające, a większość badań nad składnikami nieodżywczymi diety pod kątem zastosowania ich jako biologicznych markerów, skupia się na wchłanianiu pełnych pokarmów, a nie poszczególnych składników żywności. Różnorodność pokarmów wywiera istotny wpływ na uzyskiwane wyniki [27]. Przykładem może być absorpcja lipofilnych składników pożywienia (np. witaminy E), wzmacniana przez równoczesne wchłanianie tłuszczów pokarmowych [20]. Jeśli biomarker jest końcowym produktem metabolizmu, jego stężenie zależy równocześnie od spożycia, absorpcji z przewodu pokarmowego oraz metabolizmu i może nie współzależać bezpośrednio od pobierania interesującego nas składnika diety [21]. Osobniczy wpływ na dystrybucję, magazynowanie oraz oddziaływanie wewnątrz organizmu potencjalnego markera biologicznego zdrowej żywności, także powinny zostać precyzyjnie oznaczone i zdefiniowane [29].

BUDOWA, WYSTĘPOWANIE I WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE 5-*n*-ALKILOREZORCYNOLI

5-*n*-alkilorezorcynole (alkilorezorcynole), zwane również lipidami rezorcynolowymi, należą do klasy niezoprenoidowych lipidów fenolowych, będących pochodnymi orcyny (1,3-dihydroksi-5-metylobenzenu). Powstają w czasie wtórnych przemian metabolicznych. Bogatym źródłem



Rycina 2. Podstawowa struktura alkilorezorcynoli. R – boczny łańcuch alkilowy, różniący się liczbą atomów węgla i stopniem nienasylenia dla poszczególnych homologów alkilorezorcynoli.

alkilorezorcynoli są rośliny i organizmy prokariotyczne. Związki te ze względu na posiadanie długołańcuchowych reszt węglowodorowych, brak rozpuszczalności w wodzie, a także charakter amfifilowy cząsteczek, zaliczane są do klasy lipidów. Alkilorezorcynole znajdują się obecnie w sferze intensywnych badań z dziedziny biofarmakologii, biomedycyny i biotechnologii [12,16,30].

Cząsteczki alkilorezorcynoli posiadają charakterystyczny, nieparzystowęgłowy łańcuch o długości zależnej od pochodzenia lipidu (Ryc. 2). Łańcuch ten jest z reguły nasycony lub jedno- albo dwunienasycony. Wiązania podwójne w konformacji *cis* występują najczęściej przy C8, C11 i C14 [30-32]. Alkilorezorcynole występujące u roślin wyższych charakteryzują się dużą różnorodnością homologów o długości łańcucha od C15 do C27, zmodyfikowanych w obrębie pierścienia i/lub łańcucha. Regułą jest występowanie pochodnych o 17-, 19- i 21-węglowych nasyconych i nienasyconych łańcuchach bocznych. Trawy, w tym ziarniaki, charakteryzują się występowaniem największej liczby homologów od 13 do 27 atomów węgla w łańcuchu bocznym (Tab. 2). Każdy z nich może występować jako nasycony, jednonienasycony lub dwunienasycony homolog z niezmodyfikowanym lub podstawionym przez grupy keto i/lub hydroksyl, alkilowym łańcuchem bocznym [31-33].

Scharakteryzowano ponad 150 naturalnie występujących alkilorezorcynoli. Obecność tych lipidów wykazano u roślin wyższych należących m. in. do rodzin: *Anacardiaceae*, *Proteaceae*, *Gramineae*, *Myristicaceae* oraz w mchach, porostach, grzybach i glonach [30-34]. Alkilorezorcynole występują również w organizmach prokariotycznych [35]. Szerokie spektrum nasyconych homologów zidentyfikowano w komórkach bakterii z rodzaju *Azotobacter sp.*, *Pseudomonas sp.* i *Mycobacterium*, u których wpływają na metabolizm błonowy oraz wykazują właściwości przeciwtleniające [35,36]. Związki te, występujące obficie w ziarnach, mogą chronić je przed patogenami (np. grzybami), szczególnie podczas kiełkowania [32,37,38]. Bogatym źródłem alkilorezorcynoli jest rodzina *Gramineae*. Najobficiej występują one w ziarnach żyta, pszenżyta, pszenicy i jęczmienia [30]. Zlokalizowano je w nasionach, owocach, starzejących się organach roślin i w cystach bakteryjnych. Podejmowane były również próby ich identyfikacji w liściach i łodygach roślin oraz komórkach wegetatywnych bakterii [30,39].

Tabela 2. Charakterystyka nasyconych homologów alkilorezorcynoli zidentyfikowanych w ziarnach żyta i pszenicy [30].

R	Nazwa 5- <i>n</i> -alkilorezorcynolu	Skrót nazwy	Masa cząsteczkowa	Log P [†]
C ₁₅ H ₃₁	5- <i>n</i> -pentadecylrezorcynol	C15:0	320	8,5
C ₁₇ H ₃₅	5- <i>n</i> -heptadecylrezorcynol	C17:0	348	9,4
C ₁₉ H ₃₉	5- <i>n</i> -nonadecylrezorcynol	C19:0	376	10,4
C ₂₁ H ₄₃	5- <i>n</i> -heneicosylrezorcynol	C21:0	404	11,4
C ₂₃ H ₄₇	5- <i>n</i> -tricosylrezorcynol	C23:0	432	12,4
C ₂₅ H ₅₁	5- <i>n</i> -penacosylrezorcynol	C25:0	460	13,4
C ₂₇ H ₅₅	5- <i>n</i> -nonacosylrezorcynol	C27:0	516	14,4

Log P[†] – współczynnik podziału oktanol/woda

Alkilorezorcynole charakteryzują się różnorodnymi właściwościami biologicznymi, począwszy od aktywności przeciwbakteryjnej, grzybobójczej i cytotoksycznej, poprzez regulowanie procesów wzrostu komórkowego, hamowanie syntezy DNA i RNA, zaburzenie aktywności enzymatycznej białek, skończywszy na oddziaływaniach z błonami biologicznymi i regulacji procesów utleniania

lipidów [12,13]. Funkcja alkilorezorcynoli występujących w ziarnach zbóż jest poznana w niewielkim stopniu. Przyпуска się, że mogą one odgrywać rolę swoistej bariery, zapewniającej skuteczne przetrwanie nasion w okresie spoczynkowym i chroniącej nasiona przed pasożytami roślin [32,37,38]. Obecność w plastydach i mitochondriach wskazuje na ich potencjalny udział w metabolizmie powyższych organelli komórkowych [32].

WYSTĘPOWANIE 5-*n*-ALKILOREZORCYNOLI W ZIARNACH ZBÓŻ I PRODUKTACH PEŁNOZIARNISTYCH

Zawartość alkilorezorcynoli w ziarnach zbóż waha się z zależności od gatunku i zależy od czynników genetycznych oraz środowiskowych [13,30]. W pojedynczej kulturze, w zależności od warunków uprawy, może różnić się nawet o ponad 500 µg/g ziarna [13]. Skład homologów jest stały dla poszczególnych gatunków zbóż, ale różni się pomiędzy rodzajami [40]. W ziarnach żyta waha się od 360 do 3200 µg/g SM (zawartość na gram suchego materiału) natomiast w ziarnach pszenicy od 317 do 1430 µg/g SM (Tab. 3) [13]. W skład ziarna pszenicy wchodzi głównie nasycone homologi o łańcuchach bocznych od 15 do 25 atomów węgla (90–95%), z największą zawartością homologu C21:0 (homolog z nasyconym alkilowym łańcuchem bocznym o 21 atomach węgla). Natomiast w skład ziarna żyta wchodzi homologii od 15 do, nawet, 27 atomów węgla w łańcuchach bocznych, z największą zawartością homologu C19:0 [30,31]. Niewielkie ilości homologu C27:0 zidentyfikowano w ziarnach żyta i jęczmienia [30,31]. Od 15 do 20% alkilorezorcynoli z ziarna żyta ma zmodyfikowane łańcuchy boczne, tworząc pochodne nienasycone, hydroksylowe i ketonowe [30,31,33]. Kukurydza zawiera niewielkie ilości orcinolu – homologu z pojedynczym atomem węgla w łańcuchu bocznym (C1:0) [41]. Alkilorezorcynole zidentyfikowano również w korzeniach ryżu, skórce mango, oleju z nerkowca (homologi C15:0, C15:1, C15:2, C15:3), mięszu mango i nerkowca (<5µg/g) [30]; nie występują one natomiast w ziarnach owsa, ryżu, prosa i sorga [13,30,42]. Niewielkie ilości alkilorezorcynoli zidentyfikowano w perikarpie i kotyledonie groszku ogrodowego (0,05–0,15 µg/g SM) [43]. Homologi C15:0 i C17:0 zlokalizowano w mięszu, owocach i ekstraktach z liści *Ginko Biloba* L., rośliny która znajduje szerokie zastosowanie w medycynie naturalnej [39].

Występowanie alkilorezorcynoli w ziarnach zbóż ograniczone jest jedynie do warstwy okrywowej (perikarp), dlatego wszystkie produkty spożywcze, zawierające w swoim składzie mąkę typu jasnego o niskim wyciągu (produkt

przemiału ziarna pozbawiony składników pochodzących od innych części niż bielmo), nie zawierają tych związków [13,30,40]. W mące żytniej o niskim wyciągu można odnaleźć śladowe ilości alkilorezorcynoli, są to jednak pewne pozostałości po otrębach, uzyskiwanych w wyniku wymielania produktów pochodzących od łuski, okrywki nasiennej i zarodka ziarna od jego części zapasowej – bielma. Zarodek ziarniaków żyta i pszenicy nie zawiera alkilorezorcynoli [30,40]. W poszczególnych frakcjach uzyskiwanych w trakcie procesów przemiału ziaren zbóż zawartość procentowa popiołu (standardowa metoda oznaczania otrąb w mące) i zawartość alkilorezorcynoli ściśle od siebie współzależą [13].

Alkilorezorcynole występują w stosunkowo dużych ilościach w wysokobłonnikowych produktach pszennych i żytnich [13]. Produkty jęczmienne również je zawierają, ale są one spożywane w zdecydowanie mniejszym stopniu w porównaniu z produktami pszennymi i żytnimi. W produktach pełnoziarnistych zawartość alkilorezorcynoli waha się i osiąga wartość od 142 do 1784 µg/g SM [13,40,41,44]. Przykładowo, pełnoziarnisty chrupki chleb pszenny zawiera od 202 do 353 µg/g SM lub nawet do 1007 µg/g SM [44], a pełnoziarnisty chrupki chleb żytni – od 197 do 686 µg/g SM. Alkilorezorcynole, podobnie jak kilka innych aktywnych składników ziaren zbóż, wydają się pozostawać niezmienione podczas przygotowywania pożywienia (np. obróbka wysokotemperaturowa, fermentacja, żelatynizacja) [13,47]. Niewiele danych uzyskano w wyniku badań epidemiologicznych z zakresu wchłaniania i metabolizmu alkilorezorcynoli w organizmach zwierząt i człowieka. Pewne jest jednak, że osoba spożywająca regularne posiłki bogate w wysokobłonnikowe produkty pszenne i żytnie może charakteryzować się wysokim poziomem wchłaniania tych lipidów. Dane ze Szwedzkiego Stowarzyszenia „Millers” podają, że średnie spożycie tych związków wynosi 17 mg AR/osobę/dzień (Ross i wsp., wyniki niepublikowane, Uppsala, Sweden, 2001). Są to jedynie wstępne ustalenia, uzyskane po oznaczeniu ilości alkilorezorcynoli w mące żytniej oraz pszennej i przy założeniu, że wszyscy spożywają stałe ilości zbożowych produktów spożywczych [23]. Jeden tradycyjny posiłek składający się z produktów pełnoziarnistych (np. otrąb) zawiera około 70 mg alkilorezorcynoli, natomiast jeden posiłek (40 g) pełnoziarnistego pszennego chleba – około 10 mg [13]. Niektórzy konsumenci z Wielkiej Brytanii mogą spożywać nawet powyżej 200 mg tych lipidów fenolowych dziennie [14]. Średnia absorpcja alkilorezorcynoli w krajach skandynawskich oraz w Wielkiej Brytanii została ustalona na podstawie dostępnych danych na temat spożycia produktów wysokobłonnikowych i wynosi: 11,9 mg/dzień w Wielkiej Brytanii, 17,5 mg/dzień w Szwecji, 18,5 mg/dzień w Norwegii, 39,8 mg/dzień w Finlandii oraz 37,1 mg/dzień w Holandii [48]. Dokładne ustalenie poziomu wchłaniania alkilorezorcynoli komplikuje się ze względu na różnice w zawartości tych związków w ziarnach żyta i pszenicy (powszechny problem przy oznaczaniu wszystkich składników pożywienia) i identyfikację, które ze spożywanych

Tabela 3. Zawartość alkilorezorcynoli w ziarnach zbóż i produktach pełnoziarnistych.

	AR ^a [µg/g SM]	AR ^b [µg/g SM]	AR ^c [µg/g SM]	AR ^d [µg/g SM]
Ziarna pszenicy	227 – 639	489 – 618	-	5000
Ziarna żyta	-	720 – 761	-	900
Ziarna jęczmienia	8	42 – 51	41 – 210	-
Ziarna pszenżyta	-	439 – 647	-	150
Otręby żytnie	2758 – 4108	-	-	-
Otręby pszenne	2211 – 3225	-	-	-

dane literaturowe: ^a[44], ^b[13, 40], ^c[45], ^d[46]; SM – suchy materiał

przez konsumentów produkty można faktycznie określić jako pełnoziarniste [49].

WPLYW 5-*n*-ALKILOREZORCYNOLI NA WZROST ZWIERZĄT

Początkowo wskazywano na negatywny związek pomiędzy spożywaniem alkilorezorcynoli (jako składników diety) a wzrostem zwierząt [12,30]. Pojawiły się nawet doniesienia, że zwierzęta karmione samym żytem, jako głównym składnikiem paszy, rosną wolniej niż zwierzęta karmione otrębami pszennymi i kukurydzianymi. Połączono tę zależność z występowaniem alkilorezorcynoli we wszystkich powyższych ziarnach zbóż, efektem czego było zaliczenie tych związków do substancji antyodżywczych [12,30]. Niemniej jednak tylko dwa eksperymenty wiążą bezpośrednio spożycie pokarmu bogatego w alkilorezorcynole z zahamowaniem wzrostu modelowych zwierząt (szczury i świnię) [12,30]. W obu przypadkach zwierzęta karmiono dużymi ilościami tych związków fenolowych, znacznie przekraczającymi ich zawartość w tradycyjnie stosowanych paszach pszennych i żytnich [12,30]. Dwa inne eksperymenty, w których karmiono szczury częściowo oczyszczonymi alkilorezorcynolami, nie potwierdzają negatywnego wpływu tych związków na wzrost zwierząt [12,30,49]. Większość eksperymentów wskazuje, że nieodżywczym składnikiem żyta jest najprawdopodobniej rozpuszczalna frakcja błonnika pokarmowego (szczególnie pentozany), a nie alkilorezorcynole, jak wcześniej sądzono, i że to właśnie ta frakcja hamuje wzrost zwierząt karmionych paszą żytnią [50]. Z drugiej strony nie przeprowadzono dotychczas dokładnych testów toksykologicznych po spożyciu i wchłonięciu alkilorezorcynoli, chociaż u szczurów, którym podawano pojedynczą doustną dawkę homologu C15:0 (do 5 µg na kg ciała), nie stwierdzono negatywnych (w tym śmiertelnych) objawów [12,30]. Dialektilorezorcynol wstrzyknięty myszom okazał się letalny przy dawce 1200 mg/kg ciała, ale był tolerowany do 800 mg/kg masy ciała [30]. Dla rezorcynolu LD₅₀ śmiertelna dawka doustna waha się od 300 do 990 mg/kg ciała [51]. Powyższe wyniki potwierdzają fakt, że alkilorezorcynole tylko w bardzo dużych dawkach są zdolne do wywołania toksycznych efektów na organizm zwierzęcy. Tak duże ilości tych związków nie występują w diecie, nawet w diecie wysokobłonnikowej. Z drugiej strony mogą one akumulować się w tkankach organizmu (zwłaszcza w tkance tłuszczowej) [49], w związku z czym należy precyzyjnie rozpatrzyć antyodżywczy aspekt tych lipidów fenolowych. Początkowo, magazynowanie alkilorezorcynoli w tkankach uznano za nieistotne zjawisko, odkąd zidentyfikowano jedynie nieznaczny poziom (<0.1%) radioaktywności w tkankach i narządach szczurów karmionych pojedynczą dawką wyznakowanego homologu C21:0 [14]. Niemniej jednak dłuższe stosowanie diety bogatej w produkty pełnoziarniste zawierające znaczne ilości alkilorezorcynoli, może prowadzić do akumulacji tych związków w tkance tłuszczowej i komórkach krwi (erytrocyty) [49,52]. Alkilorezorcynole mogą wbudowywać się do błon pęcherzyków transportujących lipidy lub wiązać się do białek osocza, o czym świadczy wzrost stopnia ich odzysku z osocza krwi ludzkiej po długotrwałej (16 godzin) inkubacji z wodą destylowaną [16,53].

ABSORPCJA 5-*n*-ALKILOREZORCYNOLI W ORGANIZMACH ZWIERZĘCYCH

Zboża najpowszechniej konsumowane przez ludzi zawierają największe ilości alkilorezorcynoli (ziarna żyta do około 3,2 mg/g, ziarna pszenicy do około 1,42 mg/g), dlatego istnieje duże prawdopodobieństwo ich spożywania w ilościach umożliwiających działanie biologiczne. W modelowych badaniach potwierdzono, że alkilorezorcynole są nie tylko spożywane, ale również wchłaniane i metabolizowane przez organizmy zwierzęce (świnie, szczury) i człowieka [15,54]. Strawność alkilorezorcynoli u ludzi kształtuje się na poziomie około 60%, przy czym różnice występujące pomiędzy poszczególnymi osobnikami wynoszą od 45 do 71% [15]. Stwierdzono również różnice w strawności poszczególnych homologów. Homologi o krótszych bocznych łańcuchach alkilowych – od 17 do 21 atomów węgla – charakteryzują się strawnością na poziomie 59%, natomiast te o dłuższych bocznych łańcuchach alkilowych – C23:0 i C25:0 – na poziomie 47% [15]. Wpływ długości bocznych łańcuchów alkilowych na poziom wchłaniania można tłumaczyć podobną zależnością, występującą w przypadku kwasów tłuszczowych i mechanizmu wchłaniania trójglicerydów. Te z nich, które zbudowane są ze średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych charakteryzują się wyższym poziomem wchłaniania w porównaniu z tymi, zbudowanymi z długołańcuchowych kwasów tłuszczowych [55].

Badania dowodzą, że alkilorezorcynole są absorbowane w początkowych odcinkach jelita cienkiego i być może przekształcane w bardziej hydrofilowe pochodne, chociaż u ludzi spożywających produkty zbożowe zidentyfikowano je w osoczu w formie niezmienionej [16]. Nie udało się dotychczas stwierdzić czy są one absorbowane bezpośrednio ze światła przewodu pokarmowego, czy w procesie tym uczestniczy mikroflora bakteryjna jelita, dlatego nie można wykluczyć ich częściowej degradacji w świetle jelita pokarmowego [12,30].

Strawność alkilorezorcynoli w jelicie cienkim świni określono na poziomie 60–79% [54]. Dawka i źródło tych lipidów, jak również prawdopodobny rozkład przez mikroflorę jelitową wpływają na ich absorpcję w organizmach zwierząt [14]. Wynosi ona około 37% w trakcie diety pełnoziarnistej, 40% w diecie opartej na frakcji aleuronowej uzyskiwanej z przemiału ziaren zbóż oraz 21% w diecie opartej na perikarpie ziaren zbóż [14]. Dystrybucję alkilorezorcynoli w organizmie zbadano u szczurów karmionych pojedynczą dawką (4.6 mg/kg ciała) wyznakowanego homologu C21:0 ([4-¹⁴C]-5-*n*-heneikozylrezorcynol-¹⁴C21:0) [14]. Największy poziom radioaktywności zidentyfikowano w kale (61%) i w moczu (31%) po, maksymalnie, 24 godzinach od podania pokarmu. W trakcie eksperymentu zauważono, że hydroliza enzymatyczna próbek moczu prowadzi do zwiększenia odzysku alkilorezorcynoli, co wskazuje na koniugację tych związków lub ich końcowych metabolitów ze składnikami moczu. Ponieważ hydroliza enzymatyczna nie zwiększyła odzysku wyznakowanego homologu z kału badanych zwierząt, prawdopodobnie występuje on w nim w postaci nieskoniugowanej [14]. W innym eksperymencie, w którym szczury karmiono ¹⁴C21:0, nie zidentyfikowano radioaktywności we krwi po 60 godzinach od podania wyznako-

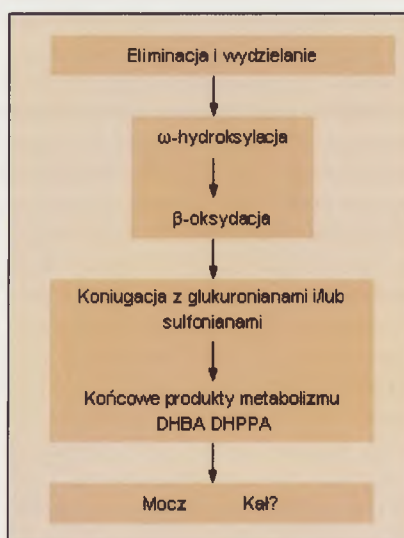
wanego homologu, a jego maksymalne stężenie we krwi określono po 7–12 godzinach od podania [14]. Alkilorezorcynole zlokalizowano także w tkance tłuszczowej okołonerkowej szczura w stężeniu ~ 2–4 µg/g świeżej tkanki [49]. Powyższe eksperymenty potwierdzają fakt, że zarówno u zwierząt, jak i u ludzi poziom absorpcji alkilorezorcynoli jest cechą indywidualną i waha się w różnych granicach u poszczególnych osobników [15,16,54].

W celu dokładnego poznania losów alkilorezorcynoli w organizmach żywych, przeprowadzono pierwsze próby badania kinetyki ich pojawiania się i zanikania z krwi zwierząt. Doświadczenia na świniach karmionych paszą bogatą w alkilorezorcynole sugerują, że czas ich połowicznej absorpcji wynosi 1,2 godziny, natomiast czas połowicznej eliminacji z krwi 3,9 godziny. Stosunkowo długie krążenie alkilorezorcynoli we krwi może być zarówno wynikiem krążenia jelitowo-wątrobowego, jak i innych, nie poznanych dotąd mechanizmów [54]. Kinetyka absorpcji alkilorezorcynoli nie została jeszcze określona w przypadku człowieka. Oznaczono je natomiast w osoczu krwi ludzkiej [16], a także ich potencjalne metabolity w moczu [17]. W ludzkim moczu, zebrany od osobników poddanych diecie bogatej w otręby pszenne, zidentyfikowano nieznaczne ilości niezmiennych alkilorezorcynoli (głównie C17:0) w formie skoniugowanej z glukuronianami i/lub sulfonianami [17]. Końcowe produkty szlaku rozkładu alkilorezorcynoli, zidentyfikowane w moczu to kwas 3,5-dihydroksybenzenowy oraz kwas 3-(3,5-dihydroksyfenylo)-1-propionowy [17]. W oparciu o przedstawione powyżej eksperymenty, rozważany jest mechanizm rozkładu alkilorezorcynoli w szlaku ω-oksydacji i, następującego po nim, skracania bocznego łańcucha alkilowego w wyniku β-oksydacji oraz końcowej koniugacji z glukuronianami i/lub sulfonianami [12,17].

PROPONOWANY SZLAK DEGRADACJI 5-*n*-ALKILOREZORCYNOLI

Nie przeprowadzono dotychczas kompleksowych, pełnych i złożonych badań nad metabolizmem alkilorezorcynoli z ziaren zbóż w organizmach zwierząt, chociaż istnieją doniesienia na temat mechanizmu rozkładu rezorcynolu (C1:0) i oliwetolu (C5:0). W modelowych badaniach nad szczurami, po doustnym podaniu rezorcynolu, następuje jego szybka absorpcja i gwałtowne usuwanie z organizmu (90% wyznakowanej porcji zidentyfikowano w moczu już po 24 godzinach od podania) [12,30]. Odnalezione w moczu metabolity rezorcynolu okazały się glukuronowymi, sulfonowymi i glukurono-sulfonowymi koniugatami [12,30]. Niezmodyfikowane alkilorezorcynole, a nie ich metabolity, zidentyfikowano w moczu ludzkim po zastosowaniu procedur dekonjugacji. Oznacza to, że w moczu ludzkim występują one również w postaci koniugatów [17]. Inne badania prowadzono nad szlakiem katabolicznym olivetolu przez grzyb *Syncephalastrum ravemosum* [12,30] obejmującym, podobnie jak w przypadku tokoferoli, skracanie bocznego łańcucha alkilowego alkilorezorcynoli, aż do wytworzenia łatwiej rozpuszczalnych w wodzie metabolitów końcowych [56,57]. 4-*n*-nonylfenol, fenolowy lipid podobny strukturalnie do cząsteczki alkilorezorcynolu, jest rozkładany w szlaku charakterystycznym dla tokoferoli. W moczu szczurów metabolity tego związku są skoniugowane z grupami

glukuronowymi i sulfonowymi, a ich łańcuch alkilowy jest skracany w mechanizmie β-oksydacji do kwasu 4-hydroksybenzenowego [58]. Tokoferolo-ω-hydroksylaza, enzym cytochromu P₄₅₀, inicjuje szlak katabolizmu tokoferoli, ale także katalizuje ω-hydroksylację leukotrienu B₄ i kwasu arachidonowego [57]. Ten sam enzym lub enzym o podobnej aktywności może również katalizować ω-hydroksylację bocznego łańcucha alkilowego alkilorezorcynoli (Ryc. 3). Podjednostki CYP4A i CYP4F cytochromu P₄₅₀, które katalizują niespecyficzną ω-hydroksylację w pozycji ω i ω-1 węgla łańcuchów alkilowych [59], rozpatrywane są jako enzymy szlaku rozkładu alkilorezorcynoli w organizmach żywych, a kwasy 3-(3,5-dihydroksyfenylo)-1-propionowy i 3,5-dihydroksybenzenowy proponowane są jako końcowe produkty metabolizmu alkilorezorcynoli, odkąd zidentyfikowano je w moczu osób spożywających produkty pełnoziarniste [17]. Powyższą tezę oparto m. in. na eksperymencie, w którym alkilorezorcynole hamują szlak hydroksylazy-ω-tokoferolowej, dla której głównym substratem jest γ-tokoferol (w przeciwieństwie do α-tokoferolu) [49]. Szczury karmione dużymi ilościami alkilorezorcynoli (1, 2 lub 4 g/kg diety lub 100–450 mg/kg ciała) charakteryzują się podwyższonym stężeniem γ-tokoferolu w wątrobie i płucach, podczas gdy stężenie γ- lub α-tokoferolu w osoczu nie zmienia się [49]. Alkilorezorcynole hamują także powstawanie rozpuszczalnych w wodzie metabolitów γ-tokoferolu w hodowlach tkankowych HepG3 [49]. Sezamina, lignan z nasion sezamu, hamuje enzym cytochromu P₄₅₀ – hydroksylazę-ω-tokoferolową i dlatego silnie hamuje ω-hydroksylację tokoferolu, kluczowego etapu szlaku rozkładu tokoferoli w hepatocytach [49]. Sezaminę zastosowano jako pozytywną kontrolę w eksperymencie, w którym badano potencjalny szlak katabolizmu alkilorezorcynoli. W porównaniu z sezaminą efekt działania alkilorezorcynoli był znacznie słabszy, dlatego zasugerowano, że zamiast bezpośredniego blokowania mogą one hamować metabolizm γ-tokoferolu w sposób kompetencyjny [49]. Alkilorezorcynole o krótszych łańcuchach bocznych prawdopodobnie są lepszymi substratami w szlaku hydroksylazy-ω-tokoferolowej [12,49] w przeciwieństwie do długołańcuchowych alkilorezorcynoli, które są w mniejszym stopniu zdolne do współzawodnictwa w wiązaniu do enzymu [12].



Rycina 3. Proponowany szlak degradacji alkilorezorcynoli w organizmach żywych prawdopodobnie obejmuje ω-hydroksylację i następujące po sobie kolejne β-oksydacje bocznego łańcucha alkilowego alkilorezorcynolu, prowadzące do powstania metabolitów o skróconych łańcuchach. Kwasy 3-(3,5-dihydroksyfenylo)-1-propionowy (DHPPA) i 3,5-dihydroksybenzenowy (DHBA) proponowane są jako końcowe metabolity szlaku degradacji alkilorezorcynoli. Zidentyfikowano je, w postaci koniugatów sulfonowych i/lub glukuronowych, w moczu osób spożywających całe ziarna zbóż oraz produkty wysokobłonnikowe [17,49].

METODY OZNACZANIA I ANALIZY 5-*n*-ALKILOREZORCYNOLI W OSOCZU, MOCZU I BŁONACH BIOLOGICZNYCH

Raulus i Penney analizowali oliwetol (C5:0) w surowicy królika, stosując wysokosprawną chromatografię ciśnieniową (HPLC ang. *high performance/pressure liquid chromatography*) z detekcją przez pomiar absorpcji UV [12,30]. Metabolity alkilorezorcynoli zidentyfikowano w moczu człowieka za pomocą chromatografii gazowej z detekcją spektrometrii mas (GC-MS ang. *gas chromatography-mass spectrometry*) po enzymatycznej hydrolizie i oczyszczeniu w chromatografii cienkowarstwowej (TLC ang. *thin layer chromatography*). Niezmodyfikowane (natywne) alkilorezorcynole oznaczono w ludzkiej i świńskiej treści pokarmowej za pomocą GC-MS i GC-FID (chromatografia gazowa z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym, ang. *gas chromatography-flame ionization detector*) [14,15,17]. Oczyszczanie za pomocą TLC oraz analizę TLC w połączeniu z GC zastosowano przy pomiarach ilości alkilorezorcynoli zmagazynowanych w tkankach stałych szczura i krwinkach czerwonych krwi ludzkiej [49,52], a detektorem radiochemicznym HPLC posłużono się do oznaczenia wyznakowanych- C^{14} metabolitów alkilorezorcynoli w osoczu krwi ludzkiej, moczu ludzkim i kale szczurów [14]. Najnowsza metoda oznaczania alkilorezorcynoli we krwi ludzkiej opiera się na zastosowaniu analizy GC-MS ekstraktów z osocza [16]. Hydroliza enzymatyczna próbek osocza przy pomocy sulfatazy lub β -glukuronidazy nie zwiększa mierzalnego poziomu alkilorezorcynoli, co sugeruje, że są one transportowane we krwi w postaci nieskoniugowanej. Niemniej jednak kilkunastogodzinna inkubacja prób osocza z wodą destylowaną

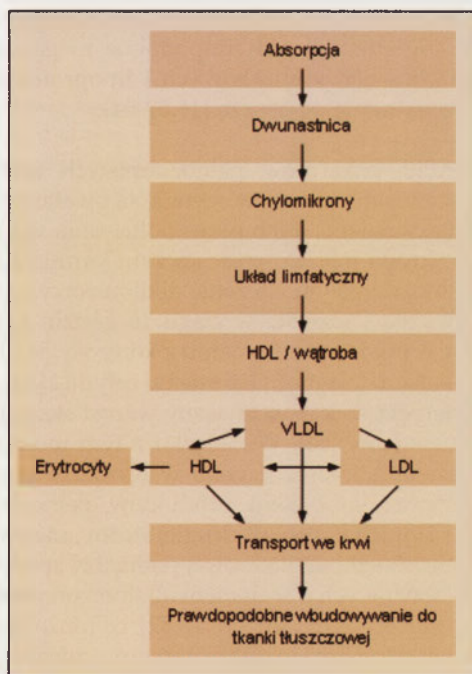
zwiększa wydajność ich ekstrakcji oraz odzysk, co sugeruje możliwość tworzenia kompleksów alkilorezorcynoli z białkami osocza i ich stopniowego uwalniania w wyniku długotrwałej inkubacji [16]. Ponadto, alkilorezorcynole są włączane do lipoprotein osocza, co może częściowo tłumaczyć powyższe zjawisko [53]. W eksperymentach nad oznaczaniem alkilorezorcynoli w osoczu, moczu i błonach biologicznych jako standard zewnętrzny stosuje się C20:0, nie występujący w warunkach naturalnych w ziarnach zbóż [30].

ABSORPCJA I DYSTRYBUCJA 5-*n*-ALKILOREZORCYNOLI W OSOCZU KRWI

Alkilorezorcynole nie są wchłaniane z jelita do żyły wrotnej wątrobowej, tak jak aminokwasy, cukry czy krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, ale są absorbowane przez układ limfatyczny jak inne związki lipofilne [54]. Nie stwierdzono różnic w stężeniu alkilorezorcynoli we krwi żyłnej i tętniczej w badaniach na modelowych zwierzętach – świniami, dlatego nie jest możliwe wyznaczenie rzeczywistego czasu ich absorpcji lub zależnej od dawki absorpcji do osocza krwi. Zaobserwowano jednak zmiany w stężeniu alkilorezorcynoli w osoczu w odpowiedzi na wzrost spożycia całych ziaren zbóż i/lub produktów pełnoziarnistych [54]. Najwyższe stężenie alkilorezorcynoli w osoczu po pojedynczym karmieniu (3–4 godziny) odpowiadało wynikom uzyskanym dla tokoferoli (3,3–4,4 godziny) [54,60]. Podobną zależność stwierdza się dla czasu półtrwania obu grup związków we krwi, tj. 3,93 godziny dla alkilorezorcynoli i 2,3–4,4 godziny dla tokoferoli. Wydłużenie czasu półtrwania (~10 godzin) wyznakowanych alkilorezorcynoli u szczurów (wcześniejsze badania) wskazuje raczej na pomiar radioaktywności ich metabolitów, a nie natywnych cząsteczek [14]. Rozbieżności te mogą wynikać również z odmiennych zwyczajów żywieniowych i różnic międzygatunkowych [54].

U świni wszystkie homologii alkilorezorcynoli są wchłaniane w podobny sposób. Skład poszczególnych homologów w osoczu odpowiada ich rozkładowi w diecie [54]. U niektórych świń uzyskano dwa maksima czasowe absorpcji alkilorezorcynoli, tj. po 3–4 godzinach i po 6–9 godzinach, co tłumaczy się wewnątrzwątrobowym krążeniem tych lipidów fenolowych [54]. Co ciekawe, szybko po karmieniu stężenie alkilorezorcynoli wzrasta do 74 nmol/l i osiąga maksimum po 3 godzinach [54]. Wynika to być może z ich magazynowania w błonach komórkowych lub tkance tłuszczowej oraz stopniowego uwalniania do krwioobiegu. Zjawisko to można również powiązać z wyżej wspomnianym wewnątrzwątrobowym krążeniem alkilorezorcynoli [54].

Alkilorezorcynole są włączane w błony ludzkich erytrocytów podczas diety bogatej w produkty pełnoziarniste [52]. Stosunek stężenia alkilorezorcynoli w osoczu do ich zawartości w błonach erytrocytów wynosi 0,7 w diecie opartej na całych ziarnach żyta i 0,5 w diecie opartej na całych ziarnach pszenicy [52]. Wartości te okazują się istotnie podobne (szczególnie po wchłonięciu alkilorezorcynoli z pełnoziarnistego chleba żytniego), do wyznaczonych dla α - (0,80) i γ -tokoferolu (0,67), kiedy to poziom tokoferoli erytrocytarnych odniesiono do poziomu lipidów osocza [61]. Wskazuje to na



Rycina 4. Proponowany szlak dystrybucji alkilorezorcynoli w osoczu krwi. Alkilorezorcynole wydają się być absorbowane z jelita cienkiego, poprzez układ limfatyczny, do chylomikronów, a następnie transportowane do wątroby i tam włączane do VLDL. Z VLDL ulegają redystrybucji do HDL i LDL. Peryferyczne tkanki, zwłaszcza tkanki tłuszczowe, mogą pozyskiwać alkilorezorcynole poprzez lipoproteiny. Poprzez LDL mogą być również dostarczane do makrofagów lub płytek arteriosklerotycznych, gdzie wykazują prawdopodobnie efekt stabilizujący błony komórkowe [53].

podobny mechanizm dystrybucji tokoferoli i alkilorezorcynoli w osoczu i komórkach krwi [52,61]. W oparciu o dotychczasowe badania, nie stwierdzono we krwi obecności specyficznych transporterów tokoferoli [61]. Niemniej jednak, jeśli takie transportery istnieją być może są one również wykorzystywane w transporcie alkilorezorcynoli [61].

Długołańcuchowe homologi alkilorezorcynoli wbudowują się w błony erytrocytarne w większej ilości w porównaniu z krótkołańcuchowymi homologami [52]. Jest to zgodne z wcześniejszymi badaniami przeprowadzonymi w warunkach *in vitro* [62]. Alkilorezorcynole charakteryzują się wysokim współczynnikiem podziału LogP i dlatego łatwo wbudowują się w błony biologiczne [30,62]. Długołańcuchowe alkilorezorcynole są bardziej hydrofobowe w związku z czym wykazują zwiększoną tendencję do włączania się w środowisko lipofilne (błona) [52]. Badania *in vitro* wskazują na zmiany w przepuszczalności błony po wbudowaniu się w jej strukturę cząsteczek alkilorezorcynoli [30,62]. Powyższej zależności nie stwierdzono jednak w badaniach *in vivo*. Fakt ten można tłumaczyć dużą różnicą w wartościach stężeń alkilorezorcynoli stosowanych w obu typach eksperymentów. Stężenie stosowane w badaniach *in vitro* wynosiło 3,5 do 30 $\mu\text{mol/l}$ [30], a w badaniach *in vivo* osiągało maksymalnie 637 nmol/l upakowanych komórek [52]. Prawdopodobnie, natychmiast po absorpcji dochodzi do zwiększenia poziomu wbudowywania się cząsteczek alkilorezorcynoli w błony erytrocytów, co może mieć nieznaczny wpływ na ich przepuszczalność [52].

Alkilorezorcynole wbudowują się we wszystkie klasy lipoprotein (VLDL, LDL i HDL) ludzkiego osocza i wydają się być transportowane w formie nieskoniugowanej [53]. Stężenie alkilorezorcynoli mierzone we wszystkich frakcjach lipoproteinowych jest zbliżone do ich całkowitego stężenia w osoczu. VLDL wykazują najwyższą zdolność do transportowania alkilorezorcynoli [53]. Jednak ze względu na niską zawartość VLDL w osoczu, HDL razem z VLDL wydają się być głównymi nośnikami tych lipidów fenolowych. Powyższe doniesienia są odmienne od wyników uzyskanych dla α -tokoferolu, dla którego LDL i HDL są głównymi nośnikami w osoczu [53,61]. Alkilorezorcynole wydają się być absorbowane poprzez układ limfatyczny z jelita cienkiego do chylomikronów (Ryc. 4), a następnie transportowane do wątroby i stamtąd do VLDL [53]. Z VLDL mogą ulegać redystrybucji do HDL i LDL. HDL włączają alkilorezorcynole, prawdopodobnie, bezpośrednio z chylomikronów, co tłumaczy ich wyższe stężenie w HDL w porównaniu z LDL [53]. Powyższy szlak wykazuje szereg podobieństw do szlaku dystrybucji tokoferoli w osoczu [63]. Peryferyczne tkanki, zwłaszcza tkanki tłuszczowe, mogą również pozyskiwać alkilorezorcynole poprzez lipoproteiny [53]. Z LDL alkilorezorcynole prawdopodobnie są dostarczane do makrofragów lub płytek arteriosklerotycznych, gdzie wykazują efekt stabilizujący błony komórkowe [30,62].

Nie stwierdzono dotychczas żadnych zmian w aktywności utleniającej układów, zawierających alkilorezorcynole w warunkach *in vitro* [64]. Niemniej jednak konieczne wydaje się uzupełnienie istniejącego stanu wiedzy na temat ich potencjalnego działania jako przeciwutleniaczy w błonach biologicznych [64]. Przypuszcza się, że alkilorezorcynole

mogą wywoływać zmiany w rozkładzie lipidowym LDL i HDL i być może w ten sposób wpływają na wrażliwość utleniania. Aktywność przeciwutleniającą alkilorezorcynoli próbowano wytłumaczyć także poprzez pośredni wpływ tych związków na poziom tokoferolu, zwłaszcza γ -tokoferolu [49,53,64]. Wzrost stężenia alkilorezorcynoli w wyniku diety pełnoziarnistej zwiększa stężenie γ -tokoferolu w wątrobie szczura, a badania *in vitro* wskazują na zahamowanie rozkładu γ -tokoferolu w związku z pojawieniem się alkilorezorcynoli wchłoniętych z pożywienia [49]. Z drugiej strony nie ma bezpośrednich dowodów na to, że alkilorezorcynole wpływają na mierzalne w surowicy stężenia przeciwutleniaczy, ale być może mogą jednak wywoływać jakieś zmiany w stężeniu tokoferoli i cholesterolu w wątrobie lub/i innych tkankach, jak również wpływać na właściwości błony komórkowej oraz bezpośrednio lub pośrednio zmieniać wrażliwość utleniającą komórek [53].

PRZYSZŁOŚĆ 5-*n*-ALKILOREZORCYNOLI JAKO BIOLOGICZNYCH MARKERÓW ZDROWEJ ŻYWNOŚCI

Alkilorezorcynole występują w dużych ilościach w ziarniakach zbóż, zwłaszcza żyta i pszenicy, ale nie wiele wiadomo o ich funkcjach jako składników diety wysokobłonnikowej. Badania *in vitro* wskazują na szeroki zakres ich właściwości biologicznych, ale ich aktywność *in vivo* ograniczona jest niskimi stężeniami, w jakich występują one w organizmach żywych [12,30]. Stężenie alkilorezorcynoli wzrasta znacznie w osoczu w trakcie diety wysokobłonnikowej i maleje w trakcie diety niskobłonnikowej. Podczas diety bezglutenowej oraz pozbawionej całych ziaren zbóż nie stwierdza się obecności alkilorezorcynoli we krwi [16]. Niemniej jednak niewielkie, ale stałe ilości tych lipidów fenolowych są oznaczane w ludzkim i zwierzęcym (świnie) osoczu, co sugeruje ich prawdopodobne magazynowanie w tkankach, błonach komórkowych i lipoproteinach oraz stopniowe uwalnianie do osocza [16,52-54].

Po spożyciu pokarmów pełnoziarnistych (szczególnie żytnich i pszennych), alkilorezorcynole są gwałtownie uwalniane z jelita cienkiego, a ich okres półtrwania we krwi jest stosunkowo krótki [65]. Po pojedynczym karmieniu żytnim chlebem pełnoziarnistym, stężenie alkilorezorcynoli w osoczu krwi świńskiej wzrasta w ciągu 16 godzin i pozostaje około 5-razy wyższe w porównaniu z kontrolą [54]. Również w zachowawczym (ciągłym) karmieniu całymi ziarnami żyta te same zwierzęta wykazują znaczny wzrost stężenia alkilorezorcynoli we krwi [54]. W związku z tym można stwierdzić, że stężenie alkilorezorcynoli w osoczu wzrasta wraz ze zwiększonym spożyciem produktów pełnoziarnistych pszennych i żytnich [54,65]. Z drugiej strony, nie stwierdzono dotychczas zależności ilościowej pomiędzy spożywaniem produktów zbożowych a stężeniem alkilorezorcynoli w osoczu lub błonach erytrocytarnych [16,52], co może ograniczyć możliwość zastosowania ich jako markerów zdrowej żywności. Zmiany w całkowitym stężeniu alkilorezorcynoli w osoczu razem z oznaczeniem stosunku homologów C17:0/C21:0 mogą służyć do rozróżniania poziomu spożycia produktów pełnoziarnistych żytnich i pszennych [13,44]. Zarówno podczas zachowawczego, jak i sporadycznego spożycia produktów pełnoziarnistych stosunek ten wzrasta tylko po zjedzeniu produktów żytnich, a maleje po zjedzeniu produktów pszen-

nych [65]. Różnice te, związane z odmiennymi wartościami stosunku homologów C17:0/C21:0 w ziarnach żyta i pszenicy [13], przekładają się na produkty zbożowe, a następnie na stężenie poszczególnych homologów w osoczu krwi, błonach erytrocytów i lipoproteinach [16,52,53].

PODSUMOWANIE

Niektórzy autorzy przedstawiają teorię, zgodnie z którą, dieta oparta na ziarnach zbóż i wysokobłonnikowych produktach zbożowych może zapobiegać rozwojowi niektórych chorób przewlekłych [1-9]. Pomiar stężenia alkilorezorcynoli w osoczu może dostarczyć informacji na temat zwyczajów żywieniowych i prawdopodobnie wskazywać na różnice pomiędzy spożywaniem produktów zbożowych (zwłaszcza żytnich i pszennych) a innymi wysokobłonnikowymi produktami bogatymi w roślinne lignany, takimi jak nasiona, warzywa i owoce. To mogłoby pozwolić na określenie ochronnej roli całych ziaren zbóż w profilaktyce niektórych chorób cywilizacyjnych, w porównaniu do innych źródeł wartościowych mikroskładników w diecie człowieka. Przed potwierdzeniem możliwości zastosowania alkilorezorcynoli jako markerów biologicznych zdrowej żywności, należy ustalić więcej szczegółów dotyczących zależności pomiędzy spożywaniem całych ziaren zbóż oraz pełnoziarnistych produktów pszennych i żytnich a zmianami w stężeniu alkilorezorcynoli w osoczu krwi, błonach erytrocytarnych i lipoproteinach oraz ich potencjalnych metabolitów w moczu. Niezwykle ważne wydaje się również precyzyjne określenie szlaku katabolizmu alkilorezorcynoli wchłanianych z pożywieniem oraz kinetyki absorpcji tych lipidów fenolowych w organizmie człowieka.

PIŚMIENICTWO

1. Slavin JL, Martini MC, Jacobs DR Jr, Marquart L (1999) Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *Am J Clin Nutr* 70: 459-463
2. Cleveland LE, Moshfegh AJ, Albertson AM, Goldman JD (2000) Dietary intake of whole grains. *J Am Coll Nutr* 19: 331-338
3. Anderson JW, Hanna TJ (1999) Whole grains and protection against coronary heart disease: what are the active components and mechanism? *Am J Clin Nutr* 70: 307-308
4. Anderson JW (2004) Whole grains and coronary heart disease: the whole kernel of truth. *Am J Clin Nutr* 80: 1459-1460
5. Spiller GA, Bruce B (1998) Vegan diets and cardiovascular health. *J Am Coll Nutr* 17: 407-408
6. Slavin JL (2000) Mechanisms for the impact of whole grain foods on cancer risk. *J Am Coll Nutr* 19: 300-3007
7. Liu RH (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr* 134: 3479S-3485S
8. Jang Y, Lee JH, Kim OY, Park HY, Lee SY (2001) Consumption of whole grain and legume powder reduces insulin demand, lipid peroxidation and plasma homocysteine concentrations in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 2065-20719
9. Preira MA, Jacobs DR Jr, Pins JJ, Raatz SK, Gross MD, Slavin JL, Seaquist ER (2002) Effect of whole grains on insulin sensitivity in overweight hyperinsulinemic adults. *Am J Clin Nutr* 75: 848S-855S
10. Jones JM, Reicks M, Adams J, Fulcher G, Weaver G, Kanter M, Marquart L (2002) The importance of promoting a whole grain foods message. *J Am Coll Nutr* 21: 293-297
11. Thompson LU (1992) Potential health benefits of whole grains and their components. *Contemp Nutr* 17: 1-2
12. Ross AB, Kamal-Eldin A, Aman P (2004) Dietary alkylresorcinols: absorption, bioactivities, and possible use as biomarkers of whole grain wheat – and rye – rich foods. *Nutr Rev* 62: 81-95
13. Ross AB, Shepard MJ, Schupphaus M, Sinclair V, Alfaro B, Kamal-Eldin A, Aman P (2003) Alkylresorcinols in cereals and cereals products. *J Agri Food Chem* 51: 4111-4118
14. Ross AB, Shepherd MJ, Bach Knudsen KE (2003) Absorption of dietary alkylresorcinols in ileal cannulated pigs and rats. *Br J Nutr* 90: 787-794
15. Ross AB, Kamal-Eldin A, Lundin E, Zhang J-X, Hallmans G, Aman P (2003) Cereal alkylresorcinols are absorbed by humans. *J Nutr* 133: 2222-2224
16. Linko A-M, Parikka K, Wähälä K, Adlercreutz H (2002) Gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of alkylresorcinols in human plasma. *Anal Biochem* 308: 307-313
17. Ross AB, Aman P, Kamal-Eldin A (2004) Identification of cereal alkylresorcinol metabolites in human urine – potential biomarkers of wholegrain wheat and rye intake. *J Chromatogr B* 809: 125-130
18. Food and Drug Administration: Whole grain foods FDAMA Health Claim. Docket 99P-2209. Washington, DC. July 1999
19. Stumpf K (2004) Serum enterolactone as a biological marker in breast cancer: from laboratory to epidemiological studies. In: *Medical Faculty*, p.78. University of Helsinki, Helsinki.
20. Jönsson T, Olsson S, Åhrén B, Bøg-Hansen TC, Dole A, Dole LS (2005) Agrarian diet and diseases of affluence – Do evolutionary novel lectins cause leptin resistance? *BMC Endocrine Disorders* 5: 10
21. Wild CP, Andersson C, O'Brien NM, Wilson L, Woods JA (2001) A critical evaluation of the application of biomarkers in epidemiological studies on diet and health. *Br J Nutr* 86: 37-53
22. Jacobs DR, Meyer HE, Solvoll K (2001) Reduced mortality among whole grain bread eaters in men and women in the Norwegian County Study. *Eur J Clin Nutr* 55: 137-143
23. Kantor LS, Variyam JN, Allshouse JE, Putman JJ, Lin B-H (2001) Choose a variety of grains daily, especially whole grains: a challenge for consumers. *J Nutr* 131: 473S-486S
24. Lang R, Jebb SA (2003) Who consumes whole grains, and how much? *Proc Nutr Soc* 62: 123-127
25. Liu S, Stampfer MJ, Hu FB, Giovannucci E, Rimm E, Manson JE, Hennekens CH, Willett WC (1999) Whole-grain consumption and risk of coronary heart disease: results from the Nurses' Health Study. *Am J Clin Nutr* 70: 412-419
26. Edge M, Jones JM, Marquart LA (2005) A new life for whole grains. *J Am Diet Assoc* 105: 1856-1860
27. Crews H, Alink G, Andersen R, Braesco V, Holst B, Maiani G, Ovesen L, Scotter M, Solfrizzo M, van den Berg R, Verhagen H, Williamson G (2001) A critical assessment of some biomarker approaches linked with dietary intake. *Br J Nutr* 86: 5-35
28. Weber P (2001) Role of biomarkers in nutritional science and industry – a comment. *Br J Nutr* 86: 93-95
29. Grandjean P (1995) Biomarkers in epidemiology. *Clin Biochem* 41: 1800-1803
30. Kozubek A, Tyman JHP (1999) Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. *Chem Rev* 99: 1-25
31. Kozubek A, Tyman JHP (1995) Cereal grain resorcinolic lipids: mono and dienoic homologues are present in rye grains. *Chem Phys Lipid* 78: 29-35.
32. Deszcz L, Kozubek A (2000) Higher cardol homologs (5-alkylresorcinols) in rye seedlings. *Biochim Biophys Acta* 1483: 241-250
33. Suzuki Y, Esami Y, Yamaguchi I (1999) Structures of 5-alkylresorcinol-related analogues in rye. *Phytochemistry* 52: 281-289
34. Żarnowski R, Suzuki Y, Esami Y, Pietr SJ (2000) 5-n-Alkylresorcinols from the green microalga *Apatococcus constipatus*. *Phytochemistry* 55: 975-977
35. Kozubek A, Pietr S, Czerwonka A (1996) Alkylresorcinols are abundant lipid component in *Azotobacter* and *Pseudomonas* strains. *J Bacteriol* 178: 4027-4030

36. Bitov VV, Nenashev VA, Pridachina NN, Batrakov SG (1992) Membrane-structuring properties of bacterial long-chain alkylresorcinols. *Biochim Biophys Acta* 1108: 224-232
37. García S, García C, Heinzen H, Moyna P (1997) Chemical basis of the resistance of barley seeds to pathogenic fungi. *Phytochemistry* 44: 171-190
38. Miché L, Belkin S, Rozen R, Balandreau J (2003) Rice seedling whole exudates and extracted alkylresorcinols induce stress-response in *Escherichia coli* biosensors. *Environ Microbiol* 5: 403-411
39. Żarnowska ED, Żarnowski R, Kozubek A (2000) Alkylresorcinols in fruit pulp and leaves of *Ginkgo biloba* L. *Z Naturforsch* 55c: 881-885
40. Ross AB, Kamal-Eldin A, Jung C, Shepherd MJ, Aman P (2001) Gas chromatographic analysis of alkylresorcinols in rye (*Secale cereale* L.) grains. *J Sci Food Agric* 81: 1405-1411
41. Gembeh SV, Brown RL, Grimm C, Cleveland TE (2001) Identification of chemical components of corn kernel pericarp wax associated with resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. *J Agric Food Chem* 49: 4635-4641
42. Mattila P, Pihlava J-M, Hellström J (2005) Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *J Agric Food Chem* 53: 8290-8295
43. Żarnowski R, Kozubek A (1999) Alkylresorcinol homologs in *Pisum sativum* L. varieties. *Z Naturforsch* 54c: 44-48
44. Chen Y, Ross AB, Åman P, Kamal-Eldin A (2004) Alkylresorcinols as markers of whole-grain wheat and rye in cereal products. *J Agric Food Chem* 52: 8242-8246
45. Żarnowski R, Suzuki Y, Yamaguchi I, Pietr SJ (2002) Alkylresorcinols in barley (*Hordeum vulgare* L. distichon) grains. *Z Naturforsch C* 57c: 57-62
46. Gąsiorowski K, Szyba K, Brokos B, Kozubek A (1996) Antimutagenic activity of alkylresorcinols from cereal grains. *Cancer Lett* 106: 109-115
47. Liukkonen K-H, Katina K, Wilhelmsson A, Myllymäki O, Lampi A-M, Kariluoto S, Pllronen V, Heinonen S-M, Nurmi T, Aldercreutz H, Peltoketo A, Pihlava J-M, Hietaniemi V, Poutanen K (2003) Process-induced changes on bioactive compounds in wholegrain rye. *Proc Nutr Soc* 62: 1-6
48. Ross AB, Becker W, Chen Y, Kamal-Eldin A, Åman P (2005) Intake of alkylresorcinols from wheat and rye in the United Kingdom and Sweden. *Br J Nutr* 94: 496-499
49. Ross AB, Chen Y, Frank J, Swanson JE, Parker RS, Kozubek A, Lundh T, Vessby B, Åman P, Kamal-Eldin A (2004) Cereal alkylresorcinols elevate gamma-tocopherol levels in rats and inhibit gamma-tocopherol metabolism in vitro. *J Nutr* 134: 506-510
50. Vinx CJA, Delcour J (1996) Rye (*Secale cereale* L.) arabinoxylans: a critical review. *J Cereal Sci* 24: 1-14
51. Lynch BS, Delzell ES (2002) Bechtel DH. Toxicology review and risk assessment of resorcinol: thyroid effects. *Reg Toxicol Pharmacol* 36: 198-210
52. Linko A-M, Aldercreutz H (2005) Whole-grain rye and wheat alkylresorcinols are incorporated into human erythrocyte membranes. *Br J Nutr* 93: 11-13
53. Linko-Parvinen A-M, Landberg R, Tikkanen MJ, Aldercreutz H, Peñalvo JL (2007) Whole-grain alkylresorcinols are transported in human plasma lipoproteins and their intake corresponds to plasma concentrations (w druku)
54. Linko AM, Ross AB, Kamal-Eldin A, Serena A, Kjaer AK, Jørgensen H, Peñalvo JL, Aldercreutz H, Åman P, Knudsen KE (2006) Kinetics of the appearance of cereal alkylresorcinols in pig plasma. *Br J Nutr* 95: 282-287
55. Ramirez M, Amate L, Gil A (2001) Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Hum Dev* 65: 95S-101S
56. Birringer M, Drogan D, Brigelius-Flohé R (2001) Tocopherols are metabolized in HepG2 cells by side chain ω -oxidation and consecutive β -oxidation. *Free Radic Biol Med* 31: 226-231
57. Sontag TJ, Parker RS (2002) Cytochrome P450 ω -hydroxylase pathway of tocopherol catabolism. *J Biol Chem* 277: 25290-25296
58. Zalko D, Costagliola R, Dorio C, Rathahao E, Cravedi J-P (2001) *In vivo* metabolic fate of the xenoestrogen 4-*n*-nonylphenol in Wistar rats. *Drug Metab Disp* 31: 168-178
59. Okita RT, Okita JR (2001) Cytochrome P450 4A fatty acid ω -hydroxylases. *Curr Drug Metab* 2: 265-281
60. Schwedhelm E, Maas R, Troost R, Böger RH (2003) Clinical pharmacokinetics of antioxidants and their importance on systemic oxidative stress. *Clin Pharmacocinet* 42: 437-459
61. Jeanes YM, Hall WL, Lodge JK (2005) Comparative (²H)-labelled alpha-tocopherol biokinetics in plasma, lipoproteins, erythrocytes, platelets and lymphocytes in normolipidaemic males. *Br J Nutr* 94: 92-99
62. Gubernator J, Stasiuk M, Kozubek A (1999) Dual effect of alkylresorcinols, natural amphiphilic compounds, upon liposomal permeability. *Biochim Biophys Acta* 1418: 253-260
63. Frank J (2005) Beyond vitamin E supplementation: an alternative strategy to improve vitamin E status. *J Plant Physiol* 162: 834-843
64. Kamal-Eldin A, Pouru A, Eliasson C, Åman P (2001) Alkylresorcinols as antioxidants: hydrogen donation and peroxyl radical-scavenging effects. *J Sci Food Agric* 81: 353-356
65. Linko A-M, Juntunen KS, Mykkänen HM, Aldercreutz H (2005) Whole-grain rye bread consumption by women correlates with plasma alkylresorcinols and increases their concentration compared with low-fiber wheat bread. *J Nutr* 135: 580-583

5-*n*-alkylresorcinols of whole grain cereals and whole grain cereal products as biomarkers of healthy food

Mariola Kulawinek[✉], Arkadiusz Kozubek

Department of Lipids and Liposomes, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, 63/77 Przybyszewskiego St., 51-148 Wrocław, Poland

[✉]e-mail: mariolak@ibmb.uni.wroc.pl

Key words: 5-*n*-alkylresorcinols, rye, wheat, whole-grain diet, biomarker, chronic diseases

ABSTRACT

Epidemiological studies suggest that consumption of whole grain cereals and whole grain cereal products have many beneficial health effects, including reducing risk of diabetes, obesity, coronary heart diseases, stroke and even some cancers. Precise knowledge protective compounds present in cereal grains can be achieved only when specific biomarkers (biological marker, indicator), that could provide estimation of grain cereals absorption and intake, are established and determined. 5-*n*-alkylresorcinols (main fraction of phenolic compounds in cereals), because of their specific occurrence only in bran fraction, obtained in refining of milling fractions process, could be a very good candidate to play the role of biomarker of whole grain intake. They are absorbed by animals and humans, present in human plasma and as metabolites in urine. Because composition of saturated homologues of 5-*n*-alkylresorcinols is different in rye and wheat grains, they could be used as an indicator of the intake of the specific type of cereals and whole grain cereal products.

Rola szlaku JNK w rodzinnych postaciach choroby Parkinsona

STRZĄCZENIE

Choroba Parkinsona (PD) jest jedną z najczęstszych chorób neurodegeneracyjnych człowieka. Większość przypadków wydaje się być wywołana czynnikami środowiskowymi, ale niewielki procent związany jest z mutacjami w genach *DJ-1*, *PARK*, *PINK1*, *NR4A2* i *SNCA*. Pośród sugerowanych mechanizmów prowadzących do neurodegeneracji u chorych z tymi mutacjami wymienia się utratę właściwości przeciwutleniających, toksyczną agregację białek, niewydolność proteosomalnej degradacji białek. Tymczasem coraz więcej wyników wskazuje, że wiele z białek ulegających mutacjom to modulatory przekazywania sygnałów na szlaku, w którym uczestniczy kinaza c-Jun (JNK) i związanego z nią szlaku PI3K/Akt. Szlak JNK związany jest z indukcją apoptozy pod wpływem stresu oksydacyjnego, prawdopodobnego mechanizmu wywołującego sporadyczne postaci choroby Parkinsona. Sekwencja następujących zdarzeń: stres oksydacyjny → szlak JNK → apoptoza, może okazać się wspólnym mechanizmem leżącym u podstaw zarówno rodzinnych, jak i sporadycznych postaci choroby Parkinsona. Niniejsza praca skupia się na roli stresu oksydacyjnego i aktywacji szlaku JNK w dziedzicznych postaciach choroby Parkinsona.

WPROWADZENIE

Choroba Parkinsona (PD) jest drugą co do częstości chorobą neurodegeneracyjną, dotyczącą około 1–3% populacji. Objawy choroby wywołane są zanikiem neuronów istoty czarnej, jednak przyczyny i mechanizmy neurodegeneracji są wciąż niejasne. W licznych opracowaniach dotyczących patogenezy PD zwraca się uwagę na istotną rolę stresu oksydacyjnego. W istocie, neurony dopaminergiczne są szczególnie narażone na stres oksydacyjny, gdyż synteza i metabolizm dopaminy prowadzą do powstania dużej ilości wolnych rodników. Badania mózgow osób chorych na PD potwierdzają objawy stresu oksydacyjnego. Ilość modyfikacji karbonylowych – wskaźnika oksydacji białek, jest dwukrotnie większa u chorych na PD niż w neuronach istoty czarnej osób zdrowych [1]. Poziomy niektórych produktów peroksydacji lipidów i utleniania nukleotydów są odpowiednio 8- i 16-krotnie wyższe u chorych w porównaniu z grupą kontrolną [2,3]. Liczne neurotoksyny wykorzystywane w farmakologicznych modelach PD, takie jak: parakwat, rotenon, hydroksydopamina (6-OHDA) czy MPTP, powodują wzrost ilości reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) i wywołują apoptozę neuronów dopaminergicznych. W procesie tym bierze udział kaskada sygnałowa JNK.

Elementem docelowym kaskady sygnałowej JNK jest białko c-Jun, które pod wpływem fosforylacji ulega dimeryzacji i aktywuje transkrypcję genów kodujących białka proapoptotyczne. Wyniki badań Nishi [4] potwierdzają aktywację c-Jun pod wpływem MPTP. Białkiem aktywującym c-Jun jest kinaza fosforylująca N-końcowy rejon białka c-Jun (JNK). Podanie SP600125 – syntetycznego inhibitora JNK [5], nadekspresja genu kodującego JIP1 – inhibitora JNK [6] i nokaut genu kodującego JNK [7], hamują zwyrodnienie wywołane przez MPTP. Pod wpływem stresu oksydacyjnego JNK aktywowana jest przez MKK4 i MKK7, białka należące do kinaz kinaz aktywowanych mitogenem (MAPKK), te zaś z kolei aktywowane są przez kinazy kinaz kinaz aktywowanych mitogenem (MAPKKK), takie jak ASK1 [6,8-9].

Co ciekawe, parkina, kinaza PINK1, onkogen DJ-1 i alfa-synukleina, białka, w genach których wykryto mutacje wywołujące dziedziczne postaci choroby Parkinsona, okazują się być modulatorami aktywności kaskady sygnałowej JNK (Ryc. 1). Wiele poszlak wskazuje na podobną rolę innego białka związanego z rodziną PD – Nurr1. Dodatkowo, DJ-1 i SNCA mają również właściwości przeciwutleniające. Zatem sekwencja zdarzeń: stres oksydacyjny → szlak sygnałowy JNK → apoptoza, rysuje się jako wspólny mechanizm molekularny dla dziedzicznych i sporadycznych postaci PD.

Marek Jankowski[✉]

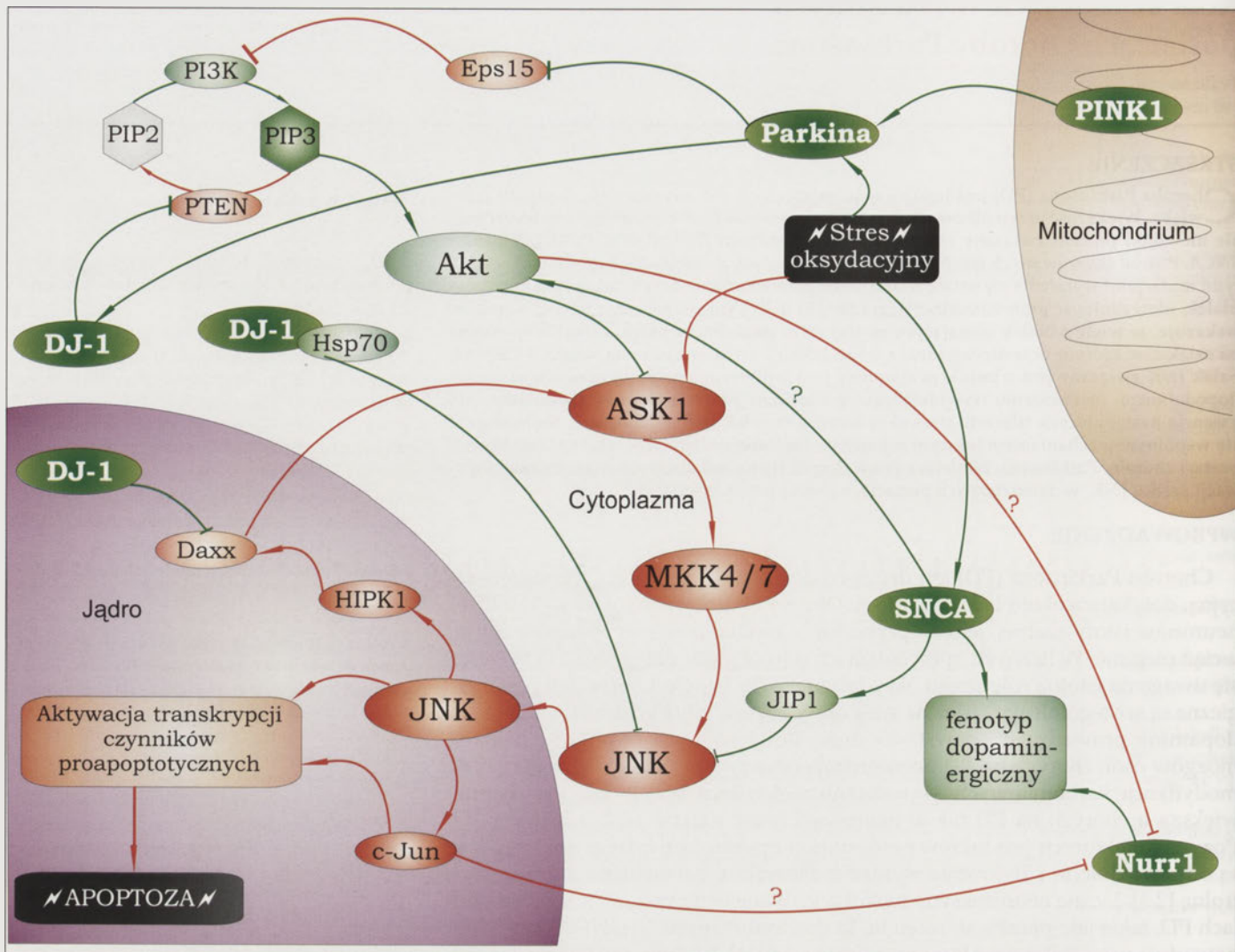
Zakład Genetyki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

[✉]Zakład Genetyki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; tel.: (056) 611 44 76, e-mail: marek.jankowski@mensa.org.pl

Artykuł otrzymano 29 grudnia 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 27 lutego 2007 r.

Słowa kluczowe: alfa-synukleina, parkina, DJ-1, PINK1, Nurr1

Wykaz skrótów: Akt (ang. *Akt kinase or protein kinase B*) – kinaza Akt, inaczej określana kinazą białkową B; ASK1 (ang. *apoptosis signal-regulating kinase-1*) – kinaza 1 regulująca apoptozę; DAT – transporter dopaminy; JNK (ang. *c-Jun N-terminal protein kinase*) – kinaza fosforylująca N-końcowy rejon białka c-Jun; MPTP – 1-metylo 4-fenilo 1,2,3,6-tetrahydropirydyna; PD (ang. *Parkinson's disease*) – choroba Parkinsona; PI3K – 3-kinaza fosfatydoinozytoli; PINK1 (ang. *PTEN induced putative kinase*) – kinaza indukowana przez fosfatazę PTEN; PIP3 (ang. *phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*) – trisfosforan fosfatydoinozytoli; SNCA – gen alfa-synukleiny; VMAT – pęcherzykowy transporter monoamin



Rycina 1. Białka związane z rodzinnymi postaciami choroby Parkinsona. Objasnienia: 1. Strzałki zakończone ostrym grotem oznaczają aktywację białka lub indukcję jego ekspresji; 2. Strzałki zakończone tępym grotem oznaczają hamowanie aktywności białka bądź jego degradację; 3. Linie oznaczone znakiem zapytania oznaczają zależności domniemane.

DJ-1

DJ-1 to małe białko homologiczne do prokariotycznego chaperonu Hsp31. Mutacje DJ-1, wywołujące młodzieńcza formę PD, uniemożliwiają homodimeryzację DJ-1 i prowadzą do przyspieszonej jego degradacji [10]. U osób chorych ze sporadyczną postacią PD obserwuje się utlenione [11], prawdopodobnie nieaktywne, formy tego białka [12]. Z powodu zdolności do autoutleniania wielu badaczy postuluje udział DJ-1 w zmiataniu wolnych rodników. Pogląd ten wydają się potwierdzać wyniki doświadczeń, w których dokonywano nadekspresji [13] lub podawano do istoty czarnej rekombinowany DJ-1 [14], co zmniejszyło wrażliwość neuronów na stres oksydacyjny. Ochronnego działania nie wykazano natomiast, gdy zastosowano DJ-1_{L166P} – zmutowaną formę białka spotykaną w rodzinnej PD [14-15]. Również doświadczenia, w których doprowadzano do wyciszenia ekspresji DJ-1, dowodziły jego ważnej roli w warunkach stresu oksydacyjnego, czyniąc neurony bardziej wrażliwymi na uszkodzenia wywołane obecnością wolnych rodników [15-16].

Jednak, jak słusznie zauważa Yang i wsp. [17], bezpośrednia aktywność DJ-1 jako wymiatacza wolnych rodników jest o 2 rzędy wielkości mniejsza niż katalazy. Jest zatem mało prawdopodobne, by bezpośrednie wymiatanie wolnych rodników było zasadniczym mechanizmem w jaki DJ-1 wywiera ochronny wpływ na neurony w warunkach stresu oksydacyjnego. Z obserwacji tej można wnioskować, iż większe znaczenie *in vivo* ma zdolność DJ-1 do hamowania przekazywania sygnałów na szlaku JNK.

Aktywacja kinazy ASK1, składowej szlaku JNK, jest hamowana pod wpływem fosforylacji przez kinazę białkową B (Akt) [18]. Akt z kolei ulega aktywacji pod wpływem trisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP3). Ilość PIP3 zależy od równowagi między aktywnością kinazy PI3K, przekształcającej PIP2 w PIP3, a aktywnością białka supresorowego PTEN, które działa antagonistycznie do PI3K. PTEN zaś jest negatywnie regulowany przez DJ-1. Wyniki doświadczeń Iwatsubo i wsp. [13] wykazują, że wyciszenie ekspresji DJ-

1 za pomocą siRNA prowadzi do zwiększenia aktywności PTEN i zmniejszonej fosforylacji Akt.

Innym mechanizmem, w którym DJ-1 kontroluje aktywność ASK1, jest hamowanie, zależnej od Daxx, aktywacji ASK1 [19]. Uważa się, że pod wpływem stresu oksydacyjnego białko Daxx transportowane jest z jądra do cytoplazmy, gdzie może wiązać i aktywować ASK1. DJ-1 ma zdolność wiązania i sekwestrowania Daxx w jądrze komórkowym. Zapobiegając translokacji Daxx do cytoplazmy, DJ-1 uniemożliwia aktywację ASK1, a w konsekwencji – JNK.

Istnienia oddziaływań między DJ-1 i Daxx dowodzą wyniki badań Junn i wsp. [19], w których wykorzystano drożdżową technikę dwuhybrydową, pozwalającą na wykrywanie białek tworzących funkcjonalne kompleksy *in vivo*.

Skądinąd wiadomo także, że DJ-1 może hamować proapoptotyczne działanie Daxx pośrednio. Aktywowana JNK fosforyluje i aktywuje kinazę HIPK1 [20], ta zaś, fosforylując Daxx, wpływa na jego powrotny transport do cytoplazmy, gdzie, jak już wspomniano, Daxx aktywuje ASK1 i, w mechanizmie pętli zwrotnej, aktywuje JNK. DJ-1 ma zdolność wiązania HIPK1 *in vitro*, jak i współwystępuje *in vivo*. Wydaje się całkiem prawdopodobne, że DJ-1 wykazuje zdolność do degradacji HIPK1. Nadekspresja dzikiej formy genu *DJ-1* w linii komórkowej H1229 powodowała wzmożoną degradację HIPK1. Zjawiska tego nie obserwowano w doświadczeniach z nadekspresją zmutowanej formy genu *DJ-1*_{C106S}. Mutacja ta dotyczy miejsca domniemanej aktywności proteazowej DJ-1 [21]. Wyniki doświadczeń *in vitro* wskazują, że DJ-1 może działać również „przyczynowo” w warunkach stresu oksydacyjnego – zmniejszając ilość wolnych rodników [14], hamuje przekazywanie sygnału proapoptotycznego w komórce. Zhou i wsp. [16] wykazują, że dzieje się to poprzez aktywację ligazy glutaminianowocysteinowej (GCL), kluczowego enzymu szlaku syntezy glutationu. Dokładny mechanizm, w jakim DJ-1 wpływa na ekspresję GCL, nie jest jednak znany.

PARKINA

Parkina, białko kodowane przez gen *PARKIN*, należy do ligaz ubikwitylowych E3. Do substratów ubikwitylowanych przez to białko należą między innymi: synaptotagmina XI, O-glikozylowana alfa-synukleina, synfilina-1, cyklina E, homolog receptora endoteliny Pael-R i septyna 5. Wykazano, iż wiele z mutacji parkiny powoduje spadek jej aktywności ligazy ubikwitylowej i wiąże się to z wystąpieniem rodzinnej, młodzieńczej postaci choroby. Liczni badacze sugerują, że mutacje parkiny prowadzą do niewydolności systemu ubikwityna-proteosom w PD poprzez stres wywołany gromadzeniem się wadliwie sfałdowanych białek. Z drugiej strony, sam stres oksydacyjny wywołuje identyczny efekt. Wydaje się zatem, że wadliwe działanie systemu ubikwityna-proteosom, spowodowane mutacjami parkiny, może być skutkiem, a nie przyczyną tego procesu.

Stres oksydacyjny wywołuje wzrost ekspresji parkiny [22]. Nadekspresja tego białka w komórkach dopaminergicznych zmniejsza ilość wolnych rodników w komórce [23]. Przeciwnie, wyciszenie parkiny za pomocą siRNA

prowadzi do kumulacji toksycznych pochodnych autoutleniania DOPA- i DA-chinonów [24]. Wzrost ekspresji parkiny jest więc najwyraźniej reakcją obronną. Potwierdzać to może fakt, że polimorfizm T → G sekwencji promotora w pozycji -258 od miejsca startu transkrypcji, warunkujący brak wzrostu ekspresji parkiny w obecności ROS, jest czynnikiem ryzyka wystąpienia sporadycznej formy PD [25,26].

Komórki dopaminergiczne produkujące zmutowane formy parkiny, charakteryzują się obecnością fosforylowanej (aktywnej) formy JNK [23,27]. U *Drosophila* wykazano również aktywację homologa ASK1-dASK1 [27]. Wydaje się, że hamujący wpływ parkiny na przekazanie sygnału na szlaku JNK związany jest z, zależnym od PI3K/Akt, hamowaniem aktywacji. ASK1 jest hamowana przez kinazę PI3K/Akt. Parkina wiąże i ubikwityluje Eps15, białko adaptorowe związane z endocytozą receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), działającego neuroprotektynnie na komórki dopaminergiczne [28]. Wiązanie Eps15 spowodowała internalizację EGFR i przedłuża, indukowaną przez EGF, aktywację PI3K/Akt. Zarówno wyciszenie Eps15 za pomocą siRNA, jak i nadekspresja genu parkiny wiążą się ze zwiększeniem ilości fosforylowanej (aktywowanej) Akt. Niezwykle ciekawym jest fakt, że gen *Eps15* zlokalizowany jest w obrębie locus *PARK10*, związanego z ryzykiem wystąpienia idiopatycznej PD.

Wiadomo, że parkina może wiązać się z chaperonami, takimi jak CHIP i Hsp70 [29]. Podobne oddziaływania wykazano dla DJ-1, innego modulatora PI3K/Akt, związanego z PD [30,31]. Co więcej, DJ-1 i parkina tworzą ze sobą kompleksy białkowe [32]. Jako że w PD związanym z mutacjami parkiny, ilość DJ-1 jest dramatycznie mniejsza, Moore i wsp. [31] sugerują, że parkina poprzez oddziaływanie z DJ-1 wpływa na jego stabilność.

PINK1

Na poziomie morfologicznym nokauty genu *PARKIN* u *Drosophila* charakteryzują się degeneracją neuronów dopaminergicznych oraz pośrednich mięśni lotnych. Zaobserwowano, że w komórkach mutantów dochodzi do obrzmienia mitochondriów, a uderzająco podobny fenotyp wywołuje nokaut genu kinazy *PINK1* – kolejnego genu, którego mutacje wykryto w rodzinnym parkinsonizmie dziedzicznym autosomalnie recesywnie. I tym razem wykazano związek mutacji z aktywacją szlaku JNK [33]. Ekspresja zmutowanych form *PINK1* u *Drosophila* prowadziła do wzrostu ekspresji genu *puc*, który jest jednym z genów docelowych szlaku JNK. Ekspresja zmutowanego genu *hep* – homologa *MKK7* u *Drosophila* wraz ze zmutowanym *PINK1* hamuje apoptozę, ale nie powoduje zmiany fenotypu mitochondriów. Koekspresja zmutowanego *PINK1* i *PARKIN* hamuje apoptozę, przywraca prawidłową morfologię mitochondriów [34] i prawidłowy poziom ATP [33], który w mutacjach *Pink1* jest obniżony [33,35]. Ekspresja genu parkiny poprawia fenotyp mutantów *PINK1*, ale nie odwrotnie, stąd wyłania się wniosek, że parkina działa poniżej *PINK1* w kaskadzie tych białek [33,34]. Pogląd ten potwierdzają wyniki doświadczeń, w których do wyciszenia ekspresji genu *PINK1* użyto siRNA, co wywoływało obniżenie poziomu parkiny [36]. Relacja pomiędzy *PINK1* a DJ-1 jest nieco mniej przejrzysta: Tang i

wsp. [37] wykazali, że ekspresja dzikiej formy *DJ-1* zmniejsza podatność na stres oksydacyjny u mutantów *PINK1*^{p399L} poprzez zwiększanie ilości *PINK1*. Z drugiej jednak strony Yang i wsp. [36] wykazali, że ekspresja *DJ-1* nie wpływa na fenotyp mutantów *PINK1*.

U *Drosophila* zaburzona morfologia mitochondriów i obniżony poziom ATP u osobników z nokautem *PINK1*, zahamowanie apoptozy przy niezmienionej morfologii mitochondriów w ekspresji zmutowanego genu *hep* (analoga *MKK7*) i znacząca poprawa przy koekspresji *buffy* – homologa *Bcl2*, świadczą o tym, że *PINK1*, poza uczestnictwem w szlaku JNK, jest niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów. Analiza sekwencji *PINK1*, wykazała obecność domeny o aktywności kinazy serynowo-treoninowej i N-końcowego motywu lokalizacji mitochondrialnej. Rzeczywiście, wyniki badań subkomórkowej lokalizacji *PINK1* wykazały, że jest to integralne białko błony wewnętrznej mitochondriów [38]. Chociaż do tej pory nie zidentyfikowano żadnego substratu, jest niemal pewne, że domniemana aktywność kinazowa ma kluczowe znaczenie w funkcjonowaniu *PINK1*. Inaktywacja centrum aktywnego kinazy hamuje antyapoptotyczny wpływ nadekspresji genu kodującego *PINK1* [39]. Większość znanych mutacji *PINK1*, związanych z PD, charakteryzuje się obniżoną aktywnością kinazową [40].

NURR1

Nurr1 jest receptorem jądrowym z podrodziny receptorów sierocych NR4A, którego dwie mutacje NR4A2^{T291DEL} oraz NR4A2^{245T>G} wiążą się z rodzinną PD o klasycznym fenotypie [41]. Sugeruje się też wpływ polimorfizmu intronu 6 7048insG [42] i polimorfizmu regionu promotorowego +30C/G [43] na zwiększone ryzyko wystąpienia sporadycznej PD. Mutacje te, jak i polimorfizmy sekwencji genu, wiążą się z obniżoną ekspresją *Nurr1*.

Nurr1 jest, obok *Pitx3* i *Lmx1b*, najważniejszym regulatorem różnicowania komórek dopaminergicznych [44]. Kontroluje m.in. ekspresję genów: dekarboksylazy L-aminokwasów aromatycznych, transportera dopaminy (DAT) oraz pęcherzykowego transportera monoamin (VMAT-2) – białek niezbędnych do utrzymania fenotypu dopaminergicznego [45].

Wydaje się, że *Nurr1* nie tylko uczestniczy w różnicowaniu komórek dopaminergicznych, ale także działa antyapoptotycznie. Obniżenie ekspresji *Nurr1* za pomocą siRNA prowadzi do zwiększonej apoptozy w wielu liniach komórkowych [46]. U heterozygotycznych myszy *Nurr1*^{+/-} zaobserwowano w neuronach dopaminergicznych indukcję kaspazy 3, obniżoną ekspresję *Bcl-2* oraz spadek odporności na MPTP [47]. Przeciwnie, nadekspresja *Nurr1* zwiększa odporność neuronów dopaminergicznych na MPTP [48].

W modelu sporadycznego parkinsonizmu, indukowanego przez MPTP u makaka, dochodzi do obniżenia ekspresji *Nurr1* [49]. Skądinąd wiadomo, że w toksyczności MPTP uczestniczy szlak JNK. Bliski homolog *Nurr1* – białko *Nurr77*, jest substratem zarówno Akt, jak i JNK. Fosforylacja przez Akt *Nurr77* w pozycji Ser 350, w domenie wiążącej

DNA uniemożliwia wiązanie do DNA i, w konsekwencji, aktywację transkrypcji [50]. Wspomniana domena *Nurr77* jest w 95% identyczna z domeną wiążącą DNA *Nurr1* [51], z zachowaną krytyczną seryną Ser-350. Jeśli rzeczywiście *Nurr1* byłby fosforylowany przez Akt, tłumaczyłoby to wpływ polimorfizmów *Nurr1* na ryzyko wystąpienia sporadycznej PD.

ALFA-SYNUKLEINA

Alfa-synukleina jest małym białkiem, którego gen ulega ekspresji na wysokim poziomie w neuronach mózgu. Jego N-końcowy, lipofilny fragment jest zaangażowany w wiązanie się z błoną synaptyczną i błonami pęcherzyków synaptycznych. Alfa-synukleina wydaje się spełniać szereg funkcji, jednak jej rola w komórce nerwowej nie jest do końca ustalona. Sugeruje się, że jest ona zaangażowana w modulację transportu dopaminy, regulując aktywność VMAT i DAT [52-54], synfiliny-1 oraz metabolizm lipidów poprzez oddziaływanie z fosfolipazą PLD2 i białkiem CSP-alfa pęcherzyków synaptycznych [55]. Ostatnio przypisuje się jej także funkcję przeciwutleniającą [56], chaperonową [57] i modulatorową JNK. Również gamma- i beta-synukleina – bliskie homologii alfa-synukleiny, zdają się pełnić taką funkcję w komórce [58]. Beta-synukleina jest regulatorem aktywności Akt, który, poprzez hamowanie aktywacji ASK1, może wpływać na szlak sygnałowy JNK [59]. Również gamma-synukleina wydaje się być negatywnym regulatorem szlaku JNK [60]. Biorąc pod uwagę homologię synuklein oraz ich zaangażowanie w regulowanie szlaku JNK, można pokusić się o przypuszczenie, że również alfa-synukleina wpływa na szlak JNK. Wyniki badań Hashimoto i wsp. [61] oraz Seo i wsp. [62] popierają tę hipotezę.

Liczne doświadczenia wskazują na wzrost ekspresji alfa-synukleiny pod wpływem stresu oksydacyjnego [63,64]. Quilty i wsp. [63] obserwowali wzrost poziomu alfa-synukleiny tylko w części komórek, ale właśnie ta subpopulacja była bardziej odporna na działanie stresu oksydacyjnego, a w konsekwencji – na indukcję procesu apoptozy. Również *in vivo* synukleina ma działanie ochronne na neurony dopaminergiczne [65]. Podwyższony poziom alfa-synukleiny zwiększa ekspresję *JIP1/IB-1*, zmniejsza aktywację JNK i c-Jun oraz hamuje apoptozę [63]. Obserwuje się również wyższą aktywność PI3K i Akt, co również wpływa hamująco na JNK [62]. Łącznie rezultaty te sugerują, że podwyższony poziom alfa-synukleiny ma działanie ochronne na neurony w warunkach stresu oksydacyjnego. Z drugiej jednak strony, inni autorzy donoszą o apoptozie i autofagii wywołanych nadekspresją *alfa-synukleiny* [66]. W zgodzie z tymi wynikami wyciszenie ekspresji genu kodującego alfa-synukleinę działa antyapoptotycznie w warunkach stresu oksydacyjnego [67]. Znane są także przypadki duplikacji [68] i triplikacji [69] genu *SNACA*, wywołujące rodzinną postać PD. Także polimorfizm promotora genu *SNACA*, prowadzący do zwiększonej produkcji alfa-synukleiny, wydaje się być czynnikiem ryzyka sporadycznej postaci PD [70].

PODSUMOWANIE

Choroba Parkinsona jest zaburzeniem neurodegeneracyjnym, charakteryzującym się ogromną utratą neuronów

dopaminergicznych. Jako główny czynnik przyczyniający się do zaniku neuronów dopaminergicznych w sporadycznej postaci choroby Parkinsona, uznaje się stres oksydacyjny. Tymczasem, w przypadkach dziedzicznych postaci PD główną rolę przypisuje się toksycznej agregacji zmutowanej alfa-synukleiny, niewydolności systemu ubikwityna-proteosom, związanej z mutacjami parkiny i utracie właściwości przeciwutleniających, związanych z mutacjami DJ-1. Ostatnio coraz więcej danych wskazuje na możliwość istnienia mechanizmu molekularnego wspólnego zarówno dla sporadycznej, jak i rodzinnych postaci PD, związanych z mutacjami w genach: *SNCA*, *DJ-1*, *PARKIN* i *PINK-1*. Mutacje w tych genach wydają się wiązać z nadmierną aktywacją szlaku sygnalizacyjnego JNK w odpowiedzi na stres oksydacyjny i, w konsekwencji, indukcją apoptozy. Na podstawie tych danych łatwo można wyobrazić sobie mechanistyczny model choroby Parkinsona, w którym stres oksydacyjny, kaskada sygnałowa JNK i indukcja apoptozy są kluczowymi elementami.

PIŚMIENNICTWO

- Floor E, Wetzel MG (1998) Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J Neurochem* 70: 268–275
- Yorakita A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2696–2701
- Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG, Montine TJ (1999) Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am J Pathol* 154: 1423–1429
- Nishi K (1997) Expression of c-Jun in dopaminergic neurons of the substantia nigra in MPTP-treated mice. *Brain Res* 771: 133–141
- Wang W, Ma C, Mao Z, Li M (2004) JNK inhibition as a strategy in treating Parkinson's disease. *Drug News Perspect* 17: 646–654
- Xia XG, Harding T, Weller M, Bienneman A, Uney JB, Schulz JB (2001) Gene transfer of the JNK interacting protein-1 protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10433–10438
- Hunot S, Vila M, Teismann P, Davis RJ, Hirsch EC, Przedborski S, Rakic P, Flavell RA (2004) JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 665–670
- Saporito MS, Thomas BA, Scott RW (2000) MPTP activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons *in vivo*. *J Neurochem* 75: 1200–1208
- Ouyang M, Shen X (2006) Critical role of ASK1 in the 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 97: 234–244
- Macedo MG, Anar B, Bronner IF, Canella M, Squitieri F, Bonifati V, Hoogveen A, Heutnik P, Rizzu P (2003) The DJ-1L166P mutant protein associated with early onset Parkinson's disease is unstable and forms higher-order protein complexes. *Hum Mol Genet* 12: 2807–2816
- Choi J, Sullards MC, Olzmann JA, Rees HD, Wientraub ST, Bostwick DE, Gearing M, Levey AI, Chin L, Li L (2006) Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson's and Alzheimer diseases. *J Biol Chem* 281: 10816–10824
- Zhou W, Zhu M, Wilson MA, Petsko GA, Fink AL (2006) The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward alpha synuclein. *J Mol Biol* 356: 1036–1048
- Iwatsubo T, Ito G, Takatori S, Hanno Y, Kuwahara T (2005) Pathogenesis of Parkinson's disease: implications from familial Parkinson's disease. *Rinsho Shinkeigaku* 45: 899–901
- Inden M, Taira T, Kitamura Y, Yanagida T, Tsuchiya D, Takata K, Yanagisawa D, Nishimura K, Taniguchi T, Kiso Y, Yoshimoto K, Agatsuma T, Koide-Yoshida S, Iguchi-Ariga SM, Shimohama S, Ariga H (2006) PARK7 DJ-1 protects against degeneration of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease rat model. *Neurobiol Dis* 24: 144–158
- Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, Ariga H, Mizusawa H (2003) Down-regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 1342–1348
- Zhou W, Freed CR (2005) DJ-1 upregulates glutathione synthesis during oxidative stress and inhibits A53T alpha-synuclein toxicity. *J Biol Chem* 280: 43150–43158
- Yang Y, Gehrke S, Haque ME, Imai Y, Kosek J, Yang L, Beal MF, Nishimura I, Wakamatsu K, Ito S, Takahashi R, Lu B (2005) Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13670–13675
- Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV (2001) Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 21: 893–901
- Junn E, Taniguchi H, Jeong BS, Zhao X, Ichijo H, Mouradian MM (2005) Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9691–9696
- Song JJ, Lee YJ (2003) Role of the ASK1-SEK1-JNK1-HIPK1 signal in Daxx trafficking and ASK1 oligomerization. *J Biol Chem* 278: 47245–47252
- Sekito A, Koide-Yoshida S, Niki T, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H (2006) DJ-1 interacts with HIPK1 and affects H2O2-induced cell death. *Free Radic Res* 40: 155–165
- Yang YX, Muqit MM, Latchman DS (2006) Induction of Parkin expression in the presence of oxidative stress. *Eur J Neurosci* 24: 1366–1372
- Jiang H, Jiunghui Y, Zhao J, Feng J (2004) Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. *Hum Mol Genet* 13: 1745–1754
- Machida Y, Chiba T, Takayanagi A, Tanaka Y, Asanuma M, Ogawa N, Koyama A, Tanaka K, Mizuno Y, Hattori N (2005) Common anti-apoptotic roles of parkin and alpha-synuclein in human dopaminergic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 233–240
- West AB, Maraganore D, Crook J, Lesnick T, Lockhart PJ, Wilkes KM, Kapatos G, Hardy JA, Farrer MJ (2002) Functional association of the parkin gene promoter with idiopathic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 22: 2787–2792
- Tan EK, Puong KY, Chan KY, Yew K, Fook-Chong S, Shen H, Ng PW, Woo J, Yuen Y, Pavanani R, Wong MC, Puvan K, Zhao Y (2005) Impaired transcriptional upregulation of Parkin promoter variant under oxidative stress and proteasomal inhibition: clinical association. *Hum Genet* 118: 484–488
- Cha GH, Kim S, Park J, Lee E, Kim M, Lee SB, Kim JM, Chung J, Cho KS (2005) Parkin negatively regulates JNK pathway in the dopaminergic neurons of Drosophila. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10345–10350
- Iwakura Y, Piao YS, Mizuno M, Takei N, Kakita A, Takahashi H, Nawa H (2005) Influences of dopaminergic lesion on epidermal growth factor-ErbB signals in Parkinson's disease and its model: neurotrophic implication in nigrostriatal neurons. *J Neurochem* 93: 974–983
- Imai Y, Soda M, Hatakeyama S, Agaki T, Hashikawa T, Nakayama KI, Takahashi R (2002) CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 10: 55–67
- Li HM, Niki T, Taira T, Iguchi-Arigo SMM, Ariga H (2005) Association of DJ-1 with chaperones and enhanced association and colocalization with mitochondrial Hsp70 by oxidative stress. *Free Radic Res* 39: 1091–1099
- Moore DJ, Zhang L, Troncoso J, Lee MK, Hattori N, Mizuno Y, Dawson TM, Dawson VL (2005) Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet* 14: 71–84

32. Baulac S, LaVoie MJ, Strahle J, Schlossmacher MG, Xia W (2004) Dimerization of Parkinson's disease-causing DJ-1 and formation of high molecular weight complexes in human brain. *Mol Cell Neurosci* 27: 236-246
33. Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, Bae E, Kim J, Shong M, Kim JM, Chung J (2006) Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441: 1157-1161
34. Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, Yoo SJ, Hay BA, Guo M (2005) *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441: 1162-1166
35. Wang D, Qian L, Liu J, Neckamayer WS, Oldham S, Xia K, Wang J, Bodmer R, Zhang Z (2006) Antioxidants protect PINK1-dependent dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 13520-13525
36. Yang Y, Gehrke, Imai Y, Huang Z, Ouyang Y, Wang JW, Yang L, Beal MF, Vogel H, Lu B (2006) Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 10793-10798
37. Tang B, Xiong H, Sun P, Zhang Y, Wang D, Hu Z, Zhu Z, Ma H, Pan Q, Xia JH, Xia K, Zhang Z (2006) Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 15: 1816-1825
38. Gandhi S, Muqit MM, Stanyer L, Healy DG, Abou-Sleiman PM, Hargreaves I, Heales S, Ganguly M, Parsons L, Lees AJ, Latchman DS, Holton JL, Wood NW, Revesz T (2006) PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain* 129: 1720-1731
39. Petit A, Karawai T, Paitel E, Sanjo E, Laj M, Scheid M, Chen F, Gu Y, Hasegawa H, Salehi-Rad S, Wang L, Rogaeva E, Fraser P, Robinson B, St George-Hyslop P, Tandon A (2005) Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *J Biol Chem* 280: 34025-34032
40. Silvestri L, Caputo V, Bellacchio E, Atorino L, Dallapiccola B, Valente EM, Casari G (2005) Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum Mol Genet* 14: 3477-3492
41. Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG, Vassilatis DK (2003) Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet* 33: 85-89
42. Xu PY, Liang R, Jankovic J, Hunter C, Zeng YX, Ashizawa T, Lai D, Le WD (2002) Association of homozygous 7048G7049 variant in the intron six of Nurr1 gene with Parkinson's disease. *Neurology* 58: 881-884
43. Theuns J, Pals P, Rademakers R, Van den Broeck M, Corsmit E, Venekens K, Cruts M, Cras P, Van Broeckhoven C (2004) A novel NR4A2 promoter variation associated with Parkinson's disease alters gene expression. *Book of Abstracts, 9th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, 17-22 July 2004, Philadelphia, USA*
44. Martinat C, Bacci JJ, Leete T, Kim J, Vanti WB, Newman AH, Cha JH, Gether U, Wang H, Abeliovich A (2006) Cooperative transcription activation by Nurr1 and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2874-2879
45. Smits SM, Ponnio T, Conneely OM, Burbach JP, Smidt MP (2003) Involvement of Nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 18: 1731-1738
46. Ke N, Claassen G, Yu DH, Albers A, Fan W, Tan P, Grifman M, Hu X, Defife K, Nguy V, Meyhack B, Brachat A, Wong-Staal F, Li QX (2004) Nuclear hormone receptor NR4A2 is involved in cell transformation and apoptosis. *Cancer Res* 64: 8208-8212
47. Imam SZ, Jankovic J, Ali SF, Skinner JT, Xie W, Conneely OM, Le WD (2005) Nitric oxide mediates increased susceptibility to dopaminergic damage in Nurr1 heterozygous mice. *FASEB J* 19: 1441-1450
48. Lee MA, Lee HS, Lee HS, Cho KG, Jin BK, Sohn S, Lee YS, Ichinose H, Kim SU (2002) Overexpression of midbrain-specific transcription factor Nurr1 modifies susceptibility of mouse neural stem cells to neurotoxins. *Neurosci Lett* 333: 74-78
49. Bassiliana F, Mace N, Li Q, Stutzmann JM, Gross CE, Pradier L, Benavides J, Menager J, Bezard E (2005) Unraveling substantia nigra sequential gene expression in a progressive MPTP-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 20: 93-103
50. Pekarsky Y, Hallas C, Palamarchuk A, Koval A, Bullrich F, Hirata Y, Bichi R, Letofsky J, Croce CM (2001) Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3690-3694
51. Martinez-Gonzales J, Badimon L (2005) The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc Res* 65: 609-618
52. Drolet RE, Behrouz B, Lookingland KJ, Goudreau JL (2004) Mice lacking alpha-synuclein have an attenuated loss of striatal dopamine following prolonged chronic MPTP administration. *Neurotoxicology* 25: 761-769
53. Lee FJ, Liu F, Pristupa ZB, Niznik HB (2001) Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J* 15: 916-926
54. Wersinger C, Sidhu A (2003) Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. *Neurosci Lett* 340: 189-192
55. Chandra S, Gallardo G, Fernandez-Chacon R, Schluter OM, Sudhof TC (2005) Alpha-synuclein cooperates with CSPAalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123: 383-396
56. Zhu M, Qin ZJ, Hu D, Munishkina LA, Fink AL (2006) Alpha-synuclein can function as an antioxidant preventing oxidation of unsaturated lipid in vesicles. *Biochemistry* 45: 8135-8142
57. Ahn M, Kim S, Kang M, Ryu Y, Kim TD (2006) Chaperone-like activities of alpha-synuclein: alpha-synuclein assists enzyme activities of esterases. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 1142-1149
58. Lee D, Paik SR, Choi KY (2004) Beta-synuclein exhibits chaperone activity more efficiently than alpha-synuclein. *FEBS Lett* 576: 256-260
59. Hashimoto M, Bar-On P, Ho G, Takenouchi T, Rockenstein E, Crews L, Masliah E (2004) Beta-synuclein regulates Akt activity in neuronal cells. A possible mechanism for neuroprotection in Parkinson's disease. *J Biol Chem* 279: 23622-23629
60. Pan ZZ, Bruening W, Giasson BI, Lee VM, Godwin AK (2002) Gamma-synuclein promotes cancer cell survival and inhibits stress- and chemotherapy drug-induced apoptosis by modulating MAPK pathways. *J Biol Chem* 277: 35050-35060
61. Hashimoto M, Hsu LJ, Rockenstein E, Takenouchi T, Mallory M, Masliah E (2002) alpha-Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *J Biol Chem* 277: 11465-11472
62. Seo JH, Rah JC, Choi SH, Shin JK, Min K, Kim HS, Park CH, Kim S, Kim EM, Lee SH, Lee S, Suh SW, Suh YH (2002) Alpha-synuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PI3/Akt kinase pathway. *FASEB J* 16: 1826-1828
63. Quilty MC, King AE, Gai WP, Pountney DL, West AK, Vickers JC, Dickson TC (2006) Alpha-synuclein is upregulated in neurones in response to chronic oxidative stress and is associated with neuroprotection. *Exp Neurol* 199: 249-256
64. Gomez-Santos C, Ferrer I, Reiriz J, Vinals F, Barrachina M, Ambrosio S (2002) MPP+ increases alpha-synuclein expression and ERK/MAP-kinase phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res* 935: 32-39
65. Choi HS, Lee SH, Kim SY, An JJ, Hwang SI, Kim DW, Yoo KY, Won MH, Kang TC, Kwon HJ, Kang JH, Cho SW, Kwon OS, Choi JH, Park J, Eum WS, Choi SY (2006) Transduced Tat-alpha-synuclein protects against oxidative stress in vitro and in vivo. *J Biochem Mol Biol* 39: 253-262
66. Mochizuki H, Yamada M, Mizuno Y (2006) Alpha-synuclein overexpression model. *J Neural Transm (Suppl)* 70: 281-284
67. Hayashita-Kinoh H, Yamada M, Yokota T, Mizuno Y, Mochizuki H (2006) Down-regulation of alpha-synuclein expression can rescue dopaminergic cells from cell death in the substantia nigra of Parkinson's disease rat model. *Biochem Biophys Res Commun* 341:1088-1095

68. Ibanez P, Bonnet AM, Debarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Durr A, Brice A (2004) Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 364: 1169-1171
69. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003) Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302: 841
70. Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Kruger R, Rocca WA, Schneider NK, Lesnick TG, Lincoln SJ, Hulihan MM, Aasly JO, Ashizawa T, Chartier-Harlin MC, Checkoway H, Ferrarese C, Hadjigeorgiou G, Hattori N, Kawakami H, Lambert JC, Lynch T, Mellick GD, Papapetropoulos S, Parsian A, Quattrone A, Riess O, Tan EK, Van Broeckhoven C, Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium (2006) Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 296: 661-670

The role of JNK pathway in familial Parkinson's disease

Marek Jankowski 

Department of Genetics, Institute for General & Molecular Biology, Nicolaus Copernicus University, 9 Gagarina St., 87-100 Torun, Poland

e-mail: marek.jankowski@mensa.org.pl

Key words: alpha-synuclein, parkin, PINK1, DJ-1, Nurr1

ABSTRACT

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder characterized by a dramatic loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra. Among the many pathogenic mechanisms thought to contribute to the demise of these cells in sporadic cases of PD, oxidative stress has taken center stage due to extensive experimental evidence showing that dopamine- or MPTP-derived reactive oxygen species and oxidized dopamine metabolites may trigger toxicity through mitochondrial inhibition or deleterious modifications of biomolecules. In familial forms of PD, however, the involvement of toxic protein aggregation (synuclein), impairment of ubiquitin-proteasome system (parkin) and loss of antioxidative properties (DJ-1) has gained attention. Recently, JNK pathway has come to light that could link malfunction of mutated DJ-1, parkin, PINK1 and alpha-synuclein to the oxidative stress-triggered apoptosis, finally ascribing a common pathogenic mechanism to both the sporadic and familial forms of PD.

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 zwzięłość 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 odautorów, Autorzy otrzymują drogą elektroniczną opinię recenzentów i proszeni są o przygotowanie poprawionej wersji manuskryptu i odesłanie go do Redakcji w ciągu 8 tygodni. Ostateczną decyzję o przyjęciu pracy podejmuje Redaktor Naczelny w ciągu 2 tygodni od otrzymania poprawionej wersji manuskryptu.

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

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

WSKAZÓWKI SZCZEGÓŁOWE:

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

PRZYGOTOWANIE MANUSKRYPTU:

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

ORGANIZACJA MANUSKRYPTU:

Wskazany jest podział artykułu na nienumerowane rozdziały i podrozdziały.

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

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

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

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

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

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

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

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

W przypadkach uzasadnionych, np. brakiem odpowiedniego oprogramowania, prosimy o przysyłanie pracy na dyskietce lub płycie CD; zabezpieczonej przed uszkodzeniem w czasie transportu, na adres:

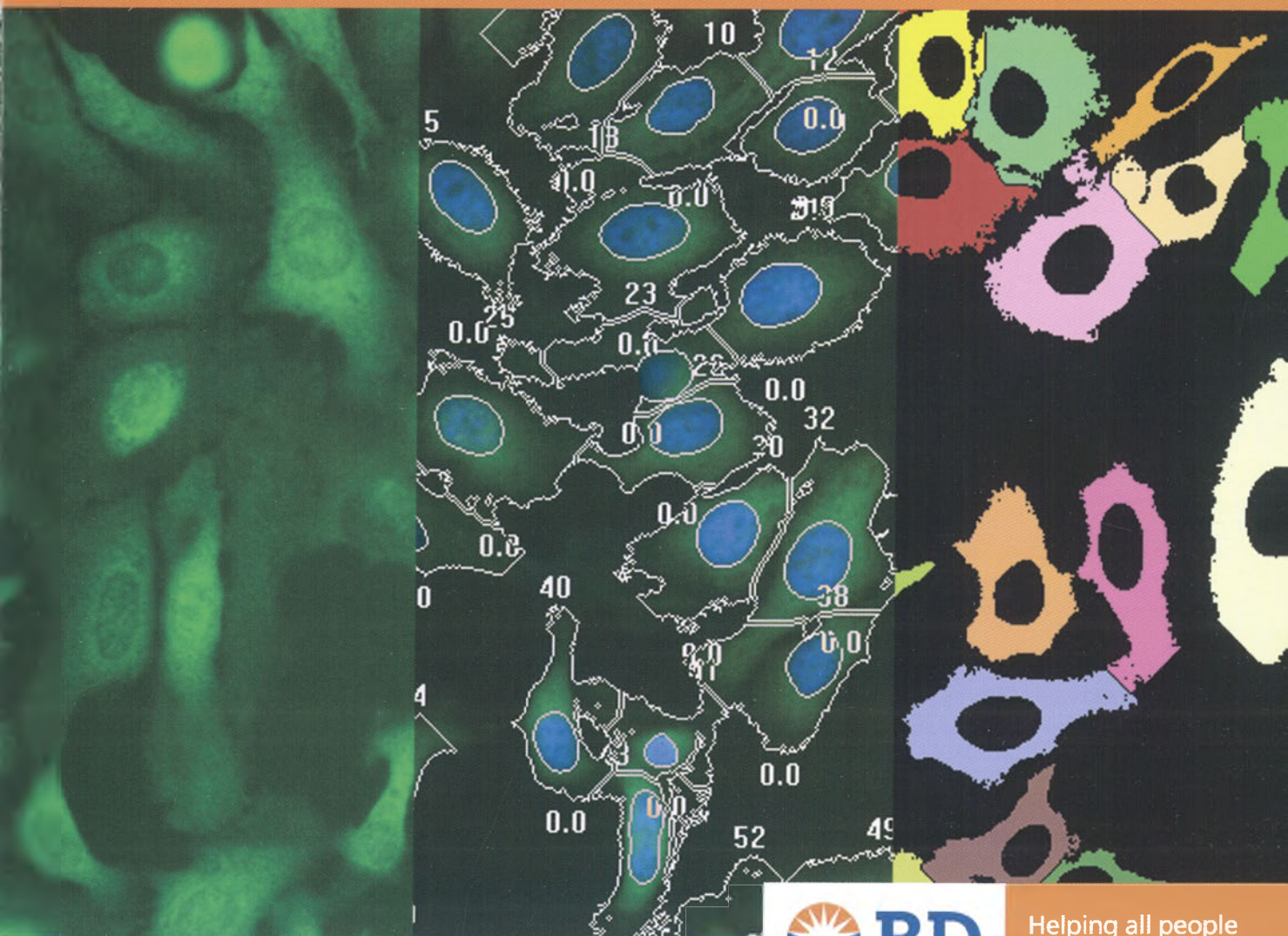
Sławomir Pikula
redaktor naczelny kwartalnika „Postępy Biochemii”
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Oplata za druk: Zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, od 1 stycznia 2006 roku, Towarzystwo pobiera od Autorów opłatę, pokrywającą częściowo koszt druku artykułu. Oplata za wydrukowanie jednej strony artykułu wynosi 150 zł. Szczegółowe informacje zamieściliśmy pod adresem:

www.postepybiochemii.pl/oplata.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.

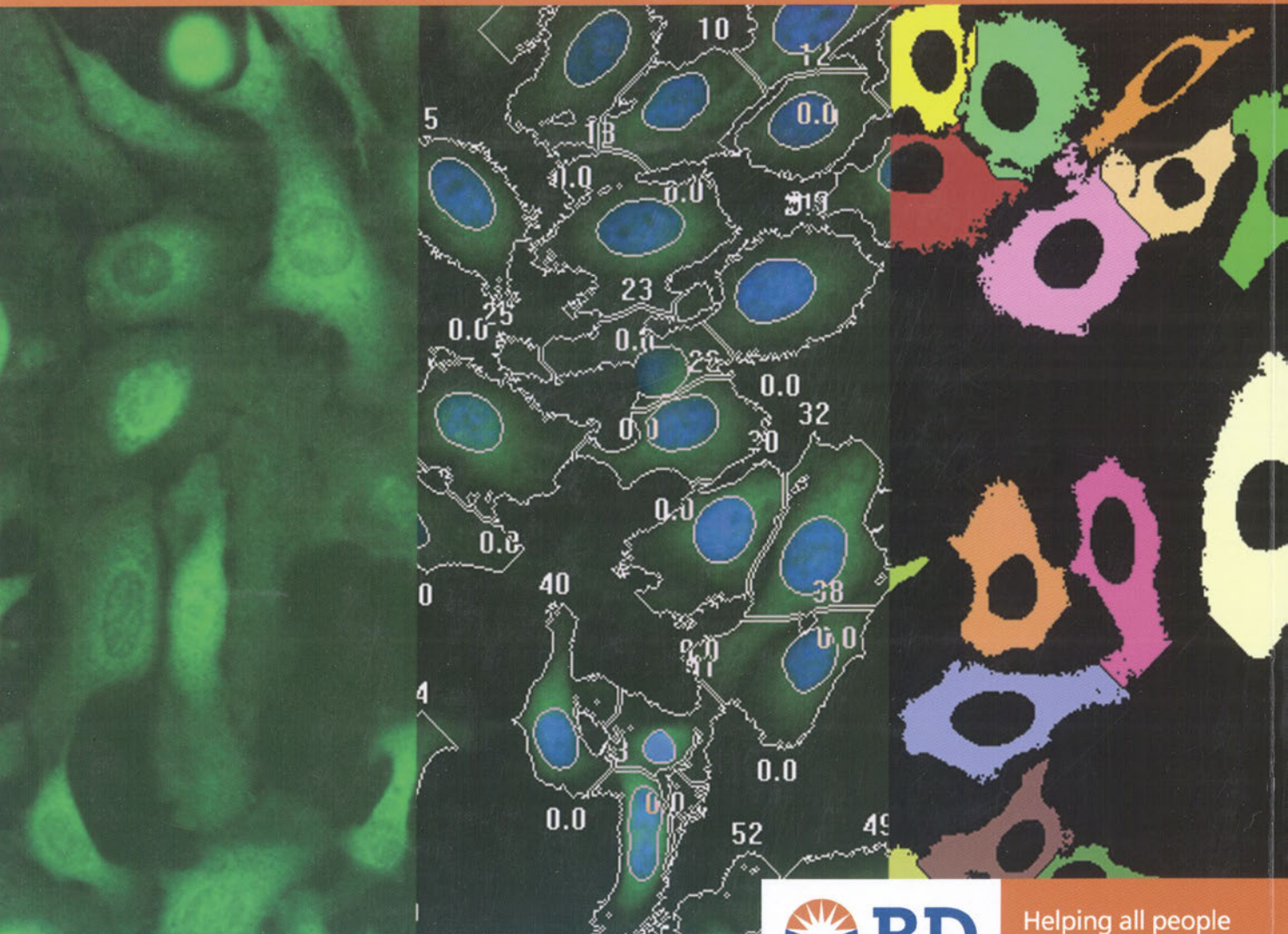
Skontaktuj się z nami aby dowiedzieć się więcej o optymalizacji oznaczeń!

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

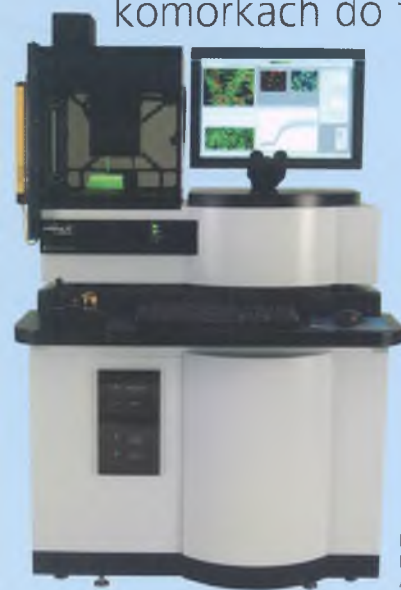
Badania Żywych Komórek Za Pomocą Automatycznego Obrazowania Konfokalnego



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
- Pomiar 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>