

# POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
WARSZAWA 2006  
TOM 52  
NUMER 1

Rola polo-kinaz w regulacji cyklu komórkowego

Replikacja DNA bakteriofaga  $\lambda$   
Koniugaty transferyny w walce  
z nowotworami



PL ISSN 0032-5422  
Indeksowane w Medline /PubMed  
[www.postepybiochemii.pl](http://www.postepybiochemii.pl)

100-lecie urodzin  
Pani Profesor Stelli Niemierko  
<http://rcin.org.pl>

# KONKURS NA NAJLEPSZĄ PRACĘ DOKTORSKĄ Z BIOCHEMII W 2005 ROKU

Polskie Towarzystwo Biochemiczne i firma Merck Sp. z o.o. organizuje konkurs na najlepszą pracę doktorską z biochemii wykonaną w polskiej instytucji naukowej. Warunkiem uczestnictwa jest przyznanie autorowi pracy tytułu doktora przez właściwą radę naukową lub radę wydziału w 2005 roku. Nagroda obejmuje premię pieniężną dla autora w wysokości 4 000 zł, ufundowaną przez firmę Merck, oraz opublikowanie też doktoratu na łamach kwartalnika „Postępy Biochemii”. Nagrodę przyznaje Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w porozumieniu w firmą Merck.

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

Zgłoszenia w formie listu przewodniego z dołączonym jednym egzemplarzem pracy doktorskiej należy przysyłać pocztą w **nieprzekraczalnym terminie do 30 kwietnia 2006 roku (decyduje data stempla pocztowego)** z dopiskiem „Doktoraty 2005”, na adres:

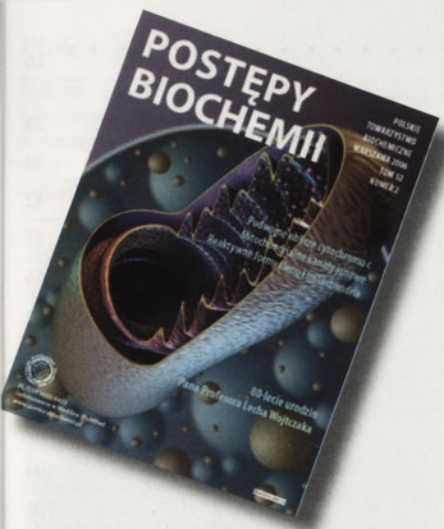
**profesor Sławomir Pikuła**  
**Sekretarz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego**  
**Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego**  
**ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa**

Rozstrzygnięcie konkursu nastąpi do 31 sierpnia 2006 roku, a uroczyste wręczenie Nagrody odbędzie się na Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Białymstoku we wrześniu 2006 roku.

Patronat medialny nad konkursem sprawuje redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”. Pytania dotyczące konkursu można uzyskać kierując je pod następujący adres poczty elektronicznej: [s.pikula@nencki.gov.pl](mailto:s.pikula@nencki.gov.pl).







## W NASTĘPNYM NUMERZE:

TEMAT NUMERU  
- MITOCHONDRIA

**Podwójne oblicze cytochromu c**  
Lech Wojtczak

**Kanał VDAC jako regulator  
funkcji mitochondriów**  
Hanna Kmita, Olgierd Stobienia

**Mitochondrialne kanały jonowe**  
Jolanta Skalska, Grażyna Dębska-  
Vielhaber, Marta Głąb, Bogusz Kula-  
wiak, Dominika Malińska, Piotr Bed-  
narczyk, Krzysztof Dołowy, Adam  
Szewczyk

**Rola mitochondriów  
w wytwarzaniu i usuwaniu  
reaktywnych form tlenu - związek  
z przesyłaniem sygnałów i  
programowaną śmiercią komórki**  
Małgorzata Czarna,  
Wiesława Jarmuszkiewicz

## Rysunek na okładce:

*Drosophila melanogaster* - Eye of Science/  
Science Photo (Library) available at <http://www.nature.com/genomics/papers/drosophila.html> in relation to the article entitled „Genome sequencing: A view of Mount Drosophila” by Jonathan Hodgkin (Nature 404, 442-443, 30 March 2000) with permission from Nature (<http://www.nature.com/>).

## MAPA POLSKIEJ BIOCHEMII

**Instytut Biochemii Medycznej Collegium Medicum UJ w Krakowie** 1

**100-LECIE URODZIN PANI PROFESOR STELLI NIEMIERKO** 4

## O TYM SIĘ MÓWI

**Biochemia to podstawa współczesnej biotechnologii** 7

## WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

**Dział krajowy** 10

**Profesor Maciej Wiewiórowski - wspomnienie** 13

## NASI ZA GRANICĄ

**Tripeptydylo-peptydaza I - występowanie,  
biogeneza i mechanizmy aktywacji** 16

Adam A. Gołąbek

## ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

**Rola polo-kinaz(y) w regulacji i koordynacji cyklu komórkowego  
- mechanizm translokacji i tworzenia kompleksów białkowych** 24

Janina Kaczanowska, Dominika Piwońska, Andrzej Kaczanowski

**Białka 14-3-3 - rola w regulacji biosyntezy melatoniny** 35

Jolanta Rosiak, Jolanta Barbara Zawilska

**Replikacja DNA bakteriofaga  $\lambda$  - nowe odkrycia dokonane  
przy użyciu starego modelu badawczego** 42

Grzegorz Węgrzyn, Alicja Węgrzyn

**Udział techniki warunkowej inaktywacji genów opartej na systemie  
Cre-loxP w postępie wiedzy na temat roli receptorów Notch** 49

Katarzyna Sitnik, Joanna Cichy

**Rola czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B w przewlekłych  
wirusowych zapaleniach wątroby typu B i C** 56

Iwona Mozer-Lisewska, Mariusz Kaczmarek, Jan Żeromski

**Struktura i funkcja regionów niekodujących  
RNA wirusa zapalenia wątroby typu C** 62

Mariola Dutkiewicz, Agata Świątkowska, Jerzy Ciesiołka

**Koniugaty transferyny - nadzieja w walce z nowotworami** 72

Dorota Łubgan, Agnieszka Marczak, Luitpold Distel, Zofia Jóźwiak

**Stafylokinaza - selektywny aktywator plazminogenu** 80

Elżbieta Rozpończyk, Janusz Szemraj,  
Mariusz Malinowski, Jolanta Rozpończyk

**Odpowiedź ścisła - mechanizm adaptacyjnej  
odpowiedzi bakterii na warunki stresowe** 87

Grażyna Dąbrowska, Justyna Prusińska, Anna Goc

**Roślinny mechanizm adaptacyjnej odpowiedzi na warunki  
stresowe homologiczny do odpowiedzi ścisłej bakterii** 94

Grażyna Dąbrowska, Justyna Prusińska, Anna Goc

**Molekularne mechanizmy odpowiedzi roślin na niedotlenienie** 101

Małgorzata Garnczarska

## ADVANCES IN BIOCHEMISTRY VOL. 52, NO. 1, 2006

Faculty of Medical Biochemistry Collegium Medicum Jagiellonian University in Cracow	1
Biochemistry as a background of modern biotechnology	7
Events/Opinions/Comments	10
<b>REVIEWS</b>	
Tripeptidyl-peptidase I – distribution, biogenesis, and mechanisms of activation	16
An involvement of polokinases in control of progress of the cell-cycle - the mechanism of transient translocation and formation of an activated protein-protein complexes during mitosis	24
14-3-3 Proteins – a role in the regulation of melatonin biosynthesis	35
Bacteriophage $\lambda$ DNA replication – new discoveries made using an old experimental model	42
Role of Cre-loxP-mediated conditional gene targeting in understanding the function of Notch receptors	49
The role of NF- $\kappa$ B transcription factor in chronic viral hepatitis C and B	56
Structure and function of the non-coding regions of hepatitis C viral RNA	62
Transferrin conjugates in the anticancer therapy	72
Staphylokinase – a specific plasminogen activator	80
The stringent response – bacterial mechanism of an adaptive stress response	87
Plant mechanism of an adaptive stress response homologous to bacterial stringent response	94
Molecular aspects of plant responses to oxygen deprivation stress	101

## POSTĘPY BIOCHEMII W UBIEGŁYM ROKU

Początek drugiego roku ukazywania się „Postępów Biochemii” w nowym kształcie edytorskim skłania do podsumowań. Poniżej przedstawiam szereg ważnych dla przyszłych autorów informacji, które mogą usprawnić proces oceny i ostatecznego druku artykułów w naszym czasopiśmie.

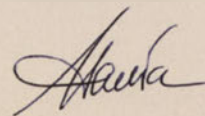
W 2005 roku do redakcji wpłynęło łącznie 61 artykułów przeglądowych, z których 46 (75%) zostało przyjętych do druku. W okresie początkowym, szereg z nadesłanych jeszcze w 2004 roku, a potem wydrukowanych w 2005 roku prac oczekiwano na końcową decyzję prawie 12 miesięcy, ale w wyniku utrzymywania właściwego tempa pracy nowej redakcji, udało się ten okres zmniejszyć do 6-8 tygodni. W 2006 roku zamierzamy dotrzymać terminów, co jest możliwe dzięki właściwemu tempu napływu artykułów przeglądowych (1-2 tygodniowo), życzliwości recenzentów, którzy w zaplanowanym czasie dokonają oceny oraz dobrej współpracy z drukarnią. Wystarczy nadmienić, że do końca lutego 2006 roku napłynęły 42 artykuły przeglądowe, z których 32 (76%) ukażą się drukiem w numerach 1-3 tomu 52. W tym roku, nie licząc materiałów redakcyjnych, zamierzamy opublikować 42-46 artykuły przeglądowe, co oznacza, że już obecnie redakcja pracuje nad kształtem numeru 3, który ukaże się drukiem we wrześniu 2006 roku (patrz tabela poniżej).

## Harmonogram prac redakcji „Postępów Biochemii” w 2006 roku

Miesiące:	Tom/nr:	Skład:	Korekta autorska:	Druk:	Początek dystrybucji:
Styczeń-Marzec	52/1	16-01-2006	25-01-2006	1-03-2006	30-03-2006
Kwiecień-Czerwiec	52/2	14-04-2006	25-04-2006	1-06-2006	30-06-2006
Lipiec-Wrzesień	52/3	14-07-2006	25-07-2006	14-08-2006	7-09-2006
Październik-Grudzień	52/4	16-10-2006	25-10-2006	20-11-2006	21-12-2006

Mam nadzieję, że powyższe informacje pozytywnie wpłyną na decyzję potencjalnych autorów o przysłaniu ich pracy do naszej redakcji. Obiecujemy szybki i kompetentny proces oceny pracy oraz wysoką jakość druku.

Serdecznie zapraszam do współpracy  
Sławomir Pikula



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

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

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

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

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

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

Kwartalnik „Postępy Biochemii” jest wydawany z pomocą finansową Ministerstwa Nauki i Informatyzacji. „Postępy Biochemii” są indeksowane w Medline i Agrolibrex. Nakład 850 egz.





**Katedra Biochemii Lekarskiej**  
**Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego**  
[www.cm-uj.krakow.pl/www/biochemia](http://www.cm-uj.krakow.pl/www/biochemia)



**Piotr Laidler, Anna Bilska**

Katedra Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków, tel.: (012) 422 74 00, (012) 422 76 84, tel./faks: (48 12) 422 32 72, e-mail: kbl\_sekr@cm-uj.krakow.pl



**Fotografia 1.** „Szczyt krakowskiego zbytku, stanąć tyłem do zabytku” (J.I. Sztudynger). Budynek przy ulicy Kopernika 7 w Krakowie. Druga połowa XVIII wieku. W 1822 roku przekazany przez Łożę Masońską, której był własnością, na cele dobroczynne Uniwersytetowi Jagiellońskiemu, gdzie do 1905 roku mieściły się kliniki uniwersyteckie. Po adaptacji w 1905 roku staje się siedzibą Zakładu Chemii Lekarskiej, którego początki sięgają roku 1864.

Reforma Akademii Krakowskiej przeprowadzona w XVIII wieku przez Hugo Kołłątaja wprowadziła na szeroką skalę do badań i nauczania metody empiryczne. Istotną rolę odegrało utworzenie w 1780 roku Katedry „Historii Naturalnej Chemii i Botaniki”, której kierownictwo objął absolwent Uniwersytetu Wiedeńskiego profesor Jan Jaśkiewicz. Stała się ona placówką macierzystą dla wielu dyscyplin. Wtedy rozpoczęto nauczanie chemii, jako jednego z podstawowych przedmiotów studiów lekarskich. Od tego momentu zaczęły się też starania profesorów Wydziału Lekarskiego o „własną” katedrę chemii lekarskiej. Trwały one prawie 100 lat. Takie są korzenie dzisiejszej Katedry Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

## ROK 1864

Powstaje Zakład Chemii Patologicznej, należącej już formalnie do Wydziału Lekarskiego. Kieruje nim Aleksander

Stopczański, pierwszy profesor chemii lekarskiej. Zakład ten w 1874 roku przekształcił się w Katedrę Chemii Lekarskiej. Stałe pomieszczenie dla „swojej Katedry” prof. Stopczański uzyskał jednak dopiero w roku 1905. Był to budynek przy ulicy Kopernika 7, który do 1822 roku należał do Łoży Wolnomularskiej „Przesąd Zwyciężony” (Fot. 1), gdzie – obecnie jako Katedra Biochemii Lekarskiej CM UJ – placówka ta znajduje się do dziś (Fot. 2).

## HEM I CHLOROFIL

W 1906 roku Katedrę Chemii Lekarskiej objął Leon Marchlewski, posiadający już znaczną pozycję w świecie naukowym. Podczas badań prowadzonych w Anglii nad chemią cukrów i barwników Marchlewski stwierdził, że hematorpofiryna uzyskiwana z krwi oraz filoporfiryna pochodząca z chlorofilu mają w swoim składzie ten sam związek budulcowy – pirol. W ostatnich latach XIX wieku

Marchlewski prowadził z Marcelim Nenckim badania nad filocyjaniną. Po śmierci Nenckiego kontynuował badania nad chlorofilem. Opublikowana w 1903 roku monografia *Die Chemie des Chlorophylls* rozślawiła jego nazwisko w całym naukowym świecie. Profesor Leon Marchlewski stworzył ze „swojej” katedry prężny ośrodek naukowy,

a prowadzone tu badania stały się początkiem nowej dziedziny – biochemii porównawczej, mówiącej o jedności świata organizmów żywych.

## TROCHĘ SENSACJI

W czasie II wojny światowej Niemcy przenieśli z Warszawy do Krakowa Instytut Medycyny Sądowej. Siedzibą placówki stał się budynek Katedry Chemii Lekarskiej. Na stanowisko głównego chemika powołano jednego z najbliższych współpracowników profesora Marchlewskiego, dr Jana Robla. To tu w 1943 roku przywieziono dokumenty i pamiątki zabezpieczone przy ekshumacji zwłok polskich oficerów zamordowanych w Katyniu. Prace identyfikacyjne (zidentyfikowano dane 266 zamordowanych oficerów) trwały do lipca 1944 roku, kiedy to na polecenie władz niemieckich zostały przerwane, a dokumentację wywieziono. Pozostały jednak w Polsce kopie protokołów dr Robla, których intensywnie i – na szczęście – bez skutku poszukiwało w 1945 roku NKWD. Dokumenty znalezione przypadkiem w roku 1991 (!) w budynku przy ulicy Westerplatte 9, gdzie z ulicy Kopernika 7, przewędrowały wraz z przenoszącym się w latach pięćdziesiątych Instytutem Ekspertyz Sądowych i tam zostały ukryte na strychu. W maju 2003 roku w budynku Ka-



**Fotografia 2.** Budynek przy ulicy Kopernika 7 w Krakowie. Pierwsza połowa XXI wieku. Siedziba Katedry Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.





Fotografia 3. Wystawa „Małopolskie w kатыńskich dokumentach dr. Jana Robla” przygotowana przez krakowski Oddział Instytutu Pamięci Narodowej i uroczystość odsłonięcia tablicy pamiątkowej poświęconej dr. Roblowi – Kraków, 19 maja 2003 r. Od prawej: dr hab. Janusz Kurtyka – wówczas prezes krakowskiego Oddziału Instytutu Pamięci Narodowej, dr Aleksander Głazek – dyrektor Instytutu Ekspertyz Sądowych, prof. Piotr Laidler – kierownik Katedry Biochemii Lekarskiej.

tedry Biochemii Lekarskiej odsłonięto tablicę upamiętniającą dr Jana Robla, uroczystość ta była połączona z otwarciem – przygotowaną przez krakowski Oddział Instytutu Pamięci Narodowej – wystawy „Małopolskie w kатыńskich dokumentach dr. Jana Robla” (Fot. 3).

## TRUDNE LATA POWOJENNE

Jesienią 1946 roku odwiedził Polskę, na zaproszenie Uniwersytetu Wrocławskiego i Jagiellońskiego, prof. Jakub Parnas. Było to nie tylko zaproszenie do wygłoszenia kilku wykładów, lecz także propozycja objęcia Katedry Chemii Lekarskiej na Uniwersytecie Jagiellońskim lub Wrocławskim. Profesor wybrał Kraków. Ale... „nic nie było proste w tamte dni”. Władze radzieckie odwołały profesora do Moskwy, z której nigdy nie wrócił. Kierownictwo Katedry objął uczeń i współpracownik Marchlewskiego – Bolesław Skarżyński. Pierwsze badania naukowe poświęcone witaminom i związkom sterydowym Skarżyński rozpoczął w 1927 roku właśnie w Katedrze Chemii Lekarskiej, izolując z tkanki roślinnej estradiol. Habilitował się z badań mechanizmów przemiany karotenu w witaminę A oraz analizy widm związków organicznych. Później prowadził badania nad biochemią komórek nowotworowych w laboratorium Hansa von Eulera w Szwecji, których wyniki znalazły się w wydanej w 1944 roku wspólnie z Eulerem monografii „*Biochemie der Tumoren*”. Zimą 1944 roku Skarżyński

wyjechał do Edynburga, gdzie na Polskim Wydziale Lekarskim prowadził wykłady z chemii fizjologicznej.

1946 rok, to nie był dobry rok na objęcie kierownictwa Katedry Chemii Lekarskiej. Trudne – z różnych powodów – lata powojenne: zniszczone pracownie, brak wykształconych kadr, konieczność dzielenia miejsca z – pozostającym ciągle jeszcze w budynku katedry – Instytutem Ekspertyz Sądowych,

decyzja władz politycznych PRL, na mocy której w 1950 roku wszystkie wydziały medyczne w Polsce oddzielono od uniwersytetów przekształcając je w samodzielne instytucje – akademie medyczne (w Krakowie powstała wówczas Akademia Medyczna im. Mikołaja Kopernika) – wszystko to razem nie tworzyło odpowiedniego klimatu do rozwijania aktywności naukowej. Mimo to były osiągnięcia: udało się w dużym stopniu rozpoznać mechanizm utleniania tiosiarczanów przez bakterie *Thiobacillus thiooparus*, a także wyizolowano i scharakteryzowano białka wiążące witaminy B<sub>2</sub> i B<sub>12</sub>. Wspomnieć należy też, że profesor Skarżyński był inspiratorem powstania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i przez trzy lata piastował godność pierwszego prezesa tego Towarzystwa. Za jego czasów zmieniła się też nazwa „naszej” katedry na Katedrę Chemii Fizjologicznej. Wśród uczniów i wychowanków profesora jest wielu znanych polskich biochemików: Włodzimierz Ostrowski, Tadeusz Szczepkowski, Maria Gumińska,

Maria Sarnecka-Keller (1925-1984) – w ponad 600-letniej historii Uniwersytetu była pierwszą kobietą, piastującą urząd prorektora oraz Aleksander Koj (rektor UJ w latach 1987-1990 i 1993-1999).

Po śmierci prof. Skarżyńskiego w 1963 roku kierownictwo Katedry Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej im. Mikołaja Kopernika objął Włodzimierz Ostrowski, który zdobywał i doskonalił swą wiedzę w m.in. w laboratoriach wybitnych biochemików, m.in. H. Theorella w Nobel Institute w Sztokholmie oraz W. Stanle'a w Virus Laboratory, University of California. W swoim dorobku naukowym profesor Ostrowski ma ponad 100 prac eksperymentalnych, których znaczna część poświęcona jest biochemii białek enzymatycznych, w tym kwaśnej fosfatazie z prostaty człowieka. Mają one trwałe miejsce w literaturze światowej, a profesor W. Ostrowski dzięki swojej pracy naukowej, dydaktycznej i organizacyjnej jest postrzegany przez środowisko naukowe, jako jeden z wybitniejszych polskich biochemików.

W 1972 roku, po kilku kolejnych zmianach organizacyjnych – utworzono dwa zakłady: Zakład Chemii Fizjologicznej i Zakład Biochemii Ogólnej – Katedra została przekształcona w Instytut Biochemii Lekarskiej. W tym czasie pracowali tu – wspomniani wyżej: profesor Tadeusz Szczepkowski (1916-1973) i profesor Maria Gumińska (1928-1998). Opublikowane przez Szczepkowskiego prace nad metabolizmem związków siarki należą do pionierskich i są do dziś cytowane w publikacjach dotyczących tej problematyki. Maria



Fotografia 4. Na Sali wykładowej Katedry Biochemii Lekarskiej, Kraków, zima 2006.





Fotografia 5. Mały jubileusz 10-lecia School of Medicine in English CM UJ. Chwile mniej i bardziej podniosłe. Oficjalna część uroczystości odbywała się w Katedrze Biochemii Lekarskiej. Kraków, 2004.

Gumińska ostatnie lata swojego życia poświęciła problemom ekologii. Jej uporowi oraz odwadze głoszenia nie zawsze popularnych prawd, Ziemia Krakowska zawdzięcza między innymi zamknięcie wydziału elektrolizy Huty Aluminium w Skawinie.

#### KATEDRA DZIŚ - NAUKA I DYDAKTYKA

12 maja 1993 roku medycyna i farmacja powróciły w macierzyste mury Alma Mater Jagiellonica, a placówka przyjęła nazwę Instytutu Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum UJ. Decyzją władz Wydziału Lekarskiego CM UJ w 2005 roku powrócono do pierwotnej formy organizacyjnej, nadając placówce nazwę Katedry Biochemii Lekarskiej. Kierowanie placówką od 1996 roku, początkowo jako dyrektor Instytutu, a obecnie kierownik Katedry, przejął po profesorze W. Ostrowskim jego uczeń, absolwent Uniwersytetu Jagiellońskiego, Piotr Laidler.

W Katedrze pracuje około 30 pracowników naukowych – doktorantów, asystentów, adiunktów, profesorów – tworzących pięć zespołów badawczych, formalnie funkcjonujących w dwóch zakładach – Zakładzie Chemii Fizjologicznej i Zakładzie Biochemii Ogólnej (Fot. 4). W ostatnich dziesięciu latach pracownicy Katedry realizowali i nadal realizują liczne projekty badawcze finansowane ze środków krajowych (KBN), jak i europejskich (UE), we współpracy z wieloma ośrodkami w Polsce, Niemczech, Hiszpanii, Danii, Włoszech, Szwecji, Holandii, Wielkiej

Brytanii, Bułgarii, Francji, na Łotwie i w Stanach Zjednoczonych. Tematyka badawcza skupia się wokół pięciu wiodących kierunków:

1. Charakterystyka fizykochemiczna, kinetyczna i funkcjonalna białek enzymatycznych: arylosulfataza A, cystationaza, kinaza pirogronianowa, kwaśna fosfataza prostatowa, rodanaza, siarkotransferazy.
2. Biologia i biochemia komórek nowotworowych (linie nowotworowe prostaty, pęcherza moczowego, jelita, czerniaka i inne) – progresja nowotworu i możliwości jej hamowania – proliferacja, apoptoza, migracja, adhezja, N-glikozylacja, zmiany w transdukcji sygnału (białka adhezyjne, steroidy, ligandy receptorów jądrowych, białka sygnalizacji, enzymy).

3. Układy supramolekularne w odpowiedzi immunologicznej i sygnalizacji. Synteza związków tworzących układy supramolekularne o potencjalnym zastosowaniu w technikach immunotargetingu. Analiza oddziaływań z białkami: reakcja antygen-przeciwciała i zmiany struktury przeciwciał warunkujące ich funkcje efektorowe.

4. Metabolizm drobnocząsteczkowych związków siarki w organizmach zwierzęcych: cysteina, glutation, homocysteina, pochodne tiazolidynowe; enzymy przemian. Metabolizm aminokwasów siarkowych w komórkach prawidłowych i nowotworowych. Biologiczna aktywność tioli, siarka sulfanowa, S-tiolacja, S-nitrozylacja. Patogeneza arteriosklerozy – rola homocysteiny i kwasu foliowego.

5. Wpływ reaktywnych form tlenu na białka i lipidy. Indukcja immunogenności, stymulacja nieswoistej i swoistej odpowiedzi immunologicznej oraz źródła i znaczenie chemiluminescencji granulocytów towarzyszącej procesom zapalnym.

W Katedrze od końca lat 90-tych funkcjonuje Pracownia Hodowli Komórek. W 2004 roku, dzięki funduszom pozyskanym w ramach konkursu MILAB z Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, otworzono także Pracownię Biologii Molekularnej.

Przeznaczeniem placówki uniwersyteckiej jest realizowanie zadań określonych zakresem działalności statutowej każdej uczelni wyższej – poszukiwanie i przekazywanie prawdy. Pracownicy Katedry, będącej jednostką Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum UJ oprócz działalności naukowo-badawczej zaangażowani są w kształcenie chemii i biochemii studentów medycyny, kierunku lekarsko-dentystycznego, farmacji i analityki medycznej, ratownictwa, fizykoterapii, pielęgniarstwa, a także studentów kierunku fizyka medyczna Wydziału Fizyki i Techniki Akademii Górniczo-Hutniczej. Od 1994 roku prowadzone są w języku angielskim zajęcia z chemii i biochemii dla studentów zagranicznych. W 2004 roku *School of Medicine in English* Wydziału Lekarskiego CM UJ – w której kształcą się kilkuset studentów z ponad 20 krajów – obchodziła swoje 10-lecie, a oficjalna część uroczystości odbywała się w Katedrze Biochemii Lekarskiej (Fot. 5).

W ramach działalności naukowo-edukacyjnej pracownicy Katedry są opiekunami prac magisterskich studentów Wydziału Chemii oraz Wydziału Farmacji UJ, promotorami prac doktorskich realizowanych albo wyłącznie w Katedrze w ramach Studium Doktoranckiego CM UJ albo we współpracy z Wydziałem Chemii oraz Wydziałem Biologii i Nauk o Ziemi UJ. Podwoje Katedry są otwarte dla członków Studenckiego Towarzystwa Naukowego, którzy pod naszą opieką uczą się zasad obowiązujących w działalności badawczej. Nie zapominamy też o popularyzacji nauki: od paru lat jesteśmy obecni na Jagiellońskim Festiwalu Nauki, największej tego typu imprezie w Krakowie.

Zapraszamy do odwiedzania Katedry Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, do współpracy – tak w zakresie poznawania prawdy, jak i jej przekazywania kolejnym pokoleniom młodych ludzi, zafascynowanych pięknem i złożonością natury.



## Leszek Kuźnicki

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN  
im. Marcelego Nenckiego  
Warszawa

Szanowna i Droga Pani Profesor!

Od lat otacza Panią powszechny szacunek i uznanie dla postawy i dokonań, które złożyły się na stoletnią drogę życia. Zaczęła się ona w Łodzi 8 maja 1906 roku, w domu lekarza Józefa Saks. Jego żona Wiktoria z domu Wiesel urodziła drugą córkę, której nadano imię Stella. Niestety ojciec zmarł w roku 1909. Stella Saks wyrosła na zdrową, urodziwą, bardzo zdolną i bardzo ambitną osobę. Cechy te ujawniły się już w szkole średniej. Mając lat siedemnaście Stella Saks ukończyła w Warszawie Gimnazjum Związku Zawodowego Nauczycieli Polskich Szkół Średnich. Po otrzymaniu matury jesienią 1923 roku podjęła studia na Uniwersytecie Warszawskim, w Sekcji Przyrodniczej Wydziału Filozofii.

W latach dwudziestych wśród niektórych profesorów stołecznej uczelni pokutowało przekonanie, że uniwersytet nie jest właściwym miejscem dla kobiet. Stella Saks należała do tych studentek, które zadawały kłam takim twierdzeniom. Dostrzeżono w niej zamiłowanie do pracy badawczej i wielki potencjał twórczy. W roku 1926 została przyjęta do Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, w którym pod kierunkiem profesora Kazimierza Białaszewicza (1882-1943) wykonała pracę doktorską pod tytułem „O przemianie mineralnej podczas głodu u psa”. Obrona rozprawy odbyła się na Uniwersytecie Warszawskim w roku 1932 i była pierwszą w stołecznej uczelni, w której kobieta otrzymała stopień doktora z zakresu nauk biologicznych. Już w tym czasie Stella Saks zajmowała się przede wszystkim fizjologią człowieka. W latach 1930-1931 pracowała jako laborant w Centrum Badań Lotniczo-Lekarskich (obecnie Instytut Medycyny Lotniczej). W Centrum uczestniczyła w badaniach lotników i kandydatów na pilotów pod kątem zmian w krążeniu i oddychaniu w warunkach obniżonego ciśnienia atmosferycznego.

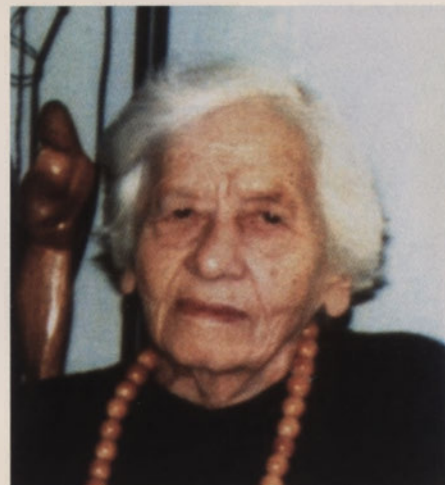
Rok 1931 był przełomowym zarówno w życiu osobistym, jak również z perspektywy późniejszej kariery na-

ukowej. Stella Saks poślubiła Włodzimierza Niemierkę (1897-1988) i została starszym asystentem w Zakładzie Fizjologii Akademii Wychowania Fizycznego (AWF) w Warszawie. Mąż w tym czasie pracował w Instytucie Nenckiego i kończył wykonywaną pod kierunkiem Kazimierza Białaszewicza rozprawę doktorską. W AWF Stella Niemierko była zatrudniona do września 1939 roku. Jej zwierzchnikiem i przewodnikiem naukowym był profesor Włodzimierz Missiuo (1892-1967), człowiek wielce zasłużony na polu rozwoju w Polsce badań z zakresu fizjologii pracy i medycyny sportu.

Podobnie jak doktorat, stanowisko starszego asystenta w Akademii Wychowania Fizycznego w Warszawie było czymś zupełnie wyjątkowym. Lata 1932-1939 to równoległe zaangażowanie w działalność badawczą, organizacyjną i dydaktykę. Stella Niemierko badała pod kątem fizjologii procesy zachodzące u ludzi podczas pracy i przy wyczynowym uprawianiu sportu. Na zlecenie Ministerstwa Pracy i Opieki Społecznej na terenie fabryk „Rygawar” i „Philipsa” badała jak na wydajność produkcyjną i zmęczenie zatrudnionych wpływa praca przy taśmie, a jak w sytuacji nienarzuconego tempa pracy. Na terenie AWF i podczas letnich obozów w Brasławiu zajmowała się fizjologią wyczynowców uprawiających sporty wodne. Wyniki tych badań zostały udokumentowane w sześciu publikacjach, w większości zespołowych.

Wszystkie lata pracy w AWF były dużym obciążeniem dydaktycznym i organizacyjnym. Stella Niemierko prowadziła ćwiczenia z zakresu fizjologii, a także wykłady dotyczące przemiany materii. Podczas półtorarocznego pobytu Włodzimierza Missiuo za granicą, samodzielnie kierowała Zakładem Fizjologii. Była ponadto sekretarzem czasopisma „Przegląd Fizjologii Ruchu”.

Okupację niemiecką do jesieni 1944 r. Stella i Włodzimierz Niemierkowie przeżyli w Warszawie. Możliwości prowadzenia badań były ograniczone. Mimo to przez dwa lata (1942-1943) na terenie Szpitala dla Dzieci, Stella Niemierko wraz z profesorem T. Chrapowickim badała zmiany w składzie



Profesor Stella Niemierko

chemicznym krwi w czasie leczenia krzywicy dużymi dawkami witaminy D. Dokumentacja z tych badań zaginęła podczas Powstania Warszawskiego. Wojna była tragiczna, a okupanci okrutni i zbrodniczy. W 1944 roku zostały zamordowane przez Niemców matka Stelli Niemierko Wiktoria i Jej siostra Jadwiga. Po upadku Powstania Warszawskiego Stella i Włodzimierz Niemierkowie zamieszkiwali w Milanówku i Grodzisku Mazowieckim.

Po wypędzeniu z Polski Niemców przez Armię Czerwoną i Wojsko Polskie, Niemierkowie zgłosili się wiosną 1945 roku do pracy w Zakładzie Chemii Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Warszawskiego. Stella Niemierko jako starszy asystent pracowała tam do jesieni 1945 r. Pod koniec tego roku Włodzimierz i Stella Niemierkowie przenieśli się na 9 lat do Łodzi. Dla wielu ludzi nauki miasto to po zakończeniu II wojny światowej stało się prawdziwą ziemią obiecaną.

W 1945 r. Włodzimierz Niemierko habilitował się na Uniwersytecie Warszawskim i jesienią został powołany na stanowisko profesora i kierownika Zakładu Fizjologii Zwierząt nowo utworzonego Uniwersytetu Łódzkiego. Doktor Stella Niemierko w tym samym Zakładzie została starszym asystentem i wkrótce adiunktem. Prowadząc w Łodzi działalność edukacyjną małżonkowie swoje wysiłki skoncentrowali na pracy naukowej i na odbudowie Instytutu im. Marcelego Nenckiego.



Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, znana w Polsce i na świecie placówka badawcza Towarzystwa Naukowego Warszawskiego, została w latach 1939-1944 doszczętnie zniszczona. Wielu jej pracowników w wyniku działalności okupantów niemieckich zginęło, zmarło lub rozproszyło się po świecie. W czasie obrony Warszawy w 1939 roku i Powstania Warszawskiego budynki Instytutu zostały zrujnowane, a biblioteka spalona. Mimo tych strat Instytut Nenckiego po 1945 roku odrodził się przede wszystkim dzięki inicjatywie i hartowi ducha trzech par małżeńskich: Jana i Stanisławy Dembowskich, Włodzimierza i Stelli Niemierków oraz Jerzego Konorskiego i Liliany Lubińskiej.

Najkrótszy, a zarazem wyjątkowo precyzyjny opis początków tego procesu znajduje się w Autobiografii Jerzego Konorskiego, który przeżył wojnę wraz z żoną w Biologicznej Stacji Naczelnych w Suchumi na Kaukazie.

„.....Wiosną 1945 roku zdecydowaliśmy się zakończyć nasz pobyt w Suchumi i udać się do Moskwy, aby móc jak najrychlej powrócić do Polski. Już wtedy zaczęliśmy myśleć o nowym życiu w naszym kraju, o odbudowie polskich uniwersytetów i odrodzeniu polskiej nauki. W Moskwie spotkaliśmy naszego dobrego przyjaciela – profesora Dembowskiego, jednego z dawnych dyrektorów Instytutu Nenckiego. Po wielu rozważaniach postanowiliśmy odbudować Instytut. W końcu sierpnia pociągiem radzieckim przez Brześć dotarliśmy do Warszawy. [...] Pierwszymi osobami, które spotkaliśmy byli dr Włodzimierz Niemierko i jego żona – [Stella Niemierko]. Po wspólnych naradach, co robić dalej, postanowiliśmy reaktywować Instytut Nenckiego. Z tym projektem zwróciliśmy się do Ministerstwa Oświaty, tam z kolei spotkaliśmy dyrektora nowo powstałego Wydziału Nauki, profesora [Stanisława] Arnolda, znanego polskiego historyka, któremu przedłożyliśmy nasze zamierzenia. W przeciągu pół godziny sprawa została omówiona i zaakceptowana, dwie zaprzyjaźnione pary małżeńskie, moja żona i ja oraz dr Niemierko z żoną utworzyliśmy Komitet Organizacyjny Instytutu Nenckiego. Przewodniczącym Komitetu został dr Niemierko. [...] Warszawa była zburzona, przedwojenny Instytut całkowicie zniszczony, stało się zatem jasne, że, przynajmniej na jakiś czas, należało przenieść Instytut do innego miasta. Po pewnych wahaniach

postanowiliśmy, że będzie to Łódź. [...] Wśród innych motywów, które zdeterminowały naszą decyzję był także fakt powołania nowego uniwersytetu w Łodzi, którego rektorem został nasz bliski przyjaciel – profesor [Tadeusz] Kotarbiński, znakomity filozof i uczyony. Raz jeszcze sprawa została rozstrzygnięta w przeciągu pięciu minut: profesor Kotarbiński zaoferował profesorowi Niemierce i mnie katedry fizjologii i neurofizjologii. Ustalono także, że będziemy mogli zajmować dwa stanowiska – jedno w Uniwersytecie, drugie – w Instytucie Nenckiego”<sup>1</sup>.

W zakresie obowiązków okres łódzki był powtórzeniem sytuacji sprzed wojny. Doktor Stella Niemierko równolegle pracowała doświadczalnie w Zakładzie Biochemii Instytutu Nenckiego i prowadziła zajęcia dydaktyczne, obejmujące ćwiczenia i wykłady na Uniwersytecie Łódzkim. Zmiana i to radykalna dotyczyła natomiast tematyki badawczej. Obiektem była larwa mola woskowego (*Galleria mellonella*), a od połowy lat pięćdziesiątych również stadia rozwojowe jedwabnika mrowowego (*Bombyx mori*). Problemem poznawczym stał się metabolizm rozpuszczalnych związków fosforowych, fosfolipidów oraz cukrów w czasie wzrostu i rozwoju owadów oraz w różnych stanach fizjologicznych wywołanych czynnikami zewnętrznymi, jak brak pokarmu, aneorobioza i hipotermia. W toku tych badań Stella i Włodzimierz Niemierkowie stwierdzili obecność kwasu metafosforanowego u mola woskowego. Związek ten nie był uprzednio znaleziony u żadnego zwierzęcia.

Późniejsze badania Stelli Niemierko dotyczyły zmian w zawartości fosfolipidów i kwasów nukleinowych w czasie wzrostu i rozwoju owadów. Okazało się, że podczas wzrostu gąsienic mola woskowego procentowa zawartość fosfolipidów nie ulega zmianie, natomiast procentowa zawartość kwasów nukleinowych zmniejsza się. W przypadku jedwabnika, linieniu i metamorfozie zawsze towarzyszyły zmiany na poziomie molekularnym, jak zanikanie tłuszczu obojętnych i tworzenie się fosfolipidów oraz uwalnianie się fosforanów z estrów fosforowych. Przebywanie, nawet przez kilkadziesiąt godzin w warunkach beztlenowych wywołuje ogromne zmiany w gospodarce fosfo-

ranowej u gąsienic mola woskowego, ale ich nie zabija. Po przywróceniu normalnych warunków tlenowych metabolizm wraca do normy, a gąsienice przechodzą wszystkie stadia rozwojowe, aż do postaci imago.

Od roku 1959, a więc w kilka lat po powrocie do Warszawy w polu zainteresowań Stelli Niemierko znalazła się problematyka neurochemiczna. Był to początek długiej i owocnej współpracy z profesorem Lilianą Lubińską. Już początkowe wyniki przyniosły nowe i istotne ustalenia. W nerwach obwodowych psów i kotów acetylocholinoesteraza (AChE) nie jest rozmieszczona równomiernie wzdłuż nerwu. Stężenie AChE spada stopniowo w aksonie, w miarę oddalania się od komórki, podczas gdy takie składniki aksoplazmy, jak białka, kwasy nukleinowe i związki fosforowe są rozmieszczone równomiernie. Występowanie gradientu stężenia AChE pokrywało się z opisywaną wielokrotnie różną wrażliwością części dystalnych nerwów obwodowych wobec najróżniejszych czynników uszkodzających.

W celu wyjaśnienia zależności różnych części komórki nerwowej skierowano uwagę na ruchy aksoplazmy. W tym czasie dominował pogląd, że jest on jednokierunkowy, aksoplazma płynie od komórki do części peryferyjnych. Lubińska i Niemierkowa wraz ze współpracownikami w szeregu doświadczeń wykazały, że aksoplazma nie tylko ma ruch proksymo-dystalny, ale również może płynąć w kierunku przeciwnym, od obwodu ku środkowi komórki. Jednym z dowodów była lokalizacja AChE, która gromadziła się zarówno powyżej, jak i poniżej przecięcia nerwu, natomiast jej stężenie spadało w miejscach oddalonych od miejsc uszkodzonych. Późniejsze badania potwierdziły istnienie dwukierunkowego transportu różnych składników przez aksoplazmę oraz istnienie różnych form molekularnych AChE. Przy współudziale uczniów i współpracowników Stella Niemierko wykazała również, że uszkodzenie nerwów obwodowych pobudza w miejscu przecięcia syntezę kwasów nukleinowych.

W wielkim skrócie starałem się przedstawić aktywność naukową profesora Stelli Niemierko w latach 1926-1976. Zróżnicowana tematyka badawcza świadczy o jej szerokich zainteresowaniach i dużych umiejętnościach. W czasie studiów pod kierunkiem Kazimierza Białaszewicza była początkującym biochemikiem. Po dok-

<sup>1</sup> Konorski J. (1977) Autobiografia (tłum. z jęz. angielskiego Kwart. Hist. Nauk. i Tech. 22(2), str. 215-250.)



toracie w Zakładzie Włodzimierza Misurskiego zajmowała się fizjologią pracy i wyczynowego sportu. Następnie wraz z mężem a również samodzielnie badała przemiany związków fosforowych na różnych etapach ontogenezy mola woskowego i jedwabnika morwowego.

Od połowy lat 50-tych dzięki profesorowi Niemierko rozwinął się w Instytucie Nenckiego kierunek neurochemiczny. Z jej inicjatywy powstała Pracownia Neurochemii. Po przejściu na emeryturę, kierownictwo Pracowni przejęła Jej wychowanka - Barbara Oderfeld-Nowak.

Kolejne osiągnięcia naukowe znajdowały odzwierciedlenie w stanowiskach i tytułach. Stella Niemierko została docentem w 1955 r., profesorem nadzwyczajnym w 1962 r., a profesorem zwyczajnym w 1970 r. Przez cały czas za swój sposób spełniania się - obok pracy badawczej - uważała kształcenie, początkowo studentów, w latach późniejszych współpracowników i następców. Pierwszym jej wypromowanym doktorem była w roku 1961 Anna Wojtczak. W późniejszych latach profesor Stella Niemierko była promotorem rozpraw doktorskich jeszcze dziewięciu osób: Ewy Lenartowicz (1965), Anny Wroniszewskiej (1966), Barbary Oderfeld-Nowak (1967), Jolanty Skangiel-Kramskiej (1973), Andrzeja Wieraszk (1975), Katarzyny Mitros (1976), Magdaleny Wójcik (1976), Anny Potempskiej (1976) i Hanny Książak (1977).

Przejście z końcem roku 1976 na emeryturę nie oznaczało ustania aktywności naukowej. Profesor Stella Niemierko wraz z zespołem kierowanym przez profesora Bogusława Żernickiego uczestniczyła w badaniach neuronów mózgu kotów poddanych deprywacji wzrokowej. Badania te w roku 1984 wyróżniono Zespołową Nagrodą Państwową II stopnia.

W latach późniejszych za swą powinność profesor Niemierko uważała przypomnienie działalności osób, którym Instytut Nenckiego zawdzięczał powstanie i rozwój. Wraz z mężem opublikowała artykuł o Marcelim Nenckim i Jerzym Konorskim, a sama o Kazimierzu Białaszewiczu. W angielskim zbiorze publikacji wydanych z okazji 75-lecia Instytutu zamieszczono dwa artykuły Marceliego Nenckiego. Jeden, który ukazał się w Gazecie Lekarskiej w 1897 roku, drugi ogłoszony w Przeglądzie Lekarskim w roku 1900. Ich przekładu na język angielski dokonała Profesor Stella Niemierko.

Bez cienia przesady można stwierdzić, że Profesor Stella Niemierko jest żywą historią fizjologii i biochemii w Polsce. W roku 1935 powstało Polskie Towarzystwo Fizjologiczne. Stella Niemierkowa należała do wąskiego grona jego założycieli podczas I Zjazdu w Warszawie, a w trudnych latach powojennych (1946-1948) pełniła w nim funkcję sekretarza Zarządu Głównego; dziesięć lat później (1958-1960) podobną funkcję pełniła w Zarządzie Głównym Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Stella Niemierko jest członkiem honorowym obu tych organizacji, jak również przewodniczącym honorowym Rady Naukowej Instytutu Nenckiego, w której działała nieprzerwanie od roku 1955, w latach 1980-1983 będąc przewodniczącą Rady. Została odznaczona Krzyżem Kawalerskim i Krzyżem Oficerskim Orderu Odrodzenia Polski oraz uhonorowana (1996) najwyższym odznaczeniem Polskiej Akademii Nauk, Medalem imienia Mikołaja Kopernika<sup>2</sup>.

Wielce Szanowna Pani Profesor! Pracowała Pani efektywnie w kilku instytucjach naukowych i uczelniach oraz organizacjach społecznych, ale pierwszą i stałą miłością darzyła Pani Instytut Nenckiego, nigdy nie szcędząc czasu i trudu na rzecz jego dobra. Tak było w Łodzi w czasach odbudowy, tak było w Warszawie w nowej siedzibie. W latach 1968-1976 pełniła Pani funkcję zastępcy dyrektora od spraw naukowych. W tym czasie ja również byłam jednym z trzech zastępców. Z perspektywy lat doceniam jak wiele przyniosło mi to współdziałanie. Od Pani nauczyłem się między innymi umiejętności postępowania z ludźmi w sprawach konfliktowych. Utkwiły mi w pamięci wypowiedzi Jerzego Konorskiego, naszego wówczas wspólnego zwierzchnika: „Panie Leszku, zostawimy tę sprawę Pani Stelli, tylko ona jedna będzie potrafiła ją załatwić”.

Była Pani jednocześnie wzorcem postaw etycznych i dobrym duchem dla potrzebujących. Już nieżyjąca profesor Gabriela Sarzała-Drabikowska zwierzyła mi się: „Przed doktoratem znalazłam się w krytycznym położeniu. Miałam rozgrzebane, niedokończone doświadczenia, poważne kłopoty osobiste i byłam chora na gruźlicę. Chciałam wszystko rzucić i nigdy nie wrócić

<sup>2</sup> Przy pisaniu artykułu korzystałem z materiałów zgromadzonych w Archiwum i Sekretariacie Rady Naukowej Instytutu Nenckiego.

do nauki. Dzięki pomocnej dłoni Profesora Niemierko problemy udało się rozwiązać, a nawet powróciłam do zdrowia i w końcu zostałam profesorem”. Nie była to jedyna sprawa, pomyślnie zakończona dzięki interwencji i radom Profesora Stelli Niemierko.

Należy Pani do tych osób, dzięki którym po drugiej wojnie światowej Instytut nie tylko dzwignął się ze zgliszcz, ale również rozrósł się do wielkości przerastającej wyobrażenie jego twórców. Każdy ośrodek naukowy chciałby mieć w swym gronie Profesora Stellę Niemierko, a cóż dopiero przez okrągłe osiemdziesiąt lat, gdyż właśnie tyle miają lat od czasu, kiedy znalazła się Pani po raz pierwszy w Zakładzie Fizjologii profesora Kazimierza Białaszewicza.

8 maja 2006 roku jest świętem naszego Instytutu. Świętem zupełnie niezwykłym!

**Publikacje, które charakteryzują działalność naukową Stelli Niemierko w różnych okresach Jej życia**

1. Saks S (1930) O przemianie mineralnej podczas głodu u psa. Acta Biol Exp 5: 225-255
2. Missiuro W, Niemierko S, Perlberg J, Pawlak B (1939) Compensatory processes at rest and during work under conditions of lowered oxygen tension. Acta Biol Exp 13: 91-110
3. Niemierko S (1950) Studies in the biochemistry of the waxmoth *Galleria mellonella*. 4-Metabolism of total phosphorus during feeding and during starvation of the larvae. Acta Biol Exp 15: 91-99
4. Niemierko S, Niemierko W (1950) Metaphosphate in the excreta of the wax moth, *Galleria mellonella*. Nature 166: 268-269
5. Niemierko S., Wojtczak A. (1954) Phosphorus compounds metabolism during metamorphosis of wax moth. Acta Physiol Pol 5: 586-587
6. Niemierko S, Włodawer P, Wojtczak A (1954) Metabolism of phosphorus compounds during the development of silkworm. Acta Physiol Pol 5: 588-590
7. Lubińska L, Niemierko S, Oderfeld B (1961) Gradient of cholinesterase activity. Nature 189: 122-123
8. Lubińska L, Niemierko S, Oderfeld B, Szwarz L (1962) Decrease of acetylcholinesterase activity along peripheral nerves. Science 135: 368-370
9. Lubińska L, Niemierko S, Oderfeld B, Szwarz L (1963) The distribution of acetylcholinesterase in peripheral nerves. J Neurochem 10: 25-41
10. Lubińska L, Niemierko S, Oderfeld B, Szwarz L, Zelena J (1963) Bidirectional movements of axoplasm in peripheral nerve fibres. Acta Biol Exp 23: 239-247
11. Lubińska L, Niemierko S, Oderfeld-Nowak B, Szwarz L (1964) Behaviour of acetylcholinesterase in peripheral nerves.



- nesterase in isolated nerve segments. *J Neurochem* 11: 493-503
12. Niemierko S (1965) Distribution and characteristics of acetylcholinesterase. *Postępy Biochem* 11: 247-265
  13. Niemierko S, Lubińska L (1967) Two fractions of axonal acetylcholinesterase exhibiting different behaviour in severed nerves. *J Neurochem* 14: 761-769
  14. Lenartowicz E, Niemierko S (1968) The effect of low temperature and starvation on carbohydrate metabolism in larvae of *Galleria mellonella* L. *J Insect Physiol* 14: 451-462
  15. Jankowska E, Lubińska L, Niemierko S (1969) Translocation of AChE-containing particles in the axoplasm during nerve activity. *Comp Biochem Physiol* 28: 907-913
  16. Oderfeld-Nowak B, Niemierko S (1969) Synthesis of nucleic acids in the Schwann cells as the early cellular response to nerve injury. *J Neurochem* 16: 235-248
  17. Skangiel-Kramska J, Niemierko S, Lubińska L (1969) Comparison of the behaviour of a soluble and a membrane-bound enzyme in transected peripheral nerves. *J Neurochem* 16: 921-926
  18. Skangiel-Kramska J, Niemierko S (1971) Isoenzymes of acetylcholinesterase in the sciatic nerve of rabbit and their molecular weights. *Bull Acad Pol Sci Biol* 19: 389-393
  19. Lubińska L, Niemierko S (1971) Velocity and intensity of bidirectional migration of acetylcholinesterase in transected nerves. *Brain Res* 27: 329-342
  20. Skangiel-Kramska J, Niemierko S (1975) Soluble and particle-bound acetylcholinesterase and its isoenzymes in peripheral nerves. *J Neurochem* 24: 1315-1341
  21. Wójcik M, Niemierko S (1978) The effect of synthetic scotophobin on motor activity in mice. *Acta Neurobiol Exp* 38: 25-30
  22. Mitros K, Kossut M, Skangiel-Kramska J, Muller L, Niemierko S, Zernicki B (1978) The effect of first visual stimulation on incorporation of labelled leucine into cerebral cortex of binocularly deprived kittens. *Acta Neurobiol Exp* 38: 289-303
  23. Niemierko S (1980) Biochemical changes in cat cerebrum produced by visual deprivation and specific stimulation. *Acta Physiol Pol* 31 suppl 20: 43-56
  24. Niemierko S (1987) My sixty years in physiology and biochemistry. *Acta Biochim Pol* 34: 239-252
  25. Niemierko W, Niemierko S (1987) Marcellus Nencki 1847-1901. *Acta Physiol Pol* 38: 149-157
  26. Niemierko S (1987) Kazimierz Białaszewicz 1882-1943. *Acta Physiol Pol* 38: 177-185

## O TYM SIĘ MÓWI

### Biochemia to podstawa nowoczesnej biotechnologii

**Tomasz Twardowski**

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN  
i Politechnika Łódzka, ul. Noskowskiego  
12/14, 61-704 Poznań; tel. (061) 852 85 03  
wew. 133, e-mail: twardows@ibch.poznan.pl,

#### STRESZCZENIE

**Biotechnologia, a zwłaszcza inżynieria genetyczna, jest „źródłem” wielu produktów codziennego użytku. Warunkiem koniecznym akceptacji społecznej tych powszechnych artykułów jest zrozumienie biochemii i biologii molekularnej stanowiących podstawę biotechnologii. W tekście przedstawiono dyskusję dotyczącą kilku arbitralnie wybranych, najbardziej istotnych przypadków: roślin transgenicznnych odpornych na herbicydy uniwersalne, obszarów wolnych od GMO i zdolności patentowej wynalazków biotechnologicznych. W konkluzji wskazano na zasadnicze znaczenie poparcia społecznego dla dalszego rozwoju biotechnologii.**

Biotechnologia jest jedną z tych dziedzin, które od lat są wpisane zarówno w panoramę życia naukowego jak i naszą codzienność. Każdego dnia mamy do czynienia z wytworami biotechnologii mającymi zastosowanie m.in. w medycynie, w produkcji żywności, w energetyce oraz w biomateriałach. Takie hasła jak żywność transgeniczna (żywność GM), terapia genowa czy też najbardziej znane terminy: GMO – genetycznie zmodyfikowany organizm

(ang. *genetically modified organism*) i LMO – żywy genetycznie zmodyfikowany organizm (ang. *living modified organism*) weszły do naszego codziennego języka. Jednocześnie elektryzują oraz wzbudzają emocje w społeczeństwie, zarówno wśród przeciwników jak i coraz liczniejszych zwolenników. U podstaw innowacyjnych osiągnięć naukowych i ekonomicznych leży zrozumienie podstaw molekularnych biologii oraz znajomość elementarnych procesów i terminów biochemicznych, na przykład: biosynteza białka, genomika, bioinformatyka, jak i wiele innych. W jeszcze mniejszym stopniu zrozumiałe są konkretne zjawiska, jak: homocysteinyłacja, białko Bt, aptamery, struktura rybosomu i funkcja RNA [1-6].

Zrozumienie podstaw molekularnych procesów metabolicznych – to prawdziwy klucz do sukcesu w zakresie nowoczesnej biotechnologii. Natomiast dla społeczeństwa zasadnicze znaczenie ma informacja, że nawet do 70% artykułów żywnościowych obecnie dostępnych na rynku zawiera jakąś (choćby minimalną) frakcję produktów nowoczesnej biotechnologii; jednakże nie więcej niż jedna trzecia konsumentów wie o tym, a znacznie mniejszy odsetek konsumentów rozumie co to znaczy. Jednocześnie wszyscy się zgadzamy z pozornie banalnym stwierdzeniem, że jedynie wykształcony konsument jest w stanie podjąć świadomą

i merytorycznie uzasadnioną decyzję. Przekazanie zatem społeczeństwu podstaw biochemii i biologii molekularnej ma zasadnicze znaczenie dla rozwoju biotechnologii. Praktycznie wszystkie hormony i przeciwciała monoklonalne tak ważne we współczesnej diagnostyce, profilaktyce i terapii są wytwarzane z zastosowaniem technik inżynierii genetycznej. Dla chorych fakt ten nie ma znaczenia. Rozwój przemysłu w zakresie nowych materiałów (biodegradowalnych biomateriałów), odtwarzalnych źródeł energii (bioenergii jak biopaliwa i biomasa) oznacza konieczność oparcia gospodarki na agrobiotechnologii ukierunkowanej na produkcję przemysłową, a nie spożywczą [7-9].

Pod względem typu transformacji zastosowanej w uprawianych odmianach roślin GM wyraźnie dominuje cecha odporności na herbicyd uniwersalny – stanowi to 80% upraw roślin transgenicznych. Następne w kolejności to odmiany z wprowadzonym genem odporności na owady błonkoskrzydłe (*Lepidoptera*) czyli z tzw. genem Bt (z *Bacillus thuringiensis*) – 12% areалу, a 8% powierzchni zajmują odmiany zawierające jednocześnie geny odporności na herbicyd uniwersalny i geny Bt [2,4-6]

Mechanizm działania i dezaktywacji podstawowych herbicydów uniwersalnych oraz białka Bt jest (w dużym uproszczeniu) następujący:



## GLUFOSYNAT

Glufosynat, czyli fosfotrycyna  $[(\text{HOCH}_2)_3\text{CNHCCH}_2\text{CO}_2]_3\text{P}$ , to składnik aktywny herbicydu uniwersalnego stosowanego przez firmę Aventis (AgrEvo) w wielu preparatach chwastobójczych, np. Basta, Ignite, Challenge, LIBERTY. Glufosynat jest wchłaniany przez części zielone, hamuje aktywność syntazy glutaminowej, a przez to ogranicza detoksyfikację amoniaku. Inaktywację glufosynatu osiągnięto poprzez wydzielenie z bakterii glebowych (charakteryzujących się systemem enzymatycznym rozkładającym glufosynat) białka kodowanego przez gen PAT. Inaktywacja glufosynatu następuje poprzez acetylację katalizowaną przez acetylotransferazę fosfotrycyny.

## GLIFOSAT

Inny herbicyd uniwersalny to RoundUp®, którego składnikiem aktywnym jest glifosat. Herbicyd glifosat niszczy rośliny poprzez inhibicję enzymu EPSPS, który uczestniczy w szlaku biosyntezy aromatycznych aminokwasów u roślin, a nie występuje w szlaku metabolicznym ssaków. Odporność na glifosat nadano roślinom i mikroorganizmom poprzez nadprodukcję EPSPS lub wykorzystanie odpornego na glifosat EPSPS. Soję odporną na glifosat otrzymano poprzez wprowadzenie genu kodującego EPSPS (EPSPS = 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) z bakterii *Agrobacterium* sp. szczepu CP4, do chromosomu soi.

## BIĄŁKA BT

„Białka Bt”. Są to deltaendotoksyny, krystaliczne białka, których wydzielono i scharakteryzowano ok. 100 o proteolitycznej aktywności enzymatycznej. W toku procesu protoksyna (130 kD) zostaje przekształcona do toksyny (60 kD). W trakcie procesu trawienia ma miejsce interakcja krystalicznego białka z receptorem komórek jelitowych i następuje perforacja jelita. Gen *Bt* wprowadzono do następujących roślin: kukurydza, bawełna, rzepak, ryż, ziemniak, soja, kapusta, pomidory, uzyskując ochronę przed owadami. Białko *Bt* jest to białko bakteryjne, którego gen syntetyzowano chemicznie i ekspresję uzyskano w roślinach. W opinii części ekspertów białko *Bt* jest repellentem, a zatem odstrasza od jedzenia, powodując śmierć głodową, a nie następuje ona w wyniku proteolizy.

Soja i kukurydza to dwa gatunki roślin uprawnych, w których produkcji i użytkowaniu, bądź to jako pasza, bądź też jako produkt żywieniowy (także w formie przetworzonych produktów) odmiany GM odgrywają znaczącą rolę. Główną zaletą odmian transgenicznych soi jest możliwość elastycznego stosowania totalnych herbicydów jakimi są RoundUp® czy Basta, w przeciwieństwie do dużej precyzji koniecznej w stosowaniu innych herbicydów (stadium rozwojowe roślin, warunki pogodowe). Większość soi jest importowana z Ameryki Płn. na cele paszowe i, jak dotąd, użytkowanie do tych celów nie jest kontestowane tak gwałtownie jak w przypadku produktów spożywczych.

Kukurydza jest kolejnym gatunkiem, w którym uprawa odmian transgenicznych i eksport uzyskiwanego ziarna odgrywa znaczącą rolę, przy czym udział odmian transgenicznych w uprawie tej rośliny jest znacznie mniejszy niż w przypadku soi. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że wprowadzenie genu *Bt* daje wyraźne zwyżki plonu i korzyści z redukcji oprysków pestycydami. Korzyści te zależą jednak od nasilenia pojawiania się owadziego szkodnika, głównie omacnicy proso-wianki. Kukurydza (MON 810) może być w 2006 r. w naszym kraju uprawiana w skali produkcyjnej.

Charakterystyka komercyjnych produktów i domniemanych zagrożeń genetycznie zmodyfikowanych organizmów związana jest z dostępnością podstawowych danych dla wszystkich zainteresowanych.

Najogólniej ujmując zakres informacji charakteryzujących GMO musi dotyczyć i obejmować następujące dane (ale nie jest on ograniczony do wymienionych): charakterystykę organizmów transgenicznych, ze szczególnym uwzględnieniem wprowadzonych, zmodyfikowanych lub wyłączonych sekwencji kwasów nukleinowych; charakterystykę zamierzonych zastosowań; charakterystykę środowiska, w którym będą realizowane zamierzone działania; interakcje środowiskowe oraz między organizmami.

W opinii przeciwników nowoczesnej biotechnologii dominuje obawa przed żywnością genetycznie zmodyfikowaną, potocznie określaną jako żywność GM, aczkolwiek generalnie jest to strach przed innowacją i obawa przed nowością niezrozumiałą w konsekwencji braku wiedzy o elementarnych procesach molekularnych. Zasadnicze elementy tych obaw zostały bardzo jednoznacznie sformułowane w stanowisku Konwentu Marszałków dotyczącym tworzenia „obszarów wolnych od GMO”, gdzie wśród wielu innych zastrzeżeń przeciwko inżynierii genetycznej, jako zasadnicze można arbitralnie uznać następujące: (...) rozpoczęcie upraw roślin modyfikowanych genetycznie może zaszkodzić wizerunkowi polskiej wsi, postrzeganej aktualnie jako producenta zdrowej i ekologicznej żywności o wysokiej jakości (...); (...) człowiek nigdy nie uzyska kontroli nad biologią życia i nie można zapewnić, że nie dojdzie do niekontrolowanego uwolnienia się organizmów GMO. Należy zwrócić uwagę, że celem upraw roślin modyfikowanych ma być zwiększenie produkcji, podczas gdy problemem rolników w Polsce i w (pozostałych przyp. Autora) krajach Unii jest zbyt produkcja na dotychczasowym poziomie (...); (...) konieczne jest podejmowanie działań w celu zachowania wartości środowiska przyrodniczego oraz zabezpieczenia upraw rolniczych przed wprowadzaniem roślin transgenicznych, które mogą spowodować nieodwracalne zmiany (...); (...) Wychodząc naprzeciw zapotrzebowaniu konsumentów, oczekujących zdrowej i bezpiecznej żywności konieczne jest stwarzanie warunków do produkcji żywności metodami przyjaznymi środowisku (...).

Polemizując z przedstawionym stanowiskiem trzeba stwierdzić, że praktycznie nie ma już żywności, której człowiek w swej działalności nie zmieniłby w sposób istotny (za wyjątek można uznać niektóre grzyby, ryby czy też kraby). Działalność człowieka spowodowała i każdego dnia powoduje nieodwracalne zmiany w środowisku naturalnym i w tej działalności prace

Tabela 1. Polskie normy prawne związane z genetycznie zmodyfikowanymi organizmami

Data	Nazwa ustawy	Dziennik Ustaw
16.03.2001	O rolnictwie ekologicznym	22.06.2001, nr 63, poz. 634
11.05.2001	O żywności i żywieniu	22.06.2001, nr 63, poz. 634
22.06.2001	O GMO	25.07.2001, nr 76, poz. 811
23.08.2001	O paszach	25.10.2001, nr 123, poz. 1350



w zakresie inżynierii genetycznej stanowią minimalny zakres. Jednocześnie faktem jest, że wiele form ludzkiej działalności spowodowało jakieś złe skutki dla ludzi, ale (...) nie ma żadnych udokumentowanych doniesień o negatywnych efektach prac inżynierów genetycznych czy też biologów molekularnych (poza licznymi powieściami sensacyjnymi). Z pewnością prawdziwe jest stwierdzenie dotyczące nadprodukcji żywności w zamożnej Europie, natomiast ta właśnie bogata UE cierpi na brak produktów przemysłowych pochodzenia rolniczego, czyli biomateriałów i bioenergii. Można zatem skwitować nieco ironicznie stanowisko władz samorządowych, że częściowo jest ono prawdziwe, ale nie kompletne.... A wielka to szkoda, bowiem stanowisko władz samorządowych ma istotne znaczenie, np. w planowaniu inwestycji gospodarczych.

Ilustracją skali obaw społeczeństwa jest realizacja ponad 80 projektów badawczych kosztem kilkuset milionów euro, których konkluzje dotyczące żywności GM zawarte są w następujących elementarnych stwierdzeniach [International Life Sciences Institute, 26-28 czerwca 2000 r., Limelette, Belgia]: DNA, włączając rekombinowany DNA, składa się z tych samych czterech nukleotydów; obecnie stosowane techniki rekombinacji w łańcuchu żywnościowym nie powodują zmian w chemicznej charakterystyce DNA (biorąc pod uwagę naturalne zróżnicowanie w sekwencji DNA); nie ma różnic w podatności rekombinowanego DNA i pozostałego DNA na hydrolizę chemiczną lub enzymatyczną; przemiany produktów trawienia DNA nie zależą od pochodzenia DNA; DNA nie jest toksyczne przy zwyczajowych poziomach spożycia; nie ma dowodów potwierdzających alergenne lub inne immunogenne właściwości DNA z konsumowanej żywności zmodyfikowanej genetycznie; nie wyklucza się możliwości obecności, łączenia, ekspresji pozostałych zewnątrzkomórkowych fragmentów DNA z żywności przez mikroflorę przewodu pokarmowego; nie ma dowodów na wbudowywanie DNA ze źródeł pokarmowych w genom ssaków; spożycie żywności zmodyfikowanej genetycznie nie powoduje mierzalnych zmian w całkowitej ilości spożytego DNA.

Podstawowe polskie normy prawne [2,5,6] dotyczące biotechnologii, których celem jest zapewnienie bez-

pieczeństwa biologicznego i ochrony środowiska oraz zdrowia ludzi przedstawia Tabela 1.

Pośród tych norm prawnych najważniejsza jest ustawa „O organizmach genetycznie zmodyfikowanych” (dalej zwana ustawą „O GMO”). Kwestia genetycznie zmodyfikowanych organizmów regulowana jest wieloma aktami prawnymi na poziomie Unii Europejskiej. Ustawa „O GMO” jest zgodna i powstała na podstawie następujących dyrektyw Wspólnot Europejskich: 1) 90/219/EWG z 23 kwietnia 1990r. w sprawie ograniczonego stosowania mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie (Dz. Urz. WE L 117 z 08.05.1990); 2) 98/81/WE z 26 października 1998r. zmieniającej dyrektywę 90/219/EWG w sprawie ograniczonego stosowania mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie (Dz. Urz. WE L 330 z 5.12.1998); 3) 2001/18/WE z 12 marca 2001r. w sprawie zamierzonego uwalniania do środowiska organizmów zmodyfikowanych genetycznie i uchylenia dyrektywy 90/220/EWG (Dz. Urz. WE L 106 z 17.04.2001)

Ustawa o organizmach genetycznie zmodyfikowanych transponuje również zagadnienia przewidziane w **Protokole kartageńskim o bezpieczeństwie biologicznym**, w tym **zasadę przezorności** („... Kto podejmuje działalność, której negatywne oddziaływanie na środowisko nie jest jeszcze w pełni rozpoznane, jest obowiązany, kierując się przezornością, podjąć wszelkie możliwe środki zapobiegawcze...”).

Do zasadniczej ustawy **O GMO** opracowane zostały rozporządzenia wykonawcze dotyczące [5]: oceny zagrożeń dla zdrowia ludzi i środowiska (Dz. U., 2002, nr 107, poz. 944); funkcjonowania Komisji ds. GMO (Dz. U., 2002, nr 19, poz. 196); badań i wydawania opinii w dziedzinie GMO (Dz. U., 2002, nr 73, poz. 674); listy organizmów patogennych oraz ich klasyfikacji (Dz. U., 2002, nr 212, poz. 1798); wzorów wniosków dotyczących zgód i zezwoleń (Dz. U., 2002, nr 87, poz. 797). Wszystkie te normy prawne, jak już wspomniano, są zgodne z ustawodawstwem Unii Europejskiej. W odniesieniu do modyfikacji genetycznych genomu człowieka oraz w sprawach dotyczących żywności i środków farmaceutycznych obowiązują w naszym kraju (jak i w innych krajach UE) osobne regulacje prawne.

Szczególne znaczenie dla rozwoju biotechnologii ma ustawa regulująca zagadnienia własności intelektualnej

(Dz. U., z 17.07.2002 r., nr 108, poz. 945). Ze szczególnym naciskiem podkreślić należy, że w krajach Unii Europejskiej zarówno procesy jak i produkty inżynierii genetycznej spełniają wymogi zdolności patentowej, bowiem patenty są udzielane na wynalazki, które są: nowe, posiadają poziom wynalazczy i nadają się do przemysłowego stosowania.

Zgodnie z art. 10 i art. 24 p.w.p (Polska) oraz art. 52.1 EPC. Przedmiotem wynalazku biotechnologicznego jest: wytwór składający się z materiału biologicznego; wytwór zawierający materiał biologiczny; sposób, za pomocą którego materiał biologiczny jest wytwarzany, przetwarzany lub wykorzystywany.

Należy z całym naciskiem podkreślić, że do wynalazków biotechnologicznych stosujemy cały szereg ograniczeń zdolności patentowej, o charakterze moralnym, etycznym czy też wynikającym z generalnych przesłanek, jak np. niemożność patentowania praw przyrody i odkryć naukowych. Równoległe trzeba pamiętać, że wynalazki opatentowane można bez opłat licencyjnych stosować w celach czysto naukowych i dydaktycznych.

Rozwój Polski i wszystkich krajów, które uznały potrzebę oparcia gospodarki na wiedzy, uwarunkowany jest wdrażaniem innowacyjnych technologii. Jest zatem biotechnologia dziedziną, która towarzysząc naszemu życiu wymaga nieustannego popularyzowania, a także promowania, aby jej rozwój wspierany był przez szerokie kręgi społeczeństwa.

## PIŚMIENICTWO

1. Kwartalnik „Biotechnologia”
2. www.pfb.edu.pl
3. www.oecd.org
4. www.minrol.gov.pl
5. www.mos.gov.pl
6. www.ihar.edu.pl
7. European Union: Action Plan to boost research efforts in Europe, April 2003, IP/03/584 (<http://europa.eu.int/comm/research/era/3pct/pdf/press-rel-en.pdf>)
8. EuropaBio, White Biotechnology: Gateway to a More Sustainable Future, April 2003 ([http://www.europabio.org/upload/documents/wb\\_100403/Innenseiten\\_final\\_screen.pdf](http://www.europabio.org/upload/documents/wb_100403/Innenseiten_final_screen.pdf))
9. OECD, Report: „The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability” (2001) (<http://www1.oecd.org/publications/e-book/9301061e.pdf>)



**SUKCESY POLSKICH NAUKOWCÓW.** W Atlancie, w grudniu ub. roku, podczas dorocznego Zjazdu Amerykańskiego Hematologicznego, ogłoszono informację, iż Polak, **prof. Mariusz Z. Ratajczak** z zespołem wyizolował po raz pierwszy na świecie ze szpiku kostnego komórki embrionalne. Prof. M.Z. Ratajczak jest absolwentem Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie, od 6 lat kieruje Ośrodkiem Transplantacji Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie-Prokocimiu, a równocześnie jest dyrektorem Programu Komórki Macierzystej Centrum Rakowego w uniwersytecie stanowym w Louisville w USA ([www.esculap.pl](http://www.esculap.pl)).

**MARZENA BIENKO, WSPÓŁODKRYWCZYNIĄ ELEMENTU MECHANIZMU NAPRAWY DNA.** Doktorantka (wiek 24 lata) w Instytucie Biochemii Kliniki Uniwersytetu w Frankfurcie jest absolwentką wydziału Biotechnologii UJ. Od września 2004 r. mgr M. Bienko (Fot. 1) kierowała tam projektem, realizowanym m.in. przez naukowców brytyjskich z Uniwersytetu w Sussex i szwajcarskiej Państwowej Wyższej Szkoły Technicznej w Zurychu. Nad zespołem czuwał przełożony p. Bienko, prof. Ivan Dikic. Zespół ustalił, że aktywność polimerazy *eta*, w sytuacji uszkodzenia DNA, i nieskuteczności polimerazy *delta* wobec uszkodzenia, inicjuje ubikwityna. Białko to 'przyczepia się' do białka PCNA, które otacza pierścieniowo uszkodzone DNA. Aminokwasy domen polimerazy *eta* i trzech innych, *iota*, *kappa* i *Rev1* łączą się z aminokwasami ubikwityny, i w ten sposób białka przylączają się do siebie. Zespół p. Bienko odkrył dwie z tych domen. M. Bienko uważa, że odkrycie można wykorzystać w terapii nowotworów. Naprawa uszkodzonego DNA zdrowej komórki z udziałem polimerazy *eta* jest procesem pożądanym, a w komórkach nowotworu musi być zablokowana wymiana polimerazy *delta* na *eta*. Do tego powinny zmierzać nowe strategie chemioterapii (wg [www.mein.gov.pl](http://www.mein.gov.pl)).

**ABSOLWENT WYDZIAŁU MATEMATYKI I INFORMATYKI UJ, PIOTR KOPACZ** został laureatem tegorocznej, IX edycji Konkursu o Nagrodę Procter & Gamble Polska dla Najlepszych Absolwentów Uczelni

Wyższych, prezentując prace magisterską pt. Transformacja Laplace'a. Laureat Nagrody interesuje się matematyką teoretyczną i jej praktycznym zastosowaniem, w szczególności na geometrii nieeuklidesowej oraz nawigacji.

**SZKOLNICTWO WYŻSZE POD ŚCIŚLEJSZĄ KONTROLĄ.** Spotkanie inauguruje ścisłą współpracę między Państwową Komisją Akredytacyjną i komisjami akredytacyjnymi, działającymi z inicjatywy środowisk akademickich, trwało dwa dni w Warszawie, w końcu roku 2005. Wg informacji przewodniczącego Państwowej Komisji Akredytacyjnej (PKA) prof. Zbigniewa Marciniaka z dnia 30 listopada 2005 r., powstał plan utworzenia Forum Jakości różnych komisji akredytacyjnych. Forum ma zapewnić ścisłą kontrolę jakości studiów i pełniejszą informację na temat jej wyników. Forum ma odbywać regularne spotkania i przeprowadzać kontrole jakości studiów w Polsce. Informacje na temat wyników kontroli publikowane będą w przyszłości na stronie internetowej, dostępnej dla każdego studenta. Tematem konferencji były także nowe standardy kierunków studiów, przygotowywane przez Radę Główną Szkolnictwa Wyższego, które mają być dostosowane do wymogów znowelizowanej ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym. Ta ustawa daje największym uczelniom prawo tworzenia własnych, autorskich programów studiów, które będą także przedmiotem kontroli komisji. Wg słów prof. Marciniaka prowadzenie studiów interdyscyplinarnych, z pogranicza dziedzin, lub o wąskiej specjalności przed wejściem w życie Ustawy z formalnego punktu widzenia było niemożliwe. Teraz uczelnie mogą to robić, lecz będą musiały jednak to robić dobrze. Szkoły mogą mieć swobodę w dobieraniu programów i sposobów kształcenia. Zadaniem komisji jest głównie sprawdzanie, czy uczelnia wywiązuje się ze swoich zobowiązań w stosunku do studenta. Nie ma przy tym różnicy, czy kontroli podlega uczelnia państwowa czy prywatna, lub studia dzienne czy stacjonarne. Zdaniem prof. Marciniaka rozwój prywatnego szkolnictwa wyższego w Polsce jest pozytywnym

zjawiskiem, ale oferuje ono jednak ograniczone spektrum kierunków studiów i nie zawsze najwyższą jakość kształcenia. Zatem należy szczególnie

dbać o jakość prywatnych studiów, aby przynajmniej nie było w naszym kraju za dużo źle przygotowanych specjalistów np. od marketingu, skoro już i tak tych dobrze przygotowanych jest tak wielu. (2005-11-30, PAP - Nauka w Polsce, Urszula Jabłońska).



Fotografia 1. Magister Marzena Bienko.

**PODSEKRETARZ STANU D.S. NAUKI W MEIN,** prof. Krzysztof Kurzydłowski

powiedział w końcu listopada ub. roku dla PAP, że budżet na badania naukowe w 2006 r. wzrośnie o 25%, a nie jak wcześniej podano o 40%. Wg Krajowego Programu Ramowego najwyższego dofinansowania wymagają medycyna transplantacyjna i regeneracyjna, optymalizacja rozwoju miast i regionów, zarządzanie kryzysowe w państwie i naromaterialy. Do resortu edukacji i nauki należeć będzie wspieranie mobilności międzynarodowej naukowców i mobilności naukowców pomiędzy sektorami nauki i gospodarki. Oznacza to, że od 2006 r. MEiN zaofertuje zwiększenie nakładów na naukę, tak, aby promować młodych polskich naukowców na arenie międzynarodowej. Muszą oni jednak chcieć pracować w polskich laboratoriach, nawet jeśli mają za sobą sukcesy w pracowniach zagranicznych. Prof. Kurzydłowski uważa, że nadrzędnym celem w Jego działalności jest dbałość o zapewnienie jak najlepszej kariery zawodowej młodym naukowcom. Jednym ze sposobów może być wprowadzenie stypendiów po doktorskich (postdoc), na które prof. Kurzydłowski planuje ogłosić konkursy. Stypendia mają pomóc kontynuować pracę badawczą na etacie „postdoca” osobie ze stopniem doktora, ale pod warunkiem, że dalsza kariera doktora będzie przebiegała w innym ośrodku niż ten, w którym stypendysta uzyskał doktorat (Nauka w Polsce, MEiN).

**SENAT ŚLĄSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ** (uchwała nr 38/2005 z 23 listopada 2005 r.) zaopiniował negatywnie zasady parametrycznej jednostek naukowych wprowadzone Rozporządzeniem MNiI z dnia 4



sierpnia 2005 r. w sprawie kryteriów i trybu przyznawania i rozliczania środków finansowych na naukę (Dz. U. nr 161. poz. 1359). Wyrażono stanowczy protest wobec przedmiotowego traktowania środowisk naukowych w kraju, przejawiający się wprowadzeniem, bez uprzedniej konsultacji i na niejasnych zasadach, zmodyfikowanego systemu oceny parametrycznej jednostek naukowych na mocy Rozporządzenia, o którym mowa wyżej. Wyrażono pogląd, iż procedury oceny parametrycznej winny zostać znowelizowane, po uprzednich konsultacjach środowiskowych (Biuletyn Informacyjny ŚAM, 2005, nr 4).

**FUNDACJA NAUKI POLSKIEJ** opublikowała program wspierania nauki w roku 2006. Na ten cel FNP zamierza przeznaczyć 22,7 mln zł. W programie wspierania FNP oferuje kilkanaście programów o charakterze konkursów skierowanych do środowiska naukowego, w tym kilka nowych. Są to programy: POWROTY w formie subsydiów dla młodych uczonych w kraju po zagranicznym stażu podoktorskim; FOCUS – subsydia dla uczonych będących na etapie organizowania zespołu badawczego; INNOWATOR – szkolenia i pomoc we wdrożeniach; program NOVUM zastąpi dotychczasowy program Subin (wg [www.fnp.org.pl](http://www.fnp.org.pl))

**PROGRAM INNOWATOR** (finansowanie szkoleń i pomoc we wdrożeniach) skierowany jest do doktorantów i młodych doktorów (do 35 lat), zajmujących się dowolną dziedziną nauki. O zakwalifikowaniu kandydata do programu decyduje pomysł przedsięwzięcia innowacyjnego bądź wynalazku przedstawiony przez niego we wniosku konkursowym. Będą rozważane przede wszystkim projekty dotyczące nowoczesnych technologii lub usług. Celem programu jest zaznajomienie naukowców z funkcjonowaniem mechanizmów rynkowych i zasadami działalności biznesowej, oraz pomoc doradcza i finansowa w przygotowaniu innowacyjnych projektów na wczesnym etapie komercjalizacji. Program realizowany będzie w trzech etapach: 1/ wybór 20-25 projektów (technologii lub usług) spośród zgłoszonych, i zaproszenie autorów do udziału w intensywnym 2-4 miesięcznym praktycznym szkoleniu, obejmującym zasady i sposób prowadzenia działalności gospodarczej. Szkolenie zakończy się przygotowaniem przez uczestników planów biznesowych

wdrożenia zgłoszonych przez nich pomysłów; 2/ dofinansowanie przez FNP realizacji kilku najlepszych zgłoszonych projektów autorstwa uczestników kursu, zgodnie z ich planami biznesowymi oraz pomoc finansowa i organizacyjna przy uruchomianiu przedsięwzięcia; 3/ skierowanie laureatów do zewnętrznych instytucji finansowych i pomoc w negocjacjach związanych z pozyskiwaniem dalszego finansowania wdrożeń.

**Termin składania wniosków do I etapu konkursu mija 15 maja b.r. Informacji o programie udziela p. Jakub Wojnarowski, tel. 022 845 95 16, e-mail: [jakub.wojnarowski@fnp.org.pl](mailto:jakub.wojnarowski@fnp.org.pl).**

**PROGRAM NOVUM** wspierać ma finansowo wyjątkowe inicjatywy, o istotnym znaczeniu dla nauki w Polsce, które nie mogą uzyskać dofinansowania z innych źródeł, a zarazem nie są objęte innymi programami FNP. Program NOVUM umożliwi Fundacji elastyczne i szybkie reagowanie na różnorodne potrzeby nauki, wykraczające poza zakres jej aktualnych programów. Zamiarem FNP jest udzielanie pomocy w tworzeniu nowej jakości w nauce, nie zaś w odtwarzaniu czy utrzymywaniu istniejącego stanu. Fundacja nie określa listy działań obejmowanych programem, lecz rozpatruje indywidualnie każdy wniosek, oceniając go wszechstronnie pod kątem jego wartości naukowej lub technicznej, uwzględniając dorobek wnioskodawcy. Ważne jest znaczenie danej inicjatywy dla środowiska oraz ranga naukowa aplikującego go zespołu badawczego. Dofinansowanie przewiduje się dla przykładowych działań (ale nie jedynych): budowa nowej, oryginalnej aparatury badawczej niezbędnej do wykonania określonego projektu badawczego; niewielka modernizacja bazy laboratoryjnej (dotyczy to jedynie sytuacji o charakterze interwencyjnym); krótkoterminowe wyjazdy zagraniczne lub krajowe w celu skorzystania z unikatowej aparatury badawczej; zaproszenie wybitnych uczonych zagranicznych na krótkie pobyty naukowe w Polsce.

**Wnioski składać można w dowolnym terminie. Informacja: Tadeusz Pacholik, tel. 022 845 95 10, e-mail: [tadeusz.pacholik@fnp.org.pl](mailto:tadeusz.pacholik@fnp.org.pl).**

**STYPENDIUM KONFERENCYJNE FNP.** Celem tego programu jest umożliwienie polskim naukowcom udziału w różnych konferencjach. Stypendia mogą

być wykorzystane na dofinansowanie opłaty konferencyjnej, kosztów podróży, wyżywienia i zakwaterowania. O stypendia mogą się ubiegać pracownicy nauki (obywatela polscy) zamierzający wygłosić podczas konferencji referat, komunikat czy prezentować poster, a jednocześnie mają udokumentowany dorobek naukowy, odpowiadający tematycznie konferencji. Ubiegający się o stypendium konferencyjne muszą pracować lub być doktorantami w polskiej szkole wyższej lub instytucji, w których badania naukowe są wpisane w cele statutowe. Procedurą konkursową zajmuje się Towarzystwo Naukowe Warszawskie. Wnioski, przesyłane wyłącznie pocztą tradycyjną na adres TNW, z dopiskiem na kopercie „Stypendia FNP”, przyjmowane będą w terminach: do 28 lutego, do 30 kwietnia, do 30 czerwca i do 30 października. Rozstrzygnięcia nastąpią w terminach: 15 kwietnia, 15 czerwca, 1 września, 1 grudnia. Informacje: Towarzystwo Naukowe Warszawskie, Pałac Staszica, ul. Nowy Świat 72, pok. 6 (parter), tel/fax 022 657 28 26, tel. 022 657 27 18, e-mail: [sekretariat@tnw.waw.pl](mailto:sekretariat@tnw.waw.pl) i na stronie: [www.tnw.waw.pl](http://www.tnw.waw.pl).

W jesiennej 2005 r. edycji konkursu na stypendia konferencyjne FNP dofinansowanie na wyjazd do Austrii otrzymała m.in. Atina Krajewska, doktorantka Centrum im. Brandta Uniwersytetu Wrocławskiego, która wygłosiła we Wiedniu referat poświęcony ochronie informacji genetycznej w Europie na zjeździe asystentów i doktorów, zajmujących się prawem publicznym. Konferencję (znaczące wydarzenie w kręgu niemieckojęzycznej kultury prawnej) organizuje Wydział Prawa Uniwersytetu Wiedeńskiego w dniach 21-24 II 2006 r. Atina Krajewska jest absolwentką Wydziału Prawa, Administracji i Ekonomii Uniwersytetu Wrocławskiego. Interesuje się prawem medycznym, bioetyką, prawami człowieka. Píše pracę doktorską pod kierunkiem prof. Jana Kolasy na temat statusu prawnego ludzkiego DNA w prawie europejskim i prawie wybranych państw członkowskich UE ([www.uw.wroc.pl](http://www.uw.wroc.pl)).

**POLSKIE HONOROWE STYPENDIA NAUKOWE IM. ALEKSANDRA VON HUMBOLDTA** w dziesiątej edycji konkursu, rozstrzygniętej w 2005 roku, otrzymało 5 naukowców niemieckich na sfinansowanie dłuższych pobyków w laboratoriach i zakładach polskich uczelni i instytutów. Prof.





Fotografia 2. Profesor Tomasz Twardowski.

Manfred Göthert z Uniwersytetu w Bonn został zaproszony na 6 m-czny pobyt na Wydziale Farmaceutycznym AM w Białymstoku, a prof. Klaus Hahlbrock z Instytutu Maxa Plancka w Köln spędzi pół roku w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. Prof. Detlef Hommel z Uniwersytetu w Bremen będzie pracował przez rok w Instytucie Fizyki PAN w Krakowie i na wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, a prof. Josef Speth z Forschungszentrum w Jülich i Uniwersytetu w Bonn przyjedzie na 9-miesięczny okres do Instytutu Fizyki Jądrowej PAN w Krakowie. Panią prof. Ursula Kantorczyk z Uniwersytetu w Rostocku zaprosił Instytut Filologii Słowiańskiej Uniwersytetu Szczecińskiego na 6-miesięczny pobyt (wg strony [www. FNP.org.pl](http://www.FNP.org.pl)).

**NAGRODA IM. ARTURA ROJSZCZAKA.** Klub Stypendystów Zagranicznych Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej ustanowił nagrodę im. dr Artura Rojszczaka – tragicznie zmarłego filozofa i członka Klubu. Nagrodą wyróżniani będą corocznie młodzi doktorzy (obrona rozprawy w ciągu ostatnich 2 lat), wyróżniający się osobowością, humanizmem, pasją naukową i dorobkiem badawczym niezależnie od uprawianej przez nich dziedziny naukowej. Kandydatów mogą zgłaszać tylko członkowie Klubu, bowiem tylko oni są fundatorami nagrody. Co prawda FNP wysoko oceniając ideę nagrody zaferowała wsparcie finansowe dla programu Klubu, ale zasada nagradzania przez członków Klubu pozostała nienaruszona. Nagroda, to nie tylko uczczenie pamięci dr Artura Rojszczaka, to narzędzie realizacji statutowych celów działania Klubu, tj. integracji interdyscyplinarnej i międzypokoleniowej środowisk akademickich, wspieranie i promowanie etosu uczonego i nauczyciela oraz krzewienie dobrej praktyki naukowej. Informacje: [www. ksz-fnp.org](http://www.ksz-fnp.org).

**700 MLN ZŁ Z EUROPEJSKIEGO FUNDUSZU SPOŁECZNEGO (EFS)** pozostaje do dyspozycji instytucji, w tym uczelni państwowych i prywatnych, prowadzących studia kształcące pracowników opieki społecznej, organizujące studia na odległość i rozwijające ułatwienia dla niepełnosprawnych. Wśród zadań, realizowanych za pieniądze z EFS, są też badania naukowe, dotyczące problemów bezrobocia i wykluczenia społecznego. Pieniądze muszą być rozdysponowane do końca roku 2006, a niestety wśród blisko 500 wniosków jest jedynie około 20 z uczelni. Środki są w dyspozycji MEiN oraz MPPS (z dn. 20.01.06, wg witryny [www.esculap.pl](http://www.esculap.pl)).

**PREZES POLSKIEJ FEDERACJI BIOTECHNOLOGII, PROF. TOMASZ TWARDOWSKI (FOT. 2), PRZEKAZAŁ STANOWISKO PFB** premierowi rządu RP, ministrom 5 resortów związanych ze sprawą organizmów modyfikowanych genetycznie, 105 posłom – członkom komisji problemowych w Sejmie, 16 wojewodom i marszałkom. Powodem do opracowania pisma o poniższej treści były próby stworzenia w Polsce ‘stref wolnych od genetycznie zmodyfikowanych organizmów’ podejmowane przez przedstawicieli niektórych samorządów, lokalnych grup i polityków.

„Polska Federacja Biotechnologii z niepokojem obserwuje działania zmierzające do ustanowienia w naszym kraju „stref wolnych od genetycznie zmodyfikowanych organizmów”. Uważamy, że działania takie oparte są na błędnych przesłankach naukowych, są sprzeczne ze stanem prawnym oraz będą prowadzić do negatywnych konsekwencji dla naszej gospodarki. Koncepcje takie oznaczają rezygnację z innowacyjnych technologii niezbędnych dla rozwoju ekonomicznego naszego państwa. Ponadto są one sprzeczne z **koncepcją rozwoju zjednoczonej Europy** (strategia lizbońska) i **normami prawnymi Unii Europejskiej** (Sąd Europejski w Luksemburgu w decyzji z 5 października 2005 r. odrzucił wniosek Górnej Austrii o ustanowienie „strefy wolnej od GMO”).

Uważamy, że w Polsce istnieje duży potencjał badawczy w zakresie biotech-

nologii i powinien on zostać optymalnie wykorzystany dla rozwoju naszego kraju. Mechanizmy gospodarcze nie sprzyjają wykorzystaniu własnych nowoczesnych technologii. Nasz kraj ma jednak szansę, aby nie być wyłącznie odbiorcą bioproduktów, ale również **wykreować własne technologie, produkty i miejsca pracy.**

Apelujemy o zachowanie rozwagi w podejmowaniu podobnego typu działań, które naszym zdaniem nie służą rozwojowi Polski. **Prosimy o analizę wyników naukowych, zwrócenie uwagi na fakty, a nie sensacyjne informacje i półprawdy dotyczące zielonej biotechnologii.** Dlatego zwracając się z apelem o merytoryczną analizę związaną z zastosowaniem biotechnologii w rolnictwie, medycynie czy też przemyśle, oferujemy pomoc naukowców – członków Polskiej Federacji Biotechnologii.

P.S. W przypadku zainteresowania chętnie przedstawimy obszernie materiały merytoryczne, jak badania opinii publicznej (np. **prawie 60% polskich rolników** chciałoby mieć szansę wykorzystania biotechnologii), raporty i ekspertyzy, stanowisko autorytetów naukowych i moralnych (np. Arcybiskup Elio Sgreccia, vice-president of the Pontifical Academy for Life).”

**SPOTKANIE EKSPERTÓW I DZIENNIKARZY** (12 stycznia 2006 r.) odbyło się z inicjatywy polskiej firmy biofarmaceutycznej Celon Pharma oraz Agencji PR Kwadrat. W spotkaniu brał udział prof. Andrzej Legocki – prezes PAN, prof. Maciej Żylicz – prezes FNP, prof. Magdalena Fikus – przewodnicząca Rady Programowej Warszawskiego Festiwalu Nauki. Pięć paneli dyskusyjnych wypełniło program spotkania, a dotyczyły one obecnego stanu biotechnologii w Polsce, rozwoju biotechnologii w aspekcie relacji instytucje naukowe – przemysł, zagadnieniu „wiedza, ludzie, pieniądze – czego nam brakuje?”, biotechnologii i najnowszym technologiom, wreszcie inżynierii genetycznej, interferencji RNA w onkologii. Spotkanie łączyło w sobie elementy konferencji prasowej i warsztatów. Krótkie wystąpienia naukowców przeplatały się z dyskusją naukowców, dziennikarzy i przedstawicieli administracji



Fotografia 3. Profesor Maciej W. Grabski.



rządowej, w tym MEiN oraz MG (wg [www.mein.gov.pl](http://www.mein.gov.pl)).

**EUROSCIENCE OPEN FORUM**, którego idea wyrosła ze środowiska naukowego w 1997 r., organizowane jest w Monachium i będzie trwało w dniach 15-19 lipca b.r. W programie przewidziano ponad 70 różnotematycznych sesji, a wśród nich na temat planowania dalszej kariery. Dla młodych naukowców, chcących uczestniczyć w Forum, przewidziane są stypendia podróże i pobytowe. Wszystkie informacje (w jęz. niemieckim lub jęz. angielskim) dotyczące warunków udziału i pomocy finansowej są dostępne w witrynie [www.esof2006.org](http://www.esof2006.org) i u Effrosyni Chelioti (e-mail: [effrosyni.chelioti@w-i-d.de](mailto:effrosyni.chelioti@w-i-d.de)).

**NIEMIECKI KRZYŻ ZASŁUGI DLA PROF. MACIEJA W. GRABSKIEGO.** Prof. Maciej W. Grabski (Fot. 3), wieloletni prezes Fundacji Nauki Polskiej, otrzymał z rąk ambasadora Niemiec w Polsce, p. Reingarda Schweppe, Wielki Krzyż Orderu Zasługi RFN za konsekwentne zabieganie o rozwój współpracy naukowej pomiędzy Polską a Niemcami. Uroczystość uhonorowania Profesora oraz sygnowanie porozumienia o współpracy pomiędzy polskim Ministerstwem Edukacji i Nauki i niemieckim DFG odbyły się w Warszawie dnia 5 grudnia 2005 r. Wg prof. Grabskiego i szefa DFG, prof. Ernsta Ludwiga Winnackera, umawiające się strony pragną, aby tworzone polsko-niemieckie programy badawcze umożliwiały studentom wspólną pracę nad projektem naukowym. Takie projekty prowadzą już Uniwersytety Warszawski i Jagielloński wraz z Uniwersytetem w Heidelbergu, a inne naukowe ośrodki niemieckie są kooperacją zainteresowane. FNP współpracuje nie tylko z DFG, ale także z Fundacjami Aleksandra von Humboldta oraz Volkswagena w Hanowerze, a nieformalnie z niemieckim programem wymiany akademickiej DAAD oraz organizacją KOWI, opiekującą się młodymi naukowcami z Europy Środkowej i Wschodniej.

Prof. Maciej Grabski, członek PAN, (wnuk wybitnego męża stanu - Władysława Grabskiego) jest absolwentem Wydziału Mechaniczno-Technologicznego Politechniki Warszawskiej. Tam



Fotografia 4. Profesor Zbigniew S. Herman.

doktoryzował się i pracował naukowo, uzyskawszy tytuł profesora w 1989 r. Pracę naukową porzucił na rzecz aktywności, której celem jest wspieranie rozwoju nauki polskiej (wg strony internetowej MEiN).

**50-LECIE PRACY PROF. DR HAB. MED., DR H.C. MULTI ZBIGNIEWA STANISŁAWA HERMANA** (Fot. 4) było uroczystości obchodzone w Śląskiej Akade-

mii Medycznej. Konferencja Naukowa, w dniu 17 listopada 2005 r., pod przewodnictwem JM Rektora prof. dr hab. med. Ewy Małeckiej-Tendery, honorująca Jubilata, zgromadziła Jego nauczycieli i mistrzów, przyjaciół, współpracowników i uczniów. Prof. Zbigniew Herman jest kierownikiem Katedry i Zakładu Farmakologii Klinicznej (zorganizowanej przez siebie od podstaw w 1985 r.) ŚAM w Katowicach, specjalistą II<sup>o</sup> w zakresie chorób wewnętrznych, farmakologii oraz farmakologii klinicznej. Dyplom lekarza uzyskał w ŚAM w 1968 r. a tytuł profesora zwyczajnego w 1986 r. Profesor był stypendystą, wykładowcą w różnych renomowanych placówkach naukowych świata. W pracy badawczej zajmował się opracowaniem modelu miażdżycy doświadczalnej oraz lekami przeciwmiażdżycowymi. Od ponad 30 lat Jego badania dotyczą psychofarmakologii oraz farmakologii klinicznej, w tym farmakoimmunologii układu krążenia. Większość oryginalnych prac naukowych Profesora Hermana została ogłoszona w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Nazwisko Profesora znajduje się na liście 150 polskich uczonych najczęściej cytowanych w zakresie nauk medycznych i biologicznych. Aż 192 publikacje Jubilata były cytowane 1631 razy, a jedną z nich zaliczono do „publikacji słynnych” (*famous paper*). Profesor pełnił wiele rozmaitych, wielce odpowiedzialnych funkcji (w Radzie Głównej Nauki i Szkolnictwa, Centralnej Komisji do Spraw Stopni i Tytułów, ŚAM, KBN, Komitetach PAN). Jest członkiem wielu towarzystw naukowych, w tym Polskiego Towarzystwa Biochemicznego od 1963 r. Jest czynnym członkiem Polskiej Akademii Umiejętności (1993 r.) i członkiem korespondentem PAN (2002 r.). Jest Kawalerem Zakonu Rycerzy Maltańskich. Był uhonorowany wieloma odznaczeniami, w tym Krzyżem Komandorskim z Gwiazdą Orde-

ru Polonia Restituta (Biuletyn Informatyczny ŚAM, 2005, 4).

**UPRAWNIENIA DO PRZEPROWADZANIA HABILITACJI** w zakresie nauk medycznych, dyscyplina - biologia medyczna, na Wydziale Farmaceutycznym AM w Białymstoku uzyskano 21 marca 2005 r. Dwa pierwsze kolokwia habilitacyjne przeprowadzono w dniach 21 i 27 października 2005 r. O stopień doktora habilitowanego ubiegały się Panie: dr Halina Gabriel-Porowska na podstawie dorobku i rozprawy p.t. Ekspresja mucyny MUC1 w komórkach nowotworowych hodowanych *in vitro* i jej rola w adhezji do składników macierzy pozakomórkowej oraz dr Krystyna Pawlak na podstawie dorobku i rozprawy p.t. Stres oksydacyjny a zmiany miażdżycowe u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek. Egzaminatorami byli (wg chronologii wydarzeń) wybitni polscy biochemicy: prof. Janina Kwiatkowska - Korczak (Wrocław), prof. Julian Świerczyński, prof. Mariusz Żydowo (obaj z Gdańska), prof. Edward Bańkowski (Białystok) oraz prof. Teresa Banaś (Wrocław), prof. Andrzej Książek (nefrolog, rektor AM w Lublinie), prof. Elżbieta Skrzydlewska (Białystok). Pozytywne, dla ubiegających się doktorów, decyzje Rady Wydziału wymagają zatwierdzenia przez Centralną Komisję do Spraw Stopni i Tytułów.

Uzyskane uprawnienia do habilitacji w zakresie biologii medycznej przez Wydział Farmaceutyczny AM w Białymstoku pozwoliły na uruchomienie studiów doktoranckich; w 2005 roku przyjęto na studia sześciu kandydatów. Fakty te wzmacniają strukturę organizacyjną i prestiż Wydziału oraz świadczą o kontynuacji jego rozwoju (wg artykułu dziekana Wydz. Farmaceutycznego, prof. Jerzego Pałki, opublikowanym w „Medyku Białostockim” 2005;34:1).

**V OGÓLNOKRAJOWĄ KONFERENCJĘ NAUKOWO - SZKOLENIOWĄ N.T. NEUROINFEKCJI** organizuje Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji AM w Białymstoku w dniach 21-22 kwietnia 2006 r. (w imieniu Organizatorów zaprasza prof. Teresa Hermanowska). W programie cztery bloki tematyczne: neuroinfekcje, choroby odkleszczowe, szczepienia i zakażenia szpitalne. Tematyka proponowana w programie I Sesji Konferencji w dniu 21 kwietnia b.r., a mianowicie „Biologia molekularna we współczesnej diagno-



stycie chorób zakaźnych” oraz „Immunologia zapalenia ośrodkowego układu nerwowego”, może stać się interesująca dla szeregu osób zrzeszonych w PTBiochemicznym, tym bardziej, że mieści się w granicach dyscyplin uprawianych przez nie zawodowo. Informacje i zgłoszenia ‘last minute’: tel.: 085 7409 514, faks: 085 7409 515, e-mail: neuroin@amb.edu.pl. Więcej w witrynie: www.neuroin.amb.edu.pl.

**WYDAWNICTWO UJ** proponuje studentom i lekarzom opracowanie „Biostatyka” pod red. Andrzeja Stanisza. Rok wydania 2005. Koszt wysyłki 4,99 zł. W witrynie Wydawnictwa można znaleźć podręczniki, monografie i cenne pozycje przyrodnicze i humanistyczne (www.wuj.pl).

**Teresa Wesołowska**

## KRAJOWA NAGRODA NAUKOWA Z ZAKRESU GENETYKI ROŚLIN IM. STEFANA BARBACKIEGO 2005

Rada Naukowa Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu ustanowiła Krajową Nagrodę Naukową z zakresu Genetyki Roślin im. Stefana Barbackiego. Ideą nagrody jest wyróżnianie młodych naukowców zajmujących się genetyką roślin i promowanie osiągnięć będących rezultatem badań prowadzonych w warunkach krajowych laboratoriów. Nagroda przyznawana jest od 1994 roku corocznie, przez Kapitułę Nagrody, za oryginalne prace badawcze udokumentowane publika-

cją w okresie ostatnich trzech lat, które dotychczas nie były nagradzane.

**W roku 2005 Kapituła przyznała nagrodę II stopnia dr inż. EWIE GRZEBELUS (Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa Akademii Rolniczej im. H. Kołłątaja w Krakowie), za „Badania nad podwajaniem genomu cebuli w kulturach *In vitro* gynogenicznych zarodków”.**

Sponsorami funduszu nagród byli: Poznańska Hodowla Roślin Tulce, „Spójnia” Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze Nochowo, Hodowla Roślin „Danko” Sp. z o.o., Hodowla Roślin Szelejewo Sp. Rolniczych Rolniczych. o., Hodowla Roślin Rolniczych „Nasiona Kobierzyc”, Kobierzycze,

## WSPOMNIENIE

### Profesor Maciej Wiewiórowski (1918 - 2005) - wspomnienie w pierwszą rocznicę śmierci

W dniu 30 marca 2005 roku odszedł od nas Profesor dr Maciej Wiewiórowski, wybitny uczony, uznany autorytet w dziedzinie chemii, nauczyciel i wychowawca wielu pokoleń młodzieży akademickiej.

Profesor Maciej Wiewiórowski urodził się 24 sierpnia 1918 roku w Bagatelce koło Wrześni, jako trzeci, najmłodszy syn nadleśniczego Władysława Wiewiórowskiego. Niestety swego ojca nigdy nie poznał. Władysław Wiewiórowski, współorganizator i uczestnik Powstania Wielkopolskiego zginął w 1919 w walkach z Niemcami. Trud opieki nad synami spoczął więc na jego żonie Emilii Wiewiórowskiej z domu Średzińskiej.

Profesor Maciej Wiewiórowski od najmłodszych lat związany był z Wielkopolską, a szczególnie z Poznaniem, w którym zamieszkał po śmierci ojca. W Poznaniu uczęszczał do szkoły podstawowej oraz do Gimnazjum Humanistycznego im. A. Mickiewicza. Ukończył je wiosną 1936 roku, a jesienią podjął naukę na Uniwersytecie Poznańskim. Początkowo studiował na Wydziale Rolno-Leśnym, jednak

po roku przeniósł się na Wydział Matematyczno-Przyrodniczy. Dopiero co rozpoczęte studia przerwała II Wojna Światowa.

Wojenne losy Profesora Wiewiórowskiego były niezwykle burzliwe. Jako ochotnik wziął udział w Kampanii Wrześniowej. 19 września pod Iłżą dostał się do niewoli niemieckiej, z której uciekł już następnego dnia. Powrócił do domu, do Poznania. Widząc prześladowania, jakim poddawani byli uczestnicy Powstania Wielkopolskiego i ich rodziny, zdecydował się uciec do Generalnej Guberni.

Początkowo przebywał na terenie Częstochowy, Wąchocka i Skarżyska, gdzie jako członek Armii Krajowej brał udział w pracy konspiracyjnej. 21 lutego 1941 roku został aresztowany pod zarzutem sabotażu. Po dwóch latach udało mu się wydostać z więzienia, kontynuował więc działalność podziemną. Ukończył konspiracyjną szkołę podchorążych i już po krótkim czasie pełnił obowiązki oficera łączności przy miejskim sztabie AK. Od marca 1944 ścigany przez władze okupacyjne, ukrywał się w Częstochowie, Bośni,

Krakowie, następnie został skierowany do oddziału partyzanckiego „Wilk”, który aktywnie działał na południu Polski głównie na terenie powiatów Nowy Targ, Nowy Sącz i Limanowa. W wyniku połączenia oddziałów „Wilk” i „Świerk” w lipcu 1944 powstała I Kompania Strzelców Podhalańskich AK, w której kapral podchorąży Maciej Wiewiórowski pełnił funkcję dowódcy drużyny, a następnie dowódcy plutonu. Wraz ze swoim oddziałem brał udział w licznych akcjach, do najważniejszych zaliczyć można: zamach na Sikorę w Jazowsku, zasadzkę na szosie do Szlachtownej od strony Szczawnicy, rozbrojenie posterunku Grenzschtutzu w Kamienicy, zasadzkę na konwoje niemieckie na drodze Krościenko-Czorzstyn, a następnego dnia na szosie koło Tylmanowej, opanowanie stacji kolejowej w Kasinie Wielkiej, zasadzkę na Niemców na stokach Łopienia, zasadzkę na konwój Niemiecki na moście w Kamienicy, wyprawę po broń i umundurowanie na Słowację do Leśnicy, próbę rozbrojenia posterunku żandarmerii w Czarnym Dunajcu i opanowanie stacji kolejowej w Lasku koło Nowego Targu, bitwę w Ochotnicy – odsiecz dla



batalionu „Lamparta”, bitwę z batalionem Wehrmachtu o tartak (przy szosie ze Szczawy do Rzek), w którym zmagazynowane były kontenery zrzutowe z bronią.

Po zakończeniu działań wojennych Maciej Wiewiórowski powrócił do Poznania i kontynuował studia. W 1946 roku uzyskał stopień magistra, a w 1950 doktora filozofii w zakresie chemii, za pracę dotyczącą chemicznych przekształceń kodeiny, wykonaną pod kierunkiem prof. Jerzego Suszki. W latach 1946-1959 pracował w Wyższej Szkole Ekonomicznej w Poznaniu, w której nie tylko nauczał i prowadził badania, lecz również organizował od podstaw nowe pracownie chemiczne. W uznaniu szczególnych zasług położonych dla rozwoju tej uczelni, w 1986 roku został On uhonorowany tytułem doktora *honoris causa* Akademii Ekonomicznej.

Jeszcze jako pracownik Akademii Ekonomicznej Profesor Maciej Wiewiórowski odbył swój pierwszy długoterminowy staż naukowy na Uniwersytecie Wiedeńskim. Na kolejne dwa staże w National Research Council of Canada wyjechał już jako profesor Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza. Na UAM zatrudniony został w 1959 roku, początkowo na stanowisku profesora nadzwyczajnego, a od 1969 roku profesora zwyczajnego. Zdobytą w zagranicznych laboratoriach wiedzę Profesor szeroko propagował i popularyzował w kraju. Był pionierem rozwoju nowoczesnej chemii organicznej i bioorganicznej, opartej na najnowszych technikach spektroskopowych i chromatograficznych. Nawiązane przez Profesora międzynarodowe kontakty naukowe zaowocowały w krótkim czasie licznymi wyjazdami młodszych pracowników naukowych do najlepszych europejskich, amerykańskich i japońskich ośrodków badawczych. Równocześnie na zaproszenie Profesora, poznańskie uczelnie i instytuty odwiedzane były przez wielu wybitnych uczonych z całego świata.

W roku 1969 Profesor Wiewiórowski został powołany na stanowisko kierownika Zakładu Stereochemii. W tym samym roku z Jego inicjatywy Zespół Katedr Chemii na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii UAM, uległ prze-

kształceniu w Instytut Chemii (załączek przysłego Wydziału Chemii), którego pierwszym dyrektorem został Profesor Maciej Wiewiórowski. W latach 1968-1972 sprawował On funkcję prorektora ds. nauki Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Od roku 1955 Profesor podjął dodatkowo pracę w Polskiej Akademii Nauk. W 1965 roku został członkiem korespondentem, a w 1977 r. członkiem rzeczywistym PAN. Początkowo kierował laboratorium należącym do Instytutu Genetyki Roślin PAN, następnie do Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, a od 1969 roku Zakładem stanowiącym część Instytutu Chemii Organicznej PAN. W tym okresie Profesor Wiewiórowski stworzył w oparciu o młodych ludzi pracujących pod Jego kierownictwem w Instytucie Chemii UAM i w Zakładzie Stereochemii Produktów Naturalnych ICHO PAN nowy zespół badawczy zajmujący się chemią i biochemią kwasów nukleinowych. W 1974 nowopowstała grupa przeniesiona zostaje z uniwersytetu do zupełnie nieprzygotowanych do badań chemicznych budynków usytuowanych w Poznaniu przy ulicy Noskowskiego. W ten oto sposób stworzony został załączek samodzielnego Zakładu przekształconego następnie w roku 1988 w Instytut Chemii Bioorganicznej PAN. Jego pierwszym dyrektorem został Profesor M. Wiewiórowski – pełnił tę funkcję do czasu przejścia na emeryturę.

Obok pracy badawczej Profesor Wiewiórowski angażował się także w działania organizacyjne na rzecz całego środowiska naukowego. Piastował szereg zaszczytnych funkcji np.: w latach 1969-1983 był członkiem Prezydium PAN, a pod koniec tego okresu (1981-1983) Wiceprezesem PAN, w latach 1972-1980 Sekretarzem Naukowym Oddziału Poznańskiego PAN, w latach 1985-1988 Prezesem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Chemicznego, pomiędzy 1973 a 1979 Przewodniczącym Centralnej Komisji Kwalifikacyjnej Kadr Naukowych.

Osiągnięcia Profesora w pracy badawczej, jak i organizacyjnej zostały uhonorowane wieloma nagrodami i odznaczeniami. Jednak najbardziej oczywistym i widocznym dowodem Jego dokonań jest stworzona szkoła. O



Profesor Maciej Wiewiórowski

jej sile świadczą: dziesiątki magistrów, którzy ukończyli studia pod opieką naukową Profesora Wiewiórowskiego, trzydziestu ośmiu wypromowanych doktorów, z których większość uzyskała już tytuły profesorskie, ponad dwieście opublikowanych rozpraw naukowych, wykształcenie wysoko wyspecjalizowanej kadry, która w ramach Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN podjęła nową w naszym kraju tematykę badawczą dotyczącą chemii, biochemii i biologii kwasów rybonukleinowych.

Profesor Maciej Wiewiórowski to postać wielkiego uczonego, światowej sławy chemika, któremu dane było żyć i działać w trudnych czasach niosących piętno dwóch zbrodniczych totalitaryzmów: faszystowskiego i komunistycznego. Był On jednym z ludzi, którzy zdecydowali o kształcie nauki polskiej w drugiej połowie XX wieku, jednym z tych, którzy umożliwili jej rozwój i kontakt z wolnym światem. Prowadzone przez Profesora badania wyróżniały się nadzwyczajną odwagą, wytrzymałością i systematycznością. Wymagając od siebie bardzo wiele, oczekiwał od swoich współpracowników, by podążali za Nim jedynie z chęci uczestnictwa w pasjonujących badaniach. W zamian stwarzał im szansę osiągnięcia wymarzonych celów i sprawdzenia swoich możliwości. Profesor Wiewiórowski był nie tylko wielkim naukowcem, wizjonerem, lecz także pełnym humoru i życzliwości człowiekiem. Takim też pozostanie na zawsze w mojej pamięci.

**Marek Figlerowicz**

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań



Adam A. Gołabek 

Department of Developmental Neurobiology,  
NYS Institute for Basic Research, Staten Island,  
USA

Department of Developmental Neurobiology,  
NYS Institute for Basic Research, 1050 Forest  
Hill Road, Staten Island, NY 10314 USA;  
e-mail: adamgolabek@yahoo.com, tel. (01) 718  
494 52 08, faks: (01) 718 982 63 46

Artykuł otrzymano 11 lipca 2005 r.  
Artykuł zaakceptowano 27 lipca 2005 r.

**Słowa kluczowe:** CLN, ceroidolipofuscynoza neuronalna, autoaktywacja, TPP I, tripeptydylo-peptydaza I, glikozylacja, GAG, glikozaminoglikany

**Wykaz skrótów:** CLN - ceroidolipofuscynoza neuronalna; GAG - glikozaminoglikany; OUN - ośrodkowy układ nerwowy; TPP I - tripeptydylo-peptydaza I

**Podziękowania:** Praca finansowana przez NYS OMRDD i Narodowy Instytut Zdrowia (NIH-USA) (grant NS047335)

## STRESZCZENIE

Tripeptydylo-peptydaza I (TPP I) jest kwaśną peptydazą lizosomalną odcinającą tripeptydy z wolnego N-końca oligopeptydów. U człowieka TPP I stanowi integralną część lizosomalnego aparatu proteolitycznego, w skład którego wchodzi szereg enzymów hydrolitycznych, głównie proteaz cysteinowych (katepsyna B, C, H, K, L i inne) ale także serynowych (katepsyna A) i aspartylowych (katepsyna D). Połączenie aktywności endo- i egzopeptydazowej tych enzymów pozwala na wydajne trawienie różnorodnych białek transportowanych do lizosomów, uwalniając wolne aminokwasy i dipeptydy, które są następnie ponownie transportowane do cytoplazmy i powtórnie używane w procesach metabolicznych, takich jak np. synteza białek. O dużym znaczeniu TPP I dla prawidłowego funkcjonowania lizosomów człowieka świadczy powiązanie tego enzymu z jedną z form grupy genetycznie uwarunkowanych postępujących schorzeń neurodegeneracyjnych u dzieci - ceroidolipofuscynoza neuronalnych. Celem tego artykułu jest omówienie wyników ostatnich badań własnych nad biologią i patologią białka TPP I. Omówienie to jest poprzedzone krótką charakterystyką ceroidolipofuscynoza neuronalnych, ze szczególnym uwzględnieniem formy CLN2 powodowanej mutacjami w genie kodującym TPP I.

## WPROWADZENIE - CHOROBY SPICHRZENIOWE

Lizosomy komórek ssaków to obłoniony, kwaśny przedział wewnątrzkomórkowy, o nie do końca wyjaśnionej biogenezie, którego jedną z podstawowych funkcji jest degradacja makrocząsteczek pochodzenia zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowego. W degradacji tej pośredniczy ok. 50-60 rozpuszczalnych hydrolaz [1]. Mutacje tych enzymów prowadzą do różnorodnych lizosomalnych chorób spichrzeniowych, gdzie zazwyczaj głównym materiałem spichrzanym jest bezpośredni substrat danego enzymu, ale też gromadzi się wiele innych, pozornie nie związanych, metabolitów. W pozostałych lizosomalnych chorobach spichrzeniowych mutacje dotyczą białkowych kofaktorów enzymów, białek związanych z biosyntezą i transportem wewnątrzkomórkowym enzymów lizosomalnych, jak też białek błonowych lizosomów i innych przedziałów komórkowych na szlaku sekrecyjnym (siateczki śródplazmatycznej czy aparatu Golgiego) o jeszcze niejasnej funkcji. Obecnie rozróżnia się ponad 40 lizosomalnych chorób spichrzeniowych. Spichrzany materiał ma zazwyczaj specyficzną morfologię i mikroskopia elektronowa tkanki biopsyjnej jest zazwyczaj jednym z ważnych kryteriów diagnostycznych tych chorób. Inkluzje te mogą albo występować wyłącznie w tkankach obwodowych (a nawet tylko w jednym typie komórek) lub też gromadzenie może być uogólnione i obejmować również ośrodkowy układ nerwowy (OUN). Stąd też wynika cała gama objawów klinicznych w chorobach spichrzeniowych, od obwodowych do neurologicznych. Najczęstszą grupę neurodegeneracyjnych chorób spichrzeniowych wieku dziecięcego i zarazem najbardziej agresywną w przebiegu stanowią ceroidolipofuscynoza neuronalne (CLN).

## CEROIDOLIPOFUSCINOZY NEURONALNE

Ceroidolipofuscynoza neuronalne są chorobami wrodzonymi, dziedzicznymi autosomalnie recesywnie z wyjątkiem rzadkiej postaci wieku dojrzałego, dziedziczonej w sposób autosomalny dominujący. Termin „ceroidolipofuscynoza neuronalne” podkreśla dwie ważne cechy tych schorzeń: dominujące zajęcie ośrodkowego układu nerwowego oraz histochemiczne właściwości lizosomalnego materiału spichrzeniowego przypominające zarówno lipofuscynę, czyli tzw. pigment starczy jak też ceroid, czyli materiał gromadzący się między innymi w przebiegu marskości wątroby [2].

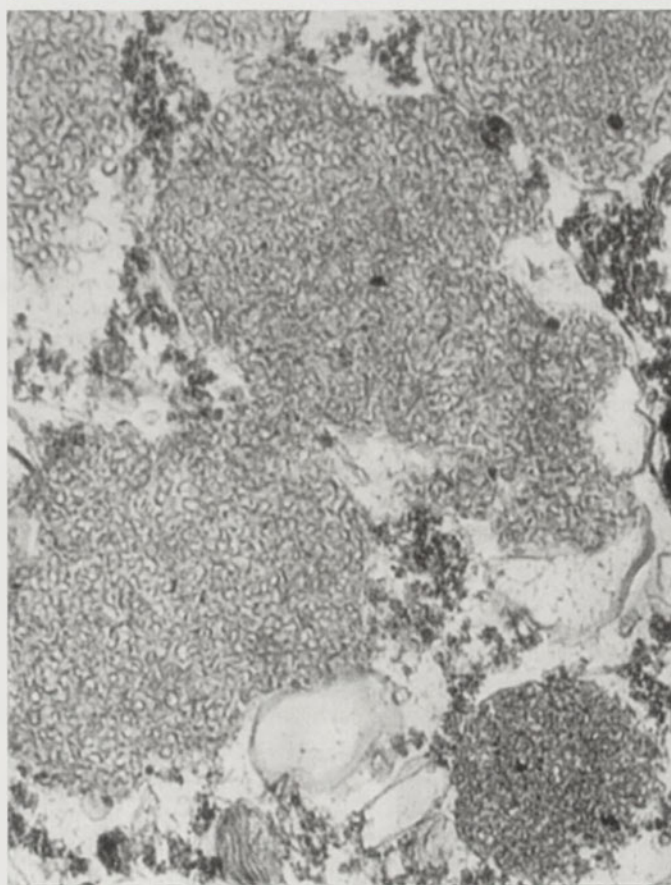
Obecnie obowiązująca, genetyczna klasyfikacja obejmuje osiem postaci ceroidolipofuscynoza neuronalnych (CLN1-CLN8). W sześciu postaciach (CLN1, CLN2, CLN3, CLN5, CLN6 i CLN8) czynnik genetyczny został już poznany.



Geny odpowiedzialne za te postaci kodują rozpuszczalne białka lizosomalne (CLN1, CLN2, CLN5), białko błony lizosomalnej (CLN3) oraz białka siateczki śródplazmatycznej (CLN6, CLN8). Pomimo tak znacznej heterogenności genetycznej i przypuszczalnie również różnej funkcji białek kodowanych przez geny CLN, poszczególne postaci CLN łączą istotne cechy wspólne. Wszystkie postaci CLN mają podobny obraz kliniczny z postępującym otępieniem, postępującymi zaburzeniami widzenia (z wyjątkiem postaci CLN4), padaczką, zaburzeniami ruchowymi i zespołem mózdzkowym [3]. Materiał spichrzeniowy gromadzący się w lizosomach we wszystkich formach CLN wykazuje autofluorescencję w świetle UV, jest PAS-dodatni, barwi się Sudanem czarnym B oraz błękitem Luxolu oraz zawiera lipidy, w tym pochodne dolicholi [4], związki cukrowe, metale i białka (podjednostkę c mitochondrialnej ATP-azy i/lub saponyny A i D) [5,6]. Ceroidolipopigment gromadzi się w wielu tkankach i narządach, ale postępujące uszkodzenia strukturalne występują tylko w ośrodkowym układzie nerwowym. W obrazach z mikroskopii elektronowej można spotkać nie tylko jednorodne inkluzje lizosomalne o typie ziarnistych złogów osmofilnych, ciał skrętlinijnych (Rys. 1A), typu linii papilarnych czy ciał prostolinijnych, ale również inkluzje mieszane [3,7,8].

#### KLASYCZNA PÓŹNONIEMOWLĘCA POSTAĆ CLN (CLN2)

Mutacje w genie kodującym TPP I (*cln2*) są odpowiedzialne za klasyczną późnoniemowlęcą postać CLN (CLN2, choroba Jansky'ego-Bielschowsky'ego). CLN2 jest jedną z częstszych postaci CLN i najczęstszą w polskiej populacji [9]. Częstotliwość występowania wynosi około 0,46 na 100 000 żywych urodzeń. Schorzenie rozpoczyna się w 2-4 roku życia od trudno poddających się leczeniu napadów padaczkowych, hipotonii i ataksji mózdzkowej, do których dołącza się upośledzenie umysłowe i postępujące zaburzenia widzenia prowadzące do ślepoty, następnie spastyczność i zaburzenia połykania. Zgon następuje pod koniec pierwszej i w drugiej dekadzie życia. Rzadkie, młodzieńcze przypadki CLN2 ujawniają się około 6-8 roku życia i mają łagodniejszy przebieg kliniczny [10].



Rysunek 1A. Biologia i patologia białka TPP I. Liczne inkluzje skrętlinijne wśród ziaren glikogenu w komórce wydzielniczej gruczołu potowego skóry pacjenta z CLN2. Obraz z mikroskopii elektronowej. Powiększenie ok. 53 000X.

CLN2 jest pierwszą lizosomalną chorobą spichrzeniową, której etiologia została poznana poprzez porównawczą analizę białek w mózgach pośmiertnie pobieranych od osób chorych i zdrowych (kontrola) przy użyciu łączonej techniki proteomicznej i immunoblottingu z zastosowaniem znakowanego radioaktywnie receptora mannozo-6-fosforanu [11]. Białko niezmiernie nieobecne w materiale uzyskanym od chorych miało masę cząsteczkową około 46 kDa. Białko to oczyszczono następnie przy pomocy chromatografii powinowactwa na kolumnie ze sprzężonym receptorem man-



Rysunek 1B. Biologia i patologia białka TPP I. Komórki CHO ze stałą nadekspresją TPP I człowieka. Struktury pozytywnie wyznakowane na TPP I (kolor zielony, RAS 307) wykazują podobną lokalizację wewnątrzkomórkową do białka LAMP (z ang. *lysosomal-associated membrane protein* - białko związane z błoną lizosomalną, często używany marker lizosomalny) (kolor czerwony, przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko białku LAMP) na obrazie nałożonym (kolor żółty). Jądra komórkowe wybarwione jodkiem propidyny. Obraz uzyskany w mikroskopie konfokalnym. Powiększenie ok. 1000X.



nozo-6-fosforanu i zsekwenconowano. Gen odpowiedzialny za CLN2 został zmapowany do chromosomu 11p15 [12]. Początkowo uważano, że białko CLN2 jest nowym, dotychczas nieznanym białkiem wykazującym znaczne podobieństwa w sekwencji aminokwasowej do grupy bakteryjnych peptydaz karboksylowych niewrażliwych na hamowanie pepstatyną A. Jednak późniejsza analiza baz danych wykazała, że sekwencja aminokwasowa białka CLN2 odpowiada w istocie sekwencji tripeptydylo-peptydazy I [13]. Aktywność tripeptydylo-peptydazową opisano wiele lat wcześniej w homogenatach płata przedniego przysadki [14], choć enzym udało się oczyścić częściowo [15, 16] a następnie całkowicie [17,18] znacznie później.

TPP I jest peptydazą lizosomalną (Rys. 1B) biorącą udział w proteolitycznym odcinaniu tripeptydów z wolnych N-końców niskocząsteczkowych polipeptydów [13,17,18]. Naturalne substraty TPP I nie są jeszcze znane. Podjednostka c mitochondrialnej ATP-azy stanowi około 85% białkowego składnika materiału spichrzanego w OUN u chorych i istnieją przesłanki wskazujące, że TPP I jest jednym z enzymów lizosomalnych uczestniczących w degradacji tego białka. Gromadzenie podjednostki c mitochondrialnej ATP-azy nie jest jednak patognomoniczne dla CLN, ponieważ występuje także w innych chorobach spichrzeniowych, choć w mniejszym nasileniu i głównie w ośrodkowym układzie nerwowym [18-20]. Drugi zidentyfikowany składnik białkowy spichrzanego materiału w CLN2 stanowią saponiny A i D, gromadzone jednak w niewielkich ilościach.

## DYSTRYBUCJA TPP I U CZŁOWIEKA

Obecność materiału w lizosomach w wielu typach komórek i narządów u chorych sugerowała, że TPP I jest enzymem powszechnie obecnym w tkankach człowieka, choć niezbędnym do przeżycia jedynie dla komórek nerwowych ośrodkowego układu nerwowego. Dlatego też własne badania TPP I rozpoczęto od analizy rozmieszczenia tego białka w tkankach i narządach człowieka ze zwróceniem szczególnej uwagi na ośrodkowy układ nerwowy, zarówno podczas procesu dojrzewania w warunkach prawidłowych jak też w dojrzałym w różnych stanach patologicznych.

Ponieważ przeciwciała przeciwko TPP I nie są dostępne komercyjnie, w badaniach posłużono się własnymi przeciwciałami monoklonalnymi oraz poliklonalnymi. Jako antygen do immunizacji zwierząt posłużył polipeptyd wyizolowany z bakterii *E. coli* transformowanych plazmidem pET22b ze wstawką kodującą sekwencję dojrzałego białka TPP I człowieka. Pomimo, że sekwencja TPP I w tym konstrukcie była poprzedzona sekwencją liderową *pelB*, polipeptyd TPP I nie był eksportowany do przestrzeni periplazmatycznej bakterii ale trafiał do ciał inkluzyjnych. Zdenaturowane białko TPP I zostało oczyszczone z wyizolowanych ciał inkluzyjnych dzięki kilkuetapowej procedurze wykorzystującej chromatografię jonowymienną w obecności mocznika, filtrację żelową i preparatywną elektroforezę w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących.

Oczyszczona TPP I została użyta do immunizacji królików i myszy. W wyniku immunizacji uzyskano wysoce swoiste przeciwciała poliklonalne (RAS307, które oczysz-

czono na kolumnie immunopowinowactwa ze sprzężonym antygenem) oraz przeciwciała monoklonalne (nadsączka hodowlane), spośród których klony 2E12 i 8C4 wykorzystywano do dalszych badań.

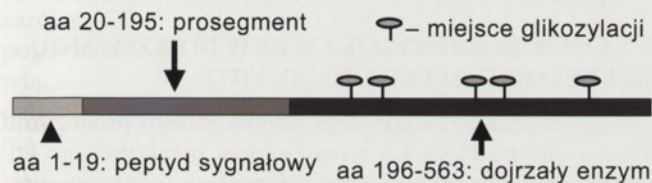
Badania immunohistochemiczne wykazały, że u dorosłego człowieka TPP I występuje w wielu typach komórek i tkanek, choć najmocniejsze znakowanie jest w komórkach biorących udział w produkcji hormonów peptydowych i neuropeptydów [21]. W mózgu płodowym, immunoreaktywność TPP I pojawia się najwcześniej w komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych, komórkach nabłonkowych spłotu naczyńiówkowego oraz komórkach wyściółki. Neuronalne barwienie TPP I pojawia się później, około 22-24 tygodnia życia płodowego, obejmując stopniowo coraz liczniejsze populacje komórek nerwowych i osiągając ostateczny obraz typowy dla mózgu dorosłego około 2-ego r.ż., zatem w wieku pojawiania się pierwszych klinicznych objawów CLN2. Zwiększona immunoreaktywność TPP I towarzyszyła różnym chorobom neurodegeneracyjnym, lizosomalnym chorobom spichrzeniowym, procesowi starzenia mózgu, stanom zapalnym i niektórym, bardziej zróżnicowanym typom nowotworów. Analiza przy pomocy immunoblottingu wykazała około 2,5 raza wyższy poziom TPP I w mózгах osób starszych w stosunku do osób młodszych i około 2-krotnie wyższy poziom w mózгах zmarłych z chorobą Alzheimerera w stosunku do osób zdrowych w porównywalnym wieku. Obserwacje te, łącznie z powszechnym występowaniem TPP I sugerowały, że TPP I nie jest enzymem o określonej, wąskiej specyficzności substratowej ale raczej enzymem włączonym w ogólny obrót metaboliczny i degradację białek. Wydaje się zarazem, że poziom TPP I w komórce jest wynikiem funkcjonowania różnych mechanizmów regulacyjnych czego wyrazem jest zwiększona ilość TPP I zaobserwowana w wielu stanach patologicznych.

## PODSTAWY MOLEKULARNE CLN2

Dotychczas opisano 53 różne mutacje chorobotwórcze w genie kodującym TPP I, spośród których 28 ma charakter zmiany sensu. Jednak najczęstszymi, tzw. powszechnymi mutacjami, są mutacja nonsensowna Arg208STOP oraz mutacja miejsca składania transkryptów IV55-1G>C, obecne w około 60% chromosomów CLN2 [22,23]. W celu zbadania w jaki sposób mutacje chorobotwórcze wpływają na poziom, aktywność i dystrybucję tkankową białka TPP I użyto metody immunohistochemicznej, immunoblottingu i pomiaru aktywności enzymatycznej TPP I. Jak stwierdzono, mutacje chorobotwórcze powodują brak lub znaczący spadek aktywności enzymatycznej TPP I i w większości przypadków (z wyjątkiem mutacji reszty aminokwasowej w miejscu aktywnym Ser475), brak wykrywalnego białka przy użyciu immunoblottingu lub immunohistochemii w materiale od chorych, czy to w mózгах uzyskanych od zmarłych pacjentów czy też w limfocytach lub fibroblastach od chorych [24]. Jedynie w jednym przypadku spośród piętnastu przebadanych, we frakcji lizosomalnej hodowlanych fibroblastów uzyskanych od pacjenta o nietypowym, łagodniejszym przebiegu choroby, stwierdzono obecność TPP I, choć w bardzo małej ilości oraz znikomą, ale mierzalną aktywność TPP I. Interesującym jest, że TPP I była nieobecna przy użyciu metod immunohistochemicznych i immu-



noblottingu nie tylko u chorych z mutacjami prowadzącymi do znacznego skrócenia białka (mutacje nonsensowne czy składania transkryptu) ale także z mutacjami zmiany sensu. Obserwacje te sugerują, że mutacje typu zmiany sensu TPP I prowadzą do zaburzeń w fałdowaniu białka i jego degradacji w systemie ERAD (ang. *endoplasmic reticulum-associated degradation*). Choć problem ten wymaga dalszych badań, rodzi to nadzieję, że w przyszłości możliwe będzie opracowanie skutecznego leczenia, dla tej szczególnej grupy chorych, opartego o poprawę fałdowania w siateczce śródplazmatycznej przy pomocy tzw. farmakologicznych chaperonów (niskocząsteczkowych związków chemicznych, które podobnie do klasycznych chaperonów, czyli białek opiekuńczych, ułatwiają fałdowanie białek). Brak wykrywalnego TPP I przy użyciu metody immunoblottingu został opisany także przez japońskich badaczy [25]. Obserwacja ta skłoniła autorów do zaproponowania zastosowania metody immunoblottingu do powszechnej diagnostyki chorych. Należy jednak podkreślić, że przypadki analizowane przez badaczy japońskich nie były zweryfikowane pod względem genetycznym. Obserwacje własne wskazują, że przynajmniej jedna ze znanych obecnie mutacji, mutacja typu zmiany sensu reszty aminokwasowej w miejscu aktywnym Ser475, nie zaburza w sposób istotny biosyntezy i poziomu



Rysunek 2. Schemat struktury proenzymu TPP I z zaznaczonymi miejscami glikozylacji.

TPP I, ale prowadzi do wytworzenia nieaktywnego enzymu [26]. Znacznie zatem pewniejsza dla rutynowej diagnostyki CLN2 jest metoda biochemiczna oparta na pomiarach aktywności tripeptydylo-peptydazowej w hodowlanych fibroblastach lub limfocytach uzyskanych od chorych [27].

## BIOSYNTETA I DOJRZEWANIE WEWNĄTRZKOMÓRKOWE TPP I

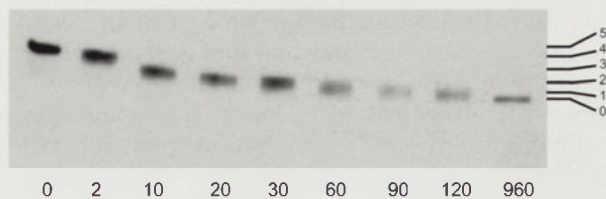
Podobnie jak wiele innych proteaz lizosomalnych, TPP I jest syntetyzowana jako preproenzym. Preproenzym TPP I zawiera 563 reszt aminokwasowych obejmujących 19-aminokwasową sekwencję sygnałową, 176-aminokwasową N-końcową prodromę odcinaną w trakcie dojrzewania oraz dojrzały enzym złożony z 368 reszt aminokwasowych (Rys. 2) [11]. Następne badania jakie przeprowadzono miały zatem na celu ocenę biogenezy TPP I w warunkach pozaustrojowej hodowli komórkowej oraz analizę mechanizmów aktywacji proenzymu prowadzących do wytworzenia dojrzałego, enzymatycznie aktywnego białka w warunkach *in vitro*. Badania te przeprowadzono posługując się dwoma systemami nadekspresji TPP I w komórkach jajnika chomika chińskiego (komórki CHO, ang. *Chinese hamster ovary*). Pierwszy system obejmował umiarkowaną nadekspresję TPP I człowieka i był wykorzystany do badań komórkowej TPP I w warunkach pozaustrojowej hodowli komórkowej. System drugi, prowadzący do uzyskania wysokiej nad-

ekspresji białka obejmował podwójną selekcję genetycznie zmodyfikowanych komórek CHO; najpierw przy użyciu antybiotyku (hygromycyny) a następnie namnożenia/wzmocnienia przy pomocy antymetabolitu – metotreksatu. Celem użycia tego systemu było uzyskanie wysokiego poziomu wydzielania proenzymu TPP I do nadszycy hodowlanych pozwalającego na uzyskanie znacznych ilości oczyszczonego białka niezbędnych do dalszych badań *in vitro*.

Badania biosyntezy wykazały, że TPP I człowieka jest początkowo syntetyzowana jako polipeptyd o masie ~68 kilodaltonów (kDa), który podlega proteolitycznemu cięciu z wytworzeniem postaci przejściowej o masie cząsteczkowej około 50 kDa [26]. W wyniku działania egzoglikozydaz, forma ta jest następnie częściowo deglikozylowana co prowadzi do powstania dojrzałego enzymu o masie cząsteczkowej około 48 kD. Czas półtrwania proenzymu w komórkach CHO wynosi około 2,3 godz, a dojrzałego enzymu około 20 godz. Czynniki, które zmieniały pH wewnątrzkomórkowych kwaśnych organelli (jak monenzyna czy bafilomycyna A) lub wpływały na wewnątrzkomórkowy transport pęcherzykowy (jak brefeldyna czy bafilomycyna A), jak też hamowały fuzję pomiędzy późnymi endosomami a lizosomami (blok temperaturowy i 3-metyloadenina) również hamowały dojrzewanie proenzymu TPP I w komórkach, co wskazuje, że proces dojrzewania TPP I ma miejsce w lizosomach.

## GLIKOZYLACJA TPP I

Jedną z ważnych modyfikacji posttranslacyjnych enzymów lizosomalnych jest glikozylacja typu N. Wszystkie dotychczas opisane kwaśne hydrolazy są N-glikozylowane i zawierają od jednej do siedmiu reszt cukrowych typu N [28,29]. Glikozydy typu N uczestniczą w procesach fałdowania glikoprotein w siateczce śródplazmatycznej, zapewniają transport do lizosomów większości kwaśnych hydrolaz, poprawiają stabilność glikoprotein i mogą wpływać na ich aktywność enzymatyczną [30]. TPP I ma pięć potencjalnych miejsc glikozylacji typu N w pozycjach Asn210, 222, 286, 313 i 443 (Rys. 2). Zatem celem następnych badań było wykazanie, które z miejsc glikozylacji typu N są wykorzystywane przez TPP I oraz jaką rolę pełnią poszczególne reszty cukrowe typu N. Analiza TPP I przy zastosowaniu enzymów deglikozylujących (endo H oraz PNGazy F) (Rys. 3) [26] i meta-



Rysunek 3. Ograniczona deglikozylacja *in vitro* oczyszczonego proenzymu TPP I. Około 100 ng pro-TPP I inkubowano w obecności niewielkiej ilości N-glikozydazy F (PNG-azy F) przez różny okres czasu (w minutach, jak zaznaczono u dołu blotu) i następnie analizowano przy pomocy immunoblottingu z użyciem przeciwciała monoklonalnego 8C4. Stopniowa deglikozylacja prowadziła do tworzenia pro-TPP I o podwyższonej ruchliwości elektroforetycznej w żelu. Poziomy kolejnych prążków zawierających kolejno od góry do dołu 5, 4, 3, 2, 1 i 0 dołączonych N-glikozydów zaznaczono po prawej stronie blotu. Przeciwciało 8C4 uzyskano w wyniku immunizacji myszy zdenaturowanym polipeptydem odpowiadającym dojrzałej formie TPP I człowieka. Polipeptyd ten oczyszczono z bakterii (tak więc był bez modyfikacji cukrowych) stransformowanych odpowiednim wektorem kodującym TPP I człowieka. Fuzję i selekcję komórek hybrydowych myszy przeprowadzono przy użyciu standardowych metod.



boliczne znakowanie TPP I radioaktywnymi aminokwasami w obecności tunikamycyny wykazały, że N-glikozydy dodają ok. 10 kDa do końcowej masy enzymu, co sugerowało, że wszystkie pięć potencjalnych miejsc glikozylacji typu N jest wykorzystywane przez TPP I w warunkach *in vivo* [26]. Ponieważ dojrzały enzym był częściowo oporny na działanie endo H to oznacza, że część N-glikozydów w dojrzałym białku ma złożony/hybrydowy charakter. W celu bardziej szczegółowego określenia roli poszczególnych reszt cukrowych typu N dla biologii TPP I, przygotowano szereg mutantów TPP I, w których albo pojedynczo albo w kombinacji zamieniono Asn w sekwencji Asn-Xaa-Ser/Tyr na Gln [31]. Usunięcie miejsca glikozylacji Asn286 powodowało znaczne zaburzenia fałdowania TPP I w siateczce śródplazmatycznej. Jednakże w przeciwieństwie do innych białek, które przy braku prawidłowego ufałdowania są zatrzymywane w siateczce śródplazmatycznej, proenzym mutanta TPP I Asn286Gln był wydajnie wydzielany z komórek CHO do nadsączy hodowlanych. Wydzielany mutant tworzył nienatywne, międzylańcuchowe mostki dwusiarczkowe i wykazywał tylko minimalną aktywność enzymatyczną. Jedynie znikoma część proenzymu tego mutantu docierała do lizosomów, gdzie była procesowana do dojrzałego białka, które wykazywało niską stabilność termiczną i małą odporność na inkubację w neutralnym/alkalicznym pH. Glikozydy typu N przyłączane do Asn210, Asn222, Asn313 i Asn443 w niewielkim stopniu wpływały na aktywność enzymatyczną i odporność białka na denaturację w wyższym pH. Metaboliczne znakowanie radioaktywnym fosforem wykazało, że Asn210 i Asn286 zawierają ufosforylowane reszty mannozy, co wskazywało, że poprzez te reszty mannozowe następuje wiązanie TPP I do receptorów mannozo 6-fosforanu i dalszy transport białka do lizosomów. Badania te pozwoliły wykazać, że TPP I jest jedyną spośród poznanych dotychczas kwaśnych hydrolaz, w której ten sam cukier typu N (przyłączany do Asn286) jest krytyczny zarówno dla fałdowania białka w siateczce śródplazmatycznej jak i jego transportu do lizosomów, jak też jedyną dotychczas zidentyfikowaną glikoproteiną, która jest obficie wydzielana przez komórki ssaków w stanie nieufałdowanym.

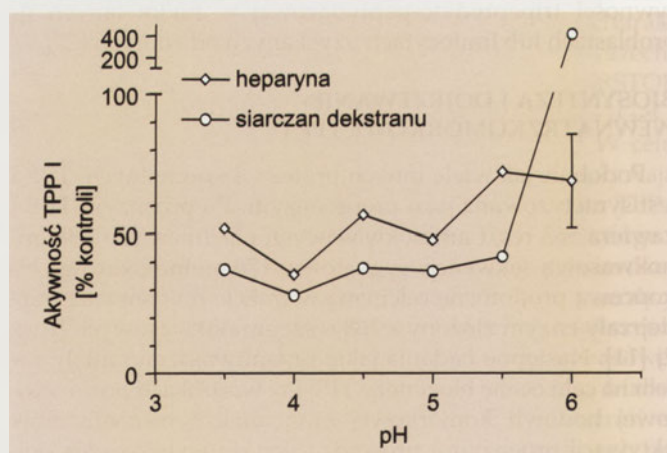
#### MECHANIZM AUTOAKTYWACJI PROENZYMU TPP I

Badania aktywacji TPP I opublikowane wcześniej wskazywały, że *in vitro* proces dojrzewania TPP I zachodzi dzięki mechanizmowi autoaktywacji w kwaśnym pH [32]. Proces autoaktywacji polega na autokatalitycznym odcinaniu prosegmentu od proenzymu oraz uzyskiwaniu aktywności przez uwolniony dojrzały enzym. Wstępne obserwacje własne wykazały jednak, że proenzym TPP I z mutacją reszty aminokwasowej Ser475 w miejscu aktywnym prawidłowo dojrzewa wewnątrzkomórkowo a inhibitory proteaz serynowych (jak AEBSF) hamują dojrzewanie TPP I typu dzikiego w warunkach pozaustrojowej hodowli komórkowej [26]. Sugerowało to, że w warunkach *in vivo* może zachodzić nie tylko autoaktywacja TPP I ale także transaktywacja TPP I przy udziale innej serynowej proteazy. Do bliższej charakteryzacji tego zjawiska użyto oczyszczonego proenzymu TPP I człowieka. Przeprowadzone badania wykazały, że autodojrzewanie proenzymu TPP I, choć zależne od typu użytego buforu, zachodzi w szerszym zakresie pH (pH 2-6) niż uzyskiwanie przez to białko aktywności

enzymatycznej (pH 3,6-4,2) [33]. N-końcowe sekwencjonowanie przy pomocy degradacji Edmana [34] ujawniło, że nieaktywny polipeptyd powstający podczas autoaktywacji w wyższym pH posiada dodatkowe, nieusunięte reszty aminokwasowe na N-końcu (odpowiednio 6 i 14 dodatkowych aminokwasów), co może tłumaczyć stwierdzany brak aktywności enzymatycznej. Jak wykazano przy pomocy spektroskopii dichroizmu kołowego, dojrzewanie TPP I w warunkach *in vitro* nie jest związane z istotnymi zmianami w strukturze drugorzędowej białka. Zarówno aktywacja jak i proteolityczne dojrzewanie proenzymu były niezależne od jego stężenia. Ponadto, dodanie dojrzałego, aktywnego enzymu do proenzymu w mieszaninie reakcyjnej nie wpływało na szybkość reakcji dojrzewania proenzymu. Również obecność glicerolu, który zwiększając gęstość (lepkość) roztworu powinien zwalniać reakcje międzycząsteczkowe, nie miała wpływu na szybkość reakcji dojrzewania proenzymu. Co więcej, dojrzały aktywny enzym nie był w stanie stworzyć enzymu TPP I z proenzymu ze zmutowaną resztą aminokwasową (Ser475Leu) w miejscu aktywnym. Wyniki tych doświadczeń wykazały, że dojrzewanie proenzymu TPP I w warunkach *in vitro* przebiega wewnątrzcząsteczkowo (jednocząsteczkowo) i sugerowały jednocześnie, że w warunkach *in vivo* dojrzałe białko nie uczestniczy w dojrzewaniu proenzymu TPP I.

#### ROLA GLIKOZAMINOGLIKANÓW W DOJRZEWANIU PROENZYMU TPP I *IN VITRO* I *IN VIVO*

Nieskuteczna autoaktywacja oczyszczonego proenzymu TPP I w pH powyżej 4,6 z tworzeniem nieaktywnego enzymu zaobserwowana w doświadczeniach *in vitro* sugerowała, że lizosomalne pH wynoszące około 4,5-5,5 jest zbyt wysokie aby dojrzały, aktywny enzym mógł powstawać w drodze autoaktywacji w warunkach *in vivo*. Dlatego też doświadczenia jakie zaplanowano następnie miały na celu wyjaśnienie czy i jakie inne czynniki mogą ułatwiać dojrzewanie proenzymu TPP I zarówno w warunkach *in vivo* jak



**Rysunek 4.** Wpływ heparyny i siarczanu dekstranu na aktywność TPP I jako funkcja pH. TPP I w stężeniu 10 nM preinkubowano z heparyną i siarczanem dekstranu o stężeniu 12,5 µg/ml przez 20 min a następnie aktywność TPP I (przedstawioną jako % kontroli) mierzono w przedziale pH 3,5 - 6,0, przez inkubację z tripeptydowym substratem (Ala-Ala-Phe-AMC) w stężeniu 100 µM, w buforze octanowym w temperaturze 37°C w objętości 100 µl na 96-dółkowych płytkach do mikrotestów. Po 10 minutach inkubacji reakcję zatrzymywano przez dodanie 50 µl 1 M buforu Tris, o pH 9,0 i 50 µl 10% roztworu SDS, po czym ilość uwolnionej amidometylokumariny (AMC) mierzono fluorymetrycznie w aparacie Genios firmy Tecan przy długości fali światła wzbudzającego 360 nm i długości fali światła emitowanego 450 nm, jak opisano wcześniej [33, 37].

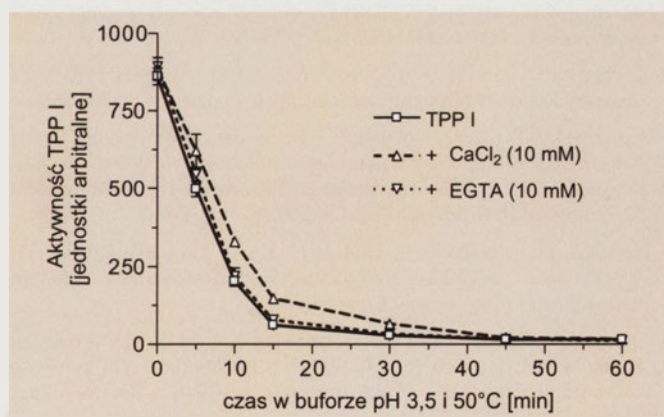


i *in vitro*. W dostępnym piśmiennictwie istnieją obserwacje wskazujące, że zarówno zwiększona siła jonowa buforu jak też glikozaminoglikany (GAG) mogą w sposób znaczący wpływać na procesy autoaktywacji niektórych spośród dotychczas przebadanych proteaz lizosomalnych [35,36]. Przeprowadzone badania wykazały, że wysoka siła jonowa buforu zwiększa wydajność a obecność GAG zwiększa wydajność i szybkość aktywacji proenzymu TPP I, przyspiesza degradację uwolnionych fragmentów prosegmentu i przesuwają zakres wydajnej aktywacji w stronę mniej kwaśnego pH, nawet do pH 6,0 [37]. Chociaż zwiększona siła jonowa buforu i obecność GAG również hamowały aktywność TPP I w warunkach *in vitro* (Rys. 4), a GAG również w warunkach *in vivo*, to znaczenie fizjologiczne tego zjawiska jest raczej ograniczone biorąc pod uwagę, że w normalnych warunkach jedynie nieznaczna aktywność danej kwaśnej hydrolazy jest niezbędna dla utrzymania prawidłowej funkcji lizosomów. Wiązanie TPP I do GAG zwiększało również stabilność termiczną i odporność enzymu na denaturację w alkalicznym pH zarówno w warunkach *in vitro* jak też *in vivo*. Wiązanie TPP I do GAG było bardzo zależne od pH buforu co sugeruje oddziaływanie TPP I z GAG poprzez histydyny, a nie lizyny czy argininy. Wyniki badań przedstawione powyżej sugerują zatem, że TPP I ma zdolność do korzystania *in vivo* z dwóch mechanizmów aktywacji: zarówno typu *cis* (wewnątrzcząsteczkowo) jak i typu *trans*, poprzez inną proteazę. Biorąc pod uwagę, że enzym ten jest włączony w ważne biologiczne procesy komórkowe i jego deficyt prowadzi do uogólnionego, masywnego spichrzenia lizosomalnego i ciężkich zmian zwyrodnieniowych w OUN, możliwość korzystania z obu dróg aktywacji zabezpieczać może dostępność TPP I w stanach podwyższonego zapotrzebowania na aktywny enzym lub w warunkach uniemożliwiających uruchomienie szlaku alternatywnego. Dotychczas uważano, że TPP I może funkcjonować jedynie w kwaśnym środowisku lizosomów, ponieważ jest szybko degradowana w środowisku neutralnym, zatem takim jakie panuje w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Wyniki badań przedstawione powyżej pokazują, że w określonych warunkach (jak odpowiednie stężenie GAG) TPP I może również być włączona w procesy biologiczne zachodzące w przestrzeni zewnątrzkomórkowej.

## TPP I JAKO SEDOLIZYNA

TPP I wykazuje znaczne podobieństwa w sekwencji aminokwasowej do grupy bakteryjnych peptydaz karboksylowych niewrażliwych na hamowanie pepstatyną A [11], tzw. proteaz serynowo-karboksylowych {proteazy te zostały nazwane ostatnio sedolizynami ze względu na obecność seryny (S), glutaminianu (E) i asparaginianu (D) w trójce katalitycznej (S53 zgodnie z klasyfikacją MERO-PS)} [38-40]. Wcześniejsze badania sugerowały jednak, że TPP I jest proteazą serynową [17], choć nietypową biorąc pod uwagę, że niektóre z inhibitorów specyficznych dla proteaz serynowych nie hamowały aktywności TPP I lub wykazywały hamowanie dopiero w relatywnie wysokim stężeniu [16,18,32,41,42]. Większość proteaz serynowych ma trójkę katalityczną złożoną z seryny, histydyny i kwasu asparaginowego [43]. Ponieważ dietylopirowęglan (DEPC), specyficznym modyfikującym reszty histydyny, zgodnie z niektórymi wynikami badań hamował aż do 75% aktywności

TPP I [17,18], zaproponowano, że w miejscu aktywnym enzymu oprócz seryny może znajdować się także histydyna. Opublikowane niedawno wyniki badań sugerowały jednak, że obok zasadniczego aminokwasu miejsca aktywnego Ser475, w miejscu aktywnym TPP I znajdują się dwa asparaginiany (Asp360 i Asp517) [32]. Wobec tych sprzecznych i niepełnych danych na temat aminokwasów istotnych dla aktywności enzymatycznej TPP I, podjęto próbę bliższej charakterystyki miejsca aktywnego TPP I przy pomocy metody mutagenyzy punktowej i ekspresji mutantów TPP I w komórkach ssaczych [44]. Mutacje punktowe obejmowały aminokwasy odpowiadające ściśle konserwowanym aminokwasom ważnym dla aktywności bakteryjnych sedolizyn uzyskując następujące mutanty TPP I: Glu272Ala, Asp276Ala, Asp360Ala, Asp327Ala, Ser475Leu i Asp517Ala. Ponadto jako kontroli oceny fałdowania dla wyżej wymienionych mutantów użyto mutantu TPP I Ser477Phe, który teoretycznie miał małą szansę na poprawne fałdowanie w warunkach *in vivo*. Ekspresja mutantów w komórkach CHO pozwoliła stwierdzić, że większość badanych mutantów wykazywała proteolityczne dojrzewanie podobne do TPP I typu dzikiego, z dominującą formą dojrzałego białka o masie 48 kDa i lizosomalną lokalizacją, co sugerowało, że wprowadzone mutacje nie wpływały na wewnątrzkomórkowe fałdowanie TPP I. Wyjątkiem były mutanty Ser477Phe i Asp517Ala, które występowały głównie w postaci proenzymu i zlokalizowane były w siateczce śródplazmatycznej. Obserwacja ta wskazuje jednocześnie, że wcześniej zidentyfikowany asparaginian w pozycji 517 jest istotny dla fałdowania/stabilności ale nie dla aktywności TPP I. Żaden ze zbadanych mutantów TPP I z wyjątkiem Asp327Ala nie był zdolny do autoaktywacji w warunkach *in vitro*, co sugerowało, że Glu272, Asp276, Asp360 i Ser475 są istotne dla aktywacji i aktywności TPP I. W celu wyznaczenia kinetycznych parametrów TPP I, dojrzałe białko TPP I typu dzikiego i mutantów Glu272Ala, Asp276Ala, Asp360Ala, Asp327Ala i Ser475Leu oczyszczono z lizatów komórkowych i wyznaczono dla nich  $K_m$  i  $k_{cat}$  używając Ala-Ala-Phe-AMC jako substratu. Analiza kinetyczna wykazała, że badane mutanty miały znikomą aktywność enzymatyczną, choć ich powinowactwo do substratu ( $K_m$ ) nie było w sposób istotny zmienione, z wyjątkiem mutantu Asp327Ala (zmniejszenie powinowactwa do substratu o około 60%). Uzyskane wy-



**Rysunek 5.** Obecność jonów wapnia nie wpływa na stabilność termiczną TPP I. TPP I inkubowano w temperaturze 50°C w buforze octanowym, pH 3,5 i we wskazanych odstępach czasu pozostawiając w próbkach aktywność TPP I (przedstawioną w jednostkach arbitralnych) mierzono fluorymetrycznie w pH 5,0, jak opisano wyżej.



niki pozwalają zatem stwierdzić, że poza wcześniej zidentyfikowanymi resztami aminokwasowymi Ser475 i Asp360, również Glu272, Asp276 i Asp327 są istotne dla katalitycznej aktywności TPP I. Choć rola poszczególnych zidentyfikowanych aminokwasów dla aktywności enzymatycznej TPP I wymaga dalszych badań, udział seryny, glutamianu i asparagianu w reakcji katalitycznej TPP I upoważnia do zaliczenia TPP I do rodziny sedolizyn jako pierwszego ssaczego przedstawiciela tej grupy proteaz.

Chociaż bakteryjne sedolizyny zawierają jony wapnia [38,40] to rola wapnia dla funkcji TPP I nie jest jasna. Dla zbadania czy wapń może stabilizować strukturę TPP I, enzym denaturowano w temp. 50°C w obecności jonów wapnia i EGTA. Jak stwierdzono ani wapń ani EGTA nie wpływały znacząco na stabilność termiczną TPP I (Rys. 5), co sugeruje, że jony wapnia nie biorą udziału w budowie cząsteczki TPP I. Wiele aspektów biologii białka TPP I wciąż pozostaje do zbadania. Znajomość struktury krystalicznej pozwoli na lepsze zrozumienie mechanizmu reakcji katalizowanej przez TPP I jak też strukturalnych podstaw mutacji chorobotwórczych. Z powodu bogatej i heterogennej glikozylacji krystalizacja białka TPP I nastęrcza jednakże sporo problemów. Niejasny jest też patomechanizm choroby CLN2; powód gromadzenia się podjednostki c mitochondrialnej ATP-azy, rola materiału spichrzanego i selektywna degeneracja komórek nerwowych OUN pomimo obecności materiału spichrzanego w wielu typach komórek. Niezwykle pomocnym narzędziem do tych badań może się okazać mysz model choroby CLN2. Otóż całkiem niedawno, po wielu latach niepowodzeń, udało się uzyskać szczep myszy z wyłączonym genem kodującym TPP I [45]. Myszy te rodzą się normalne i są płodne pomimo braku wykrywalnej aktywności TPP I. Około 7 tygodnia pojawiają się pogłębiające się deficyty neurologiczne prowadzące do przedwczesnej śmierci. Również zmiany neuropatologiczne, w tym neurodegeneracja i obecność inkluzji lizosomalnych są podobne do tych obecnych u dzieci dotkniętych CLN2. Tak więc wyniki badań ostatnich lat rzuciły nowe światło na patologię i biologię białka TPP I, dostarczyły nowych narzędzi badawczych i pozwalają z nadzieją patrzeć na przyszłe możliwości interwencji terapeutycznej w tej chorobie.

## PIŚMIENNICTWO

1. Futerman AH, van Meer G (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 554-565
2. Zeman W, Dyken P (1969) Neuronal-ceroid lipofuscinosis (Batten's disease): Relationship to amaurotic idiocy. *Pediatrics* 44: 570-583
3. Wiśniewski KE, Kida E, Gołąbek AA, Kaczmarek W, Connell F (2001) Neuronal ceroid lipofuscinoses: classification and diagnosis, W: Batten disease: Diagnosis, Treatment and Research, KE. Wiśniewski i N. Zhong (red). Academic Press: San Diego, str. 1-34.
4. Hall NA, Thomas-Oates JE, Dell A, Haltia M, Lake BD, Patrick AD (1992) Stored dolichyl pyrophosphoryl oligosaccharides in Batten disease. *Am J Med Genet* 42: 580-585
5. Palmer DN, Fearnley IM, Walker JE, Hall NA, Lake BD, Wolfe LS, Haltia M, Martinus RD, Jolly RD (1992) Mitochondrial ATP synthase subunit c storage in the ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Med Genet* 42: 561-567
6. Tyynelä J, Baumann M, Henseler M, Sandhoff K, Haltia M (1995) Sphingolipid activator proteins (SAPs) are stored together with glycosphingolipids in the infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis (INCL). *Am J Med Genet* 57: 294-297
7. Wiśniewski KE, Kida E, Patxot OF, Connell F (1992) Variability in the clinical and pathological findings in the neuronal ceroid lipofuscinoses: review of data and observations. *Am J Med Genet* 42: 525-532
8. Wiśniewski KE, Gołąbek AA, Kida E (2004) The neuronal ceroid lipofuscinoses, W: Golden JA, Harding BN (red), Pathology & Genetics, Developmental Neuropathology, ISN Neuropath Press, Basel, str. 270-282.
9. Kmiec T (1999) NCL in Different European Countries: Poland, W: Goebel HH, Mole SE, Lake BD (red), The Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (Batten Disease), IOS Press, Amsterdam, str. 135
10. Wiśniewski KE, Kaczmarek A, Kida E, Connell F, Kaczmarek W, Michalewski MP, Moroziewicz DN, Zhong N (1999) Reevaluation of neuronal ceroid lipofuscinoses: atypical juvenile onset may be the result of CLN2 mutations. *Mol Genet Metab* 66: 248-452
11. Sleat DE, Donnelly RJ, Lackland H, Liu C-G, Sohar I, Pullarkat RK, Lobel P (1997) Association of mutations in a lysosomal protein with classic late-infantile neuronal ceroid lipofuscinoses. *Science* 277: 1802-1805
12. Sharp JD, Wheeler RB, Lake BD, Savukoski M, Järvelä IE, Peltonen L, Gardiner RM, Williams RE (1997) Loci for classical and a variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis map to chromosome 11p15 and 15q21-23. *Human Mol Genet* 6: 591-595
13. Rawlings ND, Barrett AJ (1999) Tripeptidyl-peptidase I is apparently the CLN2 protein absent in classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochim Biophys Acta* 1429: 496-500
14. Doebber TW, Divor AR, Ellis S (1978) Identification of a tripeptidyl aminopeptidase in the anterior pituitary gland: effect on the chemical and biological properties of rat and bovine growth hormones. *Endocrinology* 103: 1794-1804
15. McDonald JK, Hoisington AR, Eisenhauer DA (1985) Partial purification and characterization of an ovarian tripeptidyl peptidase: a lysosomal exopeptidase that sequentially releases collagen-related (Gly-Pro-X) triplets. *Biochem Biophys Res Commun* 126: 63-71
16. Watanabe Y, Kumagai Y, Fujimoto Y (1992) Acidic tripeptidyl aminopeptidase in rat liver tritosomes: partial purification and determination of its primary substrate specificity. *Biochem Int* 27: 869-877
17. Page AE, Fuller K, Chambers TJ, Warburton MJ (1993) Purification and characterization of a tripeptidyl peptidase I from human osteoclastomas: evidence for its role in bone resorption. *Arch Biochem Biophys* 306: 354-359
18. Vines D, Warburton MJ (1998) Purification and characterisation of tripeptidyl aminopeptidase I from rat spleen. *Biochim Biophys Acta* 1384: 233-242
19. Kida E, Wiśniewski KE, Gołąbek AA (1993) Increased expression of subunit c of mitochondrial ATP synthase in brain tissue from neuronal ceroid lipofuscinoses and mucopolysaccharidosis cases but not in long-term fibroblast cultures. *Neurosci. Lett* 164: 121-124
20. Elleder M, Sokolova J, Hrebicek M (1997) Follow-up study of subunit c of mitochondrial ATP synthase (SCMAS) in Batten disease and in unrelated lysosomal disorders. *Acta Neuropathol* 93: 379-390
21. Kida E, Gołąbek AA, Waluś M, Wujek P, Kaczmarek W, Wiśniewski KE (2001) Distribution of tripeptidyl peptidase I in human tissues under normal and pathological conditions. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 280-292
22. Zhong N, Wisniewski KE, Hartikainen J, Ju W, Moroziewicz DN, McLendon L, Slower Brooks SS, Brown WT (1998) Two common mutations in the CLN2 gene underline late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Clin Genet* 54: 234-238
23. Mole SE, Mitchison HM, Munroe PB (1999) Molecular basis of the neuronal ceroid lipofuscinoses: mutations in CLN1, CLN2, CLN3, and CLN5. *Human Mutation* 14: 199-215
24. Wiśniewski KE, Kida E, Waluś M, Wujek P, Kaczmarek W, Gołąbek AA (2001) Tripeptidyl-peptidase I in neuronal ceroid lipofuscinoses and other lysosomal storage disorders. *Eur J Paed Neurol* 5: 73-79



25. Kurachi Y, Oka A, Mizuguchi M, Ohkoshi Y, Sasaki M, Itoh M, Hayashi M, Gotot Y, Takashima S (2000) Rapid immunologic diagnosis of classic late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurology* 54: 1676-1680
26. Gołabek AA, Kida E, Waluś M, Wujek P, Mehta, P, Wiśniewski K (2003) Biosynthesis, glycosylation and enzymatic processing *in vivo* of human tripeptidyl-peptidase I. *J Biol Chem* 278: 7135-7145
27. Sohar I, Lin L, Lobel P (2000) Enzyme-based diagnosis of classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: comparison of tripeptidyl peptidase I and pepstatin-insensitive protease assays. *Clin Chem* 46: 1005-1008
28. Stearns NA, Dong JM, Pan JX, Brenner DA, Sahagian GG (1990) Comparison of cathepsin L synthesized by normal and transformed cells at the gene, message, protein, and oligosaccharide levels. *Arch Biochem Biophys* 283: 447-457
29. Hermans MM, Wisselaar HA, Kroos MA, Oostra BA, Reuser AJ (1993) Human lysosomal alpha-glucosidase: functional characterization of the glycosylation sites. *Biochem J* 289: 681-686
30. Helenius A, Aebi M (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291: 2364-2369
31. Wujek P, Kida E, Waluś M, Wiśniewski KE, Gołabek AA (2004) N-glycosylation is crucial for folding, trafficking, and stability of human tripeptidyl-peptidase I. *J Biol Chem* 279: 12827-12839
32. Lin L, Sohar I, Lackland H, Lobel P (2001) The human CLN2 protein/tripeptidyl-peptidase I is a serine protease that autoactivates at acidic pH. *J Biol Chem* 276: 2249-2255
33. Gołabek AA, Wujek P, Waluś M, Bieler S, Soto C, Wiśniewski KE, Kida E (2004) Maturation of human tripeptidyl-peptidase I *in vitro*. *J Biol Chem* 279: 31058-31067
34. Edman P, Begg G (1967) A protein sequenator. *Eur J Biochem* 1: 80-91
35. Van Den Hazel H, Wolff AM, Kielland-Brandt MC, Winther JR (1997) Mechanism and ion-dependence of *in vitro* autoactivation of yeast proteinase A: possible implications for compartmentalized activation *in vivo*. *Biochem J* 326: 339-44
36. Mason RW, Massey SD (1992) Surface activation of pro-cathepsin L. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 1659-1666
37. Gołabek AA, Waluś M, Wiśniewski KE, Kida E (2005) Glycosaminoglycans modulate activation, activity, and stability of tripeptidyl-peptidase I *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 280: 7550-7561
38. Włodawer A, Li M, Dauter Z, Gustchina A, Uchida K, Oyama H, Dunn BM, Oda K (2001) Carboxyl proteinase from *Pseudomonas* defines a novel family of subtilisin-like enzymes. *Nat Struct Biol* 5: 442-446
39. Włodawer A, Li M, Gustchina A, Oyama H, Dunn BM, Oda K (2003) Structural and enzymatic properties of the sedolisin family of serine-carboxyl peptidases. *Acta Biochim Pol* 50: 81-102
40. Comellas-Bigler M, Fuentes-Prior P, Maskos K, Huber R, Oyama H, Uchida K, Dunn BM, Oda K, Bode W (2002) The 1.4 Å crystal structure of kumamolysin: a thermostable serine-carboxyl-type proteinase. *Structure* 10: 865-876
41. Ezaki J, Takeda-Ezaki M, Oda K, Kominami E (2000) Characterization of endopeptidase activity of tripeptidyl peptidase-I/CLN2 protein which is deficient in classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 904-908
42. Junaid MA, Wu G, Pullarkat RK (2000) Purification and characterization of bovine brain lysosomal pepstatin-insensitive proteinase, the gene product deficient in the human late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Neurochem* 74: 287-294
43. Perona JJ, Craik CS (1995) Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci* 4: 337-360
44. Waluś M, Kida E, Wiśniewski KE, Gołabek AA (2005) Ser475, Glu272, Asp276, and Asp360 are involved in catalytic activity of human tripeptidyl-peptidase I. *FEBS Lett* 579: 1383-1388
45. Sleat DE, Wiseman JA, El-Banna M, Kim KH, Mao Q, Price S, Macauley SL, Sidman RL, Shen MM, Zhao Q, Passini MA, Davidson BL, Stewart GR, Lobel PJ (2004) A mouse model of classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis based on targeted disruption of the CLN2 gene results in a loss of tripeptidyl-peptidase I activity and progressive neurodegeneration. *J Neurosci* 24: 9117-9126

## Tripeptidyl-peptidase I - distribution, biogenesis, and mechanisms of activation

Adam Gołabek 

New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, Department of Developmental Neurobiology, 1050 Forest Hill Road Staten Island, NY 10314, USA

e-mail: adamgolabek@yahoo.com

**Key words:** CLN, TPP I, neuronal ceroid lipofuscinoses, glycosylation, autoactivation, glycosaminoglycans

### ABSTRACT

Tripeptidyl-peptidase I (TPPI) is an acidic lysosomal peptidase that removes tripeptides from an unmodified N-terminus of small proteins and polypeptides. In humans, TPP I constitutes an integral part of the lysosomal proteolytic apparatus, which, includes numerous hydrolytic enzymes, mostly cysteine proteases (cathepsin B, C, H, K, L, and others), but also serine (cathepsin A) and aspartic (cathepsin D) proteases. The combination of endo- and exopeptidase activities of these enzymes allows for efficient digestion of the diverse proteins transported to the lysosomes, releasing free amino acids and dipeptides that are transported back to the cytoplasm and reused according to the metabolic needs of the cell. The role of TPP I in normal lysosome functioning is underscored by the genetic association of the enzyme with one form of a group of the developmental neurodegenerative disorders of childhood – the neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs). The scope of this article is to review the most recent data, mostly from author's laboratory, on the biology and pathology of TPP I. NCLs are also shortly reviewed with the special emphasis on CLN2 form resulting from mutations in TPP I gene.



# Rola polo-kinaz(y) w regulacji cyklu komórkowego - mechanizm translatacji i tworzenia kompleksów białkowych przez polokinazy

Janina Kaczanowska

Dominika Piwońska

Andrzej Kaczanowski

Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kaczan@biol.uw.edu.pl, tel. (022) 554 12 21

Artykuł otrzymano 7 lipca 2005 r.  
Artykuł zaakceptowano 12 lipca 2005 r.

**Słowa kluczowe:** cykl komórkowy, polo kinaza, PLK

**Wykaz skrótów:** APC/C (ang. *anaphase promoting complex*) - białkowy kompleks promujący wejście w anafazę - cyklosom (ligaza ubikwityny proteasomów); APC<sup>Cdc20</sup> - kompleks APC/C z kofaktorem FIZZY aktywny w anafazie kieruje do degradacji białka posiadające sekwencję „*destruction box*” np. większość cyklin i sekuryne; APC<sup>Hct1/Cdh1</sup> (ang. *APC with Hct1/Cdh1*) - kompleks wraz z kofaktorem kieruje w telofazie do degradacji białka posiadające sekwencję „*KEN box*”; ATM i ATR (ang. *ataxia telangiectasia mutated* i *ATM-related kinase*) - kinazy alarmowe punktu kontrolnego replikacji, aktywowane w przypadku uszkodzenia DNA; Cdc2 (CDK1, Cdc2 p34) - białko, które wraz z cykliną B tworzy kompleks MPF (ang. *mitosis promoting factor*) aktywujący wejście komórek w mitozę lub w mejozę; *cdc5* - gen kinazy z rodziny Polo u *Saccharomyces cerevisiae*; *cdc14* - gen kodujący tyrozynową fosfatazę główną regulującą wejście komórek w cytokinezę i przejście komórek do interfazy; Cdc25A, Cdc25B i Cdc25C - izoformy głównej fosfatazy tyrozynowej regulującej wejście komórek w mitozę; Cdk's lub CDKs (ang. *cyclin dependent kinases*) - rodzina kinaz serynowo/treoninowych aktywowanych przyłączeniem regulatorowych cyklin; Chfr (ang. *checkpoint and flia and ring domains enzyme*) - ligaza proteolitycznej degradacji białek, aktywowana przez czynniki stresowe w punkcie kontrolnym profazy; Chk1 (ang. *checkpoint kinase 1*) - kinaza aktywowana kinazą ATR po uszkodzeniu DNA; Cut1 - białko zwane separyną lub separazą o aktywności proteazy cysteinynej rozcina obrączki kohezyń łączących dwie chromatydy w anafazie; Cut2/Pds1 - sekuryna - hamuje aktywację separaz niezbędną do rozdzielenia chromatyd;  $\gamma$ TuRC (ang.  *$\gamma$ -tubulin ring complex*) - białkowy kompleks zawierający  $\gamma$ -tubulinę fosforylowaną przez polokinazę i ułatwiający nukleację mikrotubul; Hsp90 (ang. *heat shock protein*) - białko należące do rodziny białek szoku cieplnego; NES (ang. *nuclear export signal*) - sygnał eksportu z jądra; NimA (ang. *never in mitosis A*) - kinaza serynowo-treoninowa biorąca udział w regulacji cyklu komórkowego; p53 - anty-onkogen, czynnik transkrypcyjny; Pin1 (ang. *cis/trans-propyl isomerase*) - izomeraza prolinowa aktywująca wiele enzymów w cyklu komórkowym; Ser-(pSer/pThr)-(Pro/X) - sekwencja białkowa wiązana przez domenę PBD; SCF (ang. *SKP1, cullins, F-box*) - kofaktor regulujący ubikwitylację białek rozpoznawanych przez białko sensora F-Box w proteasomach; SIN (ang. *septum inducing network*) - grupa białek indukująca tworzenie przegrody u drożdży *Schizosaccharomyces pombe*; Xcdc25 - homolog fosfatazy Cdc25C występujący u *Xenopus*; xPlkk - kinaza aktywowująca Plx, kinazę z rodziny Polo u *Xenopus*

**Podziękowanie:** Ten artykuł jest częścią realizacji projektu badawczego KBN PO4C 074 28

## STRESZCZENIE

Polokinazy są powszechnie występującą podrodziną mitotycznych kinaz serynowo-treoninowych koordynujących przemianę w cyklu komórkowym *Eukaryota*. Główna mitotyczna kinaza Plk1 (ang. *polo-like-kinase 1*) w komórkach ulegających mitozie przemieszcza się i przejściowo występuje w centrosomach, kinetochorach i wrzecionie mitotycznym, będąc odpowiedzialna za wytworzenie dwubiegunowego wrzeciona mitotycznego. Aktywność polokinazy jest regulowana na poziomie stabilności tego białka i przez akcję nadrzędnych kinaz, tak że aktywność Plk1 jest najwyższa w metafazie i zanika w okresie wychodzenia komórek z mitozy. Regulacja lokalizacji i aktywacji Plk1 przebiega w dwóch etapach. Karboksylowy koniec cząsteczki zawierający fosfoepitop wiąże się z odpowiednią mitotyczną fosfoproteiną a następnie przez konformację allosteryczną zostaje odsłonięta część katalityczna i polokinaza fosforyluje wiele substratów. Plk1 reguluje zarówno przejścia z jednej fazy cyklu do następnej, jak też aktywuje niektóre punkty kontrolne cyklu.

## WSPÓŁDZIAŁ CYKLINO-ZALEŻNYCH KINAZ I POLOKINAZ W REGULACJI CYKLU KOMÓRKOWEGO I TRANSLOKACJI BIAŁEK

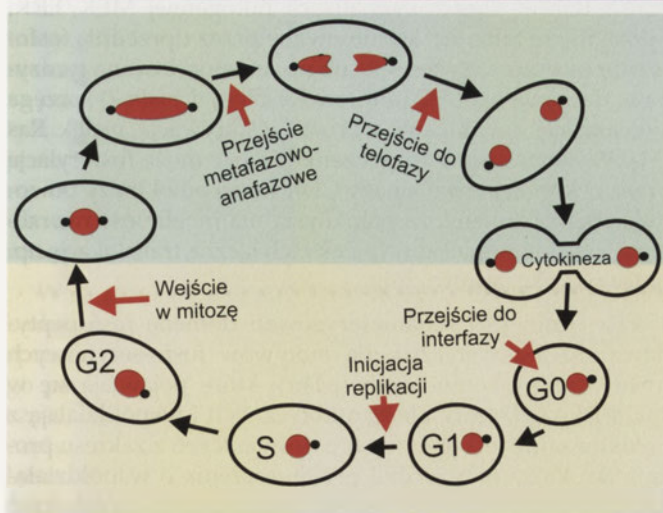
Tajemnica regulacji przebiegu cyklu komórkowego doczekała się już trzech serii fundamentalnych odkryć. Pierwsze i drugie to wykrycie mechanizmu naprzemiennych stadiów aktywacji i wygaszania całej serii procesów w cyklu komórkowym regulowanych w tzw. punktach przejścia z danego stadium cyklu do następnego (tzw. punktach kontrolnych cyklu - nagroda Nobla w 2001 i w 2004 roku) (Rys. 1), a następnie, że pewne zaburzenia tych procesów prowadzą komórki do apoptozy (Nobel 2002). Obecnie kluczowe pytania dotyczą mechanizmów koordynacji w trakcie mitozy przemian w chromosomach, wrzecionie i w cytoszkieletcie dzielącej się komórki.

Celem tego artykułu jest omówienie mechanizmu udziału podrodziny kinaz serynowo-treoninowych, polokinaz, w regulacji przebiegu cyklu komórkowego. Wyróżnikiem podrodziny polokinaz jest obecność na niekatalitycznym, karboksylowym końcu białka charakterystycznej domeny poloboksu - PBD (ang. *polobox domain*). Ta część białka decyduje między innymi o lokalizacji polokinaz w komórce i o rozpoznawaniu przez nie substratów [1,2,3,4]. Polokinazy spełniają w komórce co najmniej trzy funkcje: a) regulują kolejność występowania niektórych wydarzeń w cyklu komórkowym; b) decydują o lokalizacji i przemieszczaniu się określonych białek z cytoplazmy do jądra, lub ich eksporcie z jądra, oraz o pojawianiu się pewnych białek w biegunach wrzeciona mitotycznego, centrosomach, a następnie we wrzecionie mitotycznym [5] oraz c) ich udział jest istotny w aktywacji punktów kontrolnych regulujących prawidłowy przebieg cyklu komórkowego.

## WSPÓŁDZIAŁ MITOTYCZNYCH KINAZ I POLOKINAZ W REGULACJI CYKLU KOMÓRKOWEGO

Przebieg cyklu komórkowego komórek eukaryotycznych oznacza realizację szeregu istotnych procesów związanych z przechodzeniem komórki rodzicielskiej przez kolejne stadia prowadzące do powstania dwóch genetycznie identycznych





**Rysunek 1.** Główne fazy cyklu komórkowego *Eukaryota*. Objasnienia: Interfaza (kolor żółty tła) obejmuje: stadium G0 – komórki spoczynkowe, G1 – stadium wzrostu komórki i faza indukcji wejścia w cykl komórkowy, S – faza całkowitej replikacji DNA jądrowego, G2 – faza przygotowań do wejścia w mitozę. Mitoza (kolor zielony tła); stadium profazy – stadium rozproszenia otoczki jądrowej, kondensacji chromatyny i tworzenia dwubiegunowego wrzeciona z podcepiionymi chromosomami; stadium metafazy – tworzenia płytki metafazowej chromosomów w obrębie dwubiegunowego wrzeciona; stadium anafazy – segregacja potomnych chromatyd do biegunów wrzeciona mitotycznego, stadium telofazy – tworzenia jąder potomnych, oraz stadium cytokinezy – rozdzielenia komórek potomnych i ostatecznego rozdzielenia resztek wrzeciona mitotycznego wraz z przemieszczaniem się tzw. białek podróźnych, tworzenia przegrody, lub zaciskającego się pierścienia pomiędzy komórkami potomnymi i stadium ostatecznego wyjścia komórek potomnych z mitozy. Oznacza to uzyskanie organizacji i funkcjonowania charakterystycznego dla komórki spoczynkowej, czyli wejście do interfazy. Czerwone strzałki pomiędzy stadiami cyklu oznaczają główne punkty kontrolne w cyklu komórkowym (patrz Rys. 2).

komórek potomnych (Rys. 1). Wiodącą rolę w cyklu komórkowym *Eukaryota* pełnią serynowo-treoninowe kinazy cyklino-zależne CDK (ang. *cyclin-dependent kinases*). Kinazy te są aktywowane przez przyłączenie do nich okresowo syntetyzowanych regulatorowych białek tzw. cyklin. Kompleks okresowo aktywnej CDK kinazy z odpowiednią dla danego stadium cyklu cykliną, (kompleks cyklina-CDK), fosforyluje szereg białek i współdziała z aktywacją polokinaz [6]. Ta współzależność także reguluje przebieg proteolizy cyklin [7]. Po spełnieniu swojej funkcji poszczególna kinaza CDK jest inaktywowana albo przez defosforylację przez naczelną fosfatazy, albo przez proteolizę jej własnej cykliny. Proteoliza poszczególnych rodzajów cyklin odbywa się w proteasomach (w kompleksach białek zdolnych do ubiquitylacji swoich substratów). Proteasomy zmieniają swoją specyfikę substratową po odpowiedniej aktywacji i przyłączeniu białkowych kofaktorów, a ich działanie w niektórych stadiach cyklu jest kontrolowane przez polokinazę [7]. Taka zmiana specyfiki proteolizy może powodować proteolityczną degradację aktywnych cyklin danego stadium cyklu komórkowego i co za tym idzie przejście komórki do następnego stadium cyklu (Rys. 2, szlaki proteolizy).

Najważniejszy jest jednak udział aktywnej polokinazy w wytworzeniu dwubiegunowego wrzeciona mitotycznego zarówno u drożdży, jak w komórkach *Drosophila* i ssaków [8,9]. Obok tego włącznikiem mitozy jest tak zwana główna kinaza CDK1 regulowana przez cyklinę B (Rys 2; aktywacja Cdc25 i kompleksu cyklina B-CDK1). Aktywacja tej kinazy jest stymulowana mitogenną aktywacją kinaz sygnału zewnętrznego (szlaku ERK, aktywacja szlaku RTK-RAS-ka-

skady MAP kinaz), w którym może brać udział polokinaza Plk3 [10]. Aktywny kompleks cyklina B-CDK1 pobudza aktywację trzech innych podrodziny wykonawczych kinaz serynowo-treoninowych, a mianowicie: właśnie Polokinaz, kinaz typu Aurora i kinaz pokrewnych NIMA-RK (ang. *NIMA-related kinases*) [11,12]. Inaktywacja kompleksu głównej kinazy cyklina B-CDK1 jest sprzężona z inaktywacją polokinaz [13,14] i zachodzi w okresie przejścia komórek do interfazy (Rys. 1; przejście do interfazy).

Przejście od stadium cytokinezy do stadium popodziałowego komórek potomnych jest okresem ubiquitylacji (i degradacji proteolitycznej) polokinazy Plk1 w komórkach linii człowieka [14], i homologicznej polokinazy Cdc5 w komórkach drożdży pączkujących [15]. Natomiast niemitotyczne białka Plk2 i Plk3 nie podlegają proteolizie i są związane z białkami kompleksów integrzyn w strukturach błony komórkowej [16].

### ROLA POLOKINAZ W PRZEMIESZCZANIU SIĘ KOMPLEKSÓW BIAŁEK W TRAKCIE CYKLU KOMÓRKOWEGO

W cyklu komórkowym obserwuje się przemieszczanie białek z cytoplazmy do jądra i na odwrót, a polokinazy uczestniczą w takich translokacjach. Translokacje takich białek jak polokinazy, cykliny, oraz fosfatazy Cdc25 i Cdc14 w trakcie cyklu komórkowego drożdży są warunkiem prawidłowego przebiegu mitozy oraz jej synchronizacji z prawidłowo umiejscowioną cytokinezą [17]. Te procesy są także krytyczne dla prawidłowej orientacji wrzeciona kariokinetycznego w komórce i dla stabilności biegunów wrzeciona mitotycznego [18,19]. Wykazano, że polokinazy w wielu przypadkach warunkują przemiany w lokalizacji poszczególnych zespołów białek [5,10,20,21,22,23]. Toyoshima-Morimoto i inni [6] wykryli udział polokinaz w regulacji eksportu białek kontrolujących cykl komórkowy. Polokinazy są także tzw. białkami podróźnymi (ang. *passenger proteins*), przemieszczającymi się w trakcie mitozy z okolicy kinetochorów chromosomów do wrzeciona międzybiegunowego. Przemieszczenie polokinazy drożdży pączkujących z cytoplazmy do biegunów wrzeciona mitotycznego w profazie jest niezbędne dla ukończenia mitozy i cytokinezy [24]. Tak więc polokinazy w trakcie mitozy działają okresowo, i to wiąże się ze zmianą ich lokalizacji w komórce [20,25].

### ROLA POLOKINAZ W AKTYWACJI PUNKTÓW KONTROLNYCH CYKLU

Polokinazy mitotyczne uczestniczą kilkakrotnie w regulacji przebiegu cyklu komórkowego i są sprzężone z aktywacją i zanikiem aktywności kinaz zależnych od cyklin [8,25,26]. Złożony, a jednocześnie zachowany w ewolucji, cykl przemian w komórkach różnych *Eukaryota* jest jednak pod specjalną kontrolą mechanizmów zatrzymujących te procesy w przypadku, gdy poprzednie stadium nie zostało ukończone, lub przebiega w sposób wadliwy. Te nadrzędne mechanizmy (kontrolujące ukończenie wszystkich procesów określonego stadium cyklu komórkowego) pozwalające na przejście do następnego stadium noszą nazwę punktów kontrolnych cyklu (ang. *cell cycle checkpoints*) [27]. Jeżeli jeden z kluczowych procesów (np. aktywacja odpowiedniej cykliny, albo niezakończony przebieg replikacji DNA) nie jest prawidłowy, lub jest opóźniony, wtedy od-



bywa się aktywacja odpowiednich punktów kontrolnych, co powoduje zatrzymanie przebiegu cyklu komórki (Rys. 1, strzałki czerwone wskazują na główne punkty kontrolne w cyklu). Aktywacja niektórych punktów kontrolnych cyklu jest sprzężona z degradacją (ubikwitylacją) polokinaż [28], lub odwrotnie, z ich aktywacją [20, 26]. Zrozumiałe jest, że często złe funkcjonowanie polokinaży odbywa się w komórkach linii transformowanych, w których nieprawidłowo funkcjonują punkty kontrolne w cyklu [29], a mutacje genu *plk* powodują niestabilność białka polokinaży [30].

Te zaskakujące dane o występowaniu i funkcji polokinaż wyjaśniły badania nad mechanizmem działania polokinaż oraz badania dotyczące charakterystyki molekularnej polokinaż, które będą omawiane w następnych rozdziałach. Te wiadomości wstępne pozwolą w ostatnim rozdziale syntetycznie omówić rolę polokinaż w przebiegu cyklu mitotycznego.

### MECHANIZM DZIAŁANIA POLOKINAŻ: WYĄTKOWA ROLA POLO-KINAŻY I IZOMERAZY PEPTYDYLO-PROLYLOWEJ PIN1 W TWORZENIU STABILNYCH KOMPLEKSÓW BIAŁKO-BIAŁKO

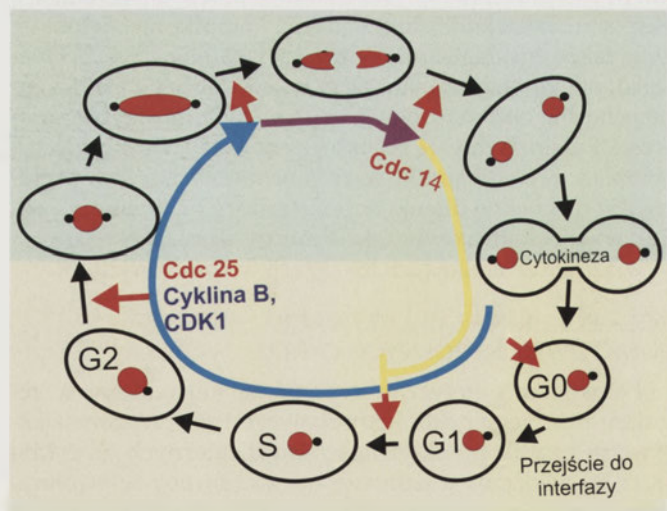
Istotną kwestią jest zrozumienie mechanizmu działania polokinaż powodujących kooperację różnych ścieżek sygnalizacji i sprzęgania wielu przemian strukturalnych w danym stadium cyklu. Sprzęganie różnych ścieżek metabolicznych jest często związane z pojawianiem się zdolności białek do tworzenia złożonych kompleksów bezpośrednio, lub z pomocą białek adaptorowych. Taki mechanizm okresowego pojawiania się oddziaływań wzajemnych białko-białko występuje np. w przypadku kinaz tyrozynowych, sprzęgających aktywację receptora kinazy tyrozynowej z aktywacją

białka Ras w ścieżce sygnalizacji mitogennej MEK/ERK. Sprzęgnięcie takie jest stymulowane przez uprzednią fosforylację receptora. W ten sposób np. ufosforylowana tyrozyna w domenie np. SH2 (ang. *src homology domain 2*) sprzęga sygnalizację czynnikami wzrostu z aktywacją białek Ras [31]. Pojawiły się przypuszczenia, że być może fosforylacja przez cyklino-zależne kinazy CDK samej polokinaży powoduje taką jej zmianę, że polokinaż ma możliwość tworzenia nowych kompleksów białek i ich łączną translokację np. przez otoczkę jądrową [6].

Elia i inni [32] scharakteryzowali domenę fosfopeptydową charakterystyczną dla motywów fosfo-serynowych (pSer) i fosfotreoninowych (pThr), które pojawiają się w cyklu jako substraty kinaz mitotycznych i współdziałają z polokinażami. Jest to nowy typ doświadczeń z zakresu proteomiki, który potwierdził przypuszczenia o współdziałaniu kinaz mitotycznych i części regulatorowej (poloboksu) polokinaż w kontroli przebiegu cyklu komórki [33]. Otóż sekwencja poloboksu (PBD) rozpoznaje substrat i wyznacza jego lokalizację w komórce. Okazało się, że sekwencja rozpoznawanego substratu jest już zazwyczaj fosfopeptydem, a więc sekwencją już ufosforylowaną, aby polokinaż mogła ją rozpoznać, stworzyć kompleks, a sama zostać aktywowaną kinazą. Czyli, w skrócie, mamy dwustopniową reakcję: rozpoznanie przez domenę PBD substratu na podstawie już ufosforylowanej sekwencji i aktywację samego enzymu.

Warto prześledzić w jaki sposób Elia i inni [32] określili rolę polokinaży w stosunku do sukcesywnych aktywacji kolejnych kinaz mitotycznych. W pierwszym doświadczeniu spośród puli 680 zbiorów cDNA genomu człowieka linii HeLa *in vitro* transkrybowanych, a następnie zsyntetyzowanych białek badacze szukali tylko tych peptydów, które będą tworzyły kompleksy z ufosforylowanymi fosfopeptydami, ale nie będą ich tworzyły ze zdefosforylowanymi ich odpowiednikami. Z gamy możliwych peptydów do badań wybrano tylko takie, które stanowiły substraty dla dwóch typów kinaz mitotycznych regulujących cykl komórkowy, a mianowicie fosforylowane przez kinazy CDK i jednocześnie przez kinazy ścieżki mitogennej MEK/ERK. Już było uprzednio wiadome, że tego typu fosfopeptydy są rozpoznawane przez monoklonalne przeciwciała MPM-2, jeżeli mają motyw pThr/pSer-Pro-X, a więc motyw, w którym ufosforylowane treonina i seryna są topograficznie związane z obecnością proliny [34]. Właśnie taki układ ufosforylowanego motywu jest substratem dla izomerazy prolinowej (izomerazy peptydylo-prolinowej), która powoduje powstanie izomerycznej formy danego białka z izomeru zakrzywionego *cis* na wyprostowany izomer *trans* w regionie domeny prolinowej pThr/pSer-Pro-X. A dopiero taka izomeryzacja umożliwia sprzęgnięcie tego peptydu z innym białkiem.

Otóż, spośród ogromnej liczby testowanych peptydów Elia i inni [32] wykryli zaledwie dwa klony białek, które ufosforylowane tworzyły kompleksy białkowe, podczas gdy ich nieufosforylowane odpowiedniki nie tworzyły takich kompleksów. Jednym było białko enzymu właśnie izomerazy prolinowej Pin1, co świadczyło jak dobre były teoretyczne założenia ich pracy. Drugim klonem białek była część regulatorowa polokinaży, PBD (ang. *Polo-Box-Domain*), stanowiąca dwa razy powtórzony, ale niepełny



**Rysunek 2.** Główne fazy cyklu komórkowego ze wskazaniem na krytyczne aktywacje wejścia w mitozę, zmiany charakteru proteolizy i przechodzenia potomnych komórek do interfazy. Objasnienia: Stadia cyklu i punkty progowe jak na Rys. 1. Punkt kontrolny wejścia w mitozę (przejście z fazy G2 do fazy M) regulowany aktywacją fosfatazy Cdc 25 aktywująca kompleks cykлина B-CDK1, oraz wyjścia z mitozy związany z aktywacją pewnej izoformy fosfatazy Cdc14. Strzałka niebieska w środku rysunku oznacza kolejne stadia funkcjonowania proteolizy typu interfazowego (z kofaktorem SCF) aż do punktu kontrolnego przejścia metafazowo-anafazowego w którym zmienia się typ proteolizy (typu APC/ $C^{Dc20}$ ) (strzałka fioletowa), a następnie po zadziałaniu fosfatazy Cdc14 zmienia się na typ proteolizy charakteryzujący komórki wychodzące z mitozy (typu APC/ $C^{Dh1}$ ) (strzałka żółta), kontynuowanej w interfazie aż do stadium wejścia komórki w następny cykl replikacji. Jednocześnie większość proteasomów w komórce już w na początku interfazy włącza typ proteolizy interfazowej (SCF).

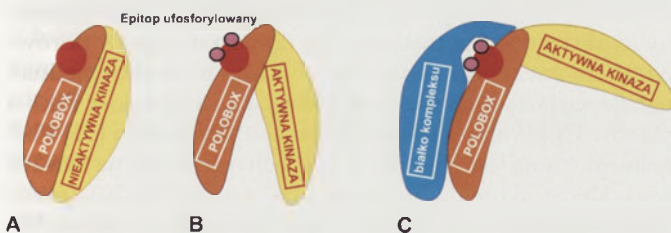


poloboks połączony z niefunkcjonalną i niepełną częścią katalityczną tej kinazy. Oznacza to, że polokinaza w jej części niekatalitycznej w domenie poloboksu jest odpowiedzialna za oddziaływanie białko-białko ufosforylowane, a więc, że tylko peptydy ufosforylowane przez kinazy mitotyczne stają się zdolne do podczepienia polokinazy. I to oddziaływanie domeny PBD z innymi białkami jest niezbędne zarówno dla aktywacji funkcji jak i lokalizacji polokinazy w czasie mitozy [4].

W drugim doświadczeniu Elia i współpracownicy [32] badali różne delecje polokinazy, co pozwoliło wykryć, że sprzęgnięcie okolicy fosfoepitopu białka ufosforylowanego przez kinazę CDK z polokinazą wymaga obecności w części karboksylowej tej kinazy aż dwóch poloboksów i ich części łącznikowej. A więc domena PBD, czyli PB1+część łącznikowa+PB2 rozpoznaje fosfoepitop substratu ufosforylowanego przez CDK, a to aktywuje jednocześnie część enzymatyczną polokinazy w jej części aminoterminalnej. Te wyniki dobrze odpowiadają modelowi aktywacji i translokacji polokinazy rozpoznającej fosfoepitop ufosforylowany przez cyklino-zależne kinazy.

Analiza struktury krystalicznej polokinazy człowieka [2] wykazuje, że w polokinazie nieaktywna część PBD i część katalityczna peptydu są zgięte w ten sposób, że centrum aktywne enzymu jest zasłonięte. Dopiero oddziaływanie fosfoepitop białka-substratu i PBD polokinazy nie tylko wiąże te dwa białka w kompleks, ale także aktywuje polokinazę, przypuszczalnie przez allosteryczną zmianę konformacji polokinazy, odsłaniając jej część katalityczną zdolną do fosforylowania substratów. A więc zakotwiczenie polokinazy na ufosforylowanym epitopie zapewnia nie tylko nieprzypadkową lokalizację strukturalną polokinazy, ale także takie podczepienie jednocześnie powoduje aktywację enzymatyczną polokinazy. Fosfopeptyd wiąże się do miejsca pomiędzy dwoma poloboksami [2,4] i wtedy może tworzyć kompleks z odpowiednim białkiem i to właśnie decyduje o zmianie lokalizacji polokinaz z jednoczesną ich aktywacją [2,4,36] (Rys. 3).

Identyfikacja PBD jako mediatora lokalizującego aktywną polokinazę pozwala zrozumieć mechanizm zakotwiczenia tej kinazy częścią poloboksu PBD w poszczególnych strukturach np. w centrosomach, kinetochorach, czy też w



**Rysunek 3.** Model dwustopniowej aktywacji polokinazy. A. schemat nieaktywnej molekuly polokinazy ze wskazaniem na część poloboksovą z łącznikiem (kolor pomarańczowy) z nieufosforylowanym potencjalnym miejscem wiązania fosfoepitopu Ser-(pSer/pThr)-(Pro/X)- z domeną PBD (czerwone kółko). Część katalityczna polokinazy (kolor żółty), która jest zasłonięta przez część poloboksovą i wobec tego jest nieaktywna. B. Aktywacja polokinazy poprzez fosforylację fosfoepitopu przez kinazy mitotyczne, powoduje zmiany konformacji molekuly, (wyprostowanie części). C. Zdolność do tworzenia kompleksu części poloboksovą z innym białkiem (niebieskim) determinuje lokalizację polokinazy, a odsłonięcie części katalitycznej powoduje jednocześnie aktywację samej polokinazy (więcej objaśnień w tekście).

części środkowej wrzeczona mitotycznego w telofazie i to nawet wtedy, gdy mutanty polokinazy nie mają aktywności enzymatycznej [35]. Warto zauważyć, że fosforylacja substratu przez aktywną polokinazę może spowodować, że ufosforylowane białko w sekwencji NES przestaje być aktywnym czynnikiem eksportu białek z jądra i to białko nadal pozostaje w jądrze. Toyoshima-Morimoto i inni [6] stwierdzili, że polokinaza fosforyluje sekwencję NES, powodując jej wyłączenie, np. w przypadku fosfatazy Cdc25 i cykliny B. Oznacza to, że fosforylacja przez polokinazę powoduje inaktywację sygnału NES, czyli właśnie wtedy staje się białkiem gromadzonym w jądrze i umożliwia kontakt z białkami jądrowymi. Te dane wskazują na rolę regulacyjną spełnianą przez izomerazę Pin1 i kinazy typu polokinaz w przebiegu cyklu komórkowego [33,36].

## MOLEKULARNA CHARAKTERYSTYKA POLOKINAZ

### WYSTĘPOWANIE GENU, MUTANTY, GENY PARALOGICZNE I KOMPLEMENTACJA FUNKCJI POLOKINAZ

Nazwa *polo* odnosi się do mutantu muszki owocowej *Drosophila melanogaster* scharakteryzowanego w homozygotycznych larwach [37]. Homozygotyczne larwy *polo/polo* nie przeżywają, natomiast istnieją również hypomorficzne allele genu *polo*. Najbardziej znamieną cechą zmutowanego fenotypu pojawiała się we wczesnych fazach mitozy neuroblastów larw w postaci kolistego ułożenia bardzo skondensowanych chromosomów wokół tylko jednego bieguna wrzeczona mitotycznego. Takie ułożenie chromosomów cechujące komórki, w których jest zakłócony proces tworzenia wrzeczona dwubiegunowego nazwano *mitozą monopolarną*. Następnie Ohkura i in. [8] zbadali mutantą *cdc 5* (homologa genu *polo*) w pączkujących drożdżach i stwierdzili, że w różnych stadiach mitozy i mejozy mutantą pojawiały się obok mitozy monopolarnej inne defekty, co wskazywało na udział produktu genu *polo* w wielu stadiach cyklu komórkowego. Homologi tego genu odkryto w wielu innych organizmach, między innymi u *Schizosaccharomyces pombe* (*plp 1*), *Candida albicans* (*CaCDC5*), *Xenopus laevis* (*plx 1*, *plx 2*, *plx 3*), *Trypanosoma brucei* (*tbplk*), *Caenorhabditis elegans* (*plk-1*, *plc 1* i *plc 2*) i *Aspergillus nidulans* oraz u ssaków, w tym u człowieka [5,38,39,40]. Polokinazy występują zatem zarówno u grzybów, jak i u zwierząt, a nawet, przynajmniej u niektórych, pierwotniaków [5]. Obecność polokinaz u roślin jest słabiej zbadana, choć analiza sekwencji DNA ryżu wykazała obecność sekwencji podobnej do sekwencji poloboksu (inf. niepublikowana dr E. Joachimiak). Przynajmniej w przypadku polokinazy Cdc5 pączkujących drożdży, w części amino-terminalnej występuje tzw. destruction box (podobny do motywu destruction box w cyklinach) ułatwiający degradację proteasomalną białka, ale tej części nie wykryto w Plk1 ssaków [20].

O ile u drożdży i *Drosophila* zidentyfikowano tylko pojedynczy gen polokinazy, to wyższe kręgowce posiadają kilka takich genów, z których *plk1* (ang. *polo-like kinase 1*) wykazuje największe podobieństwo do genu *polo Drosophila* [43]. Polokinazy ssaków, Snk i Fnk, znane też jako Plk2 i Plk3, zostały znalezione u myszy i opisano też ich odpowiedniki u człowieka: hSnk i Prk. U ssaków występuje także czwar-



ta polokinaza Sak, która podobnie jak Snk/hSnk działa raczej we wcześniejszych stadiach cyklu, natomiast Fnk/Prk, ostatnio nazywana też Plk3 działa także (choć nie tylko) w czasie mitozy [41]. Przeszukiwania genomów i studia proteomiczne [32] pozwalają przypuszczać, że w trakcie ewolucji duplikacjom genu pojedynczej polokinazy (tak jak to jest w drożdżach) towarzyszyły zmiany w lokalizacji i funkcji genów *plk1*, *plk2* i *plk3* komórek linii ssaków. Plk1 występująca w centrosomach i kinetochorach reguluje wejście w mitozę, oraz cytokinezę i przejście do interfazy. Kinaza Plk2 jest wymagana do duplikacji centrosomów, jej aktywność wzrasta w fazie G1. Przypuszcza się, że podobnie jak Plk3 odgrywa istotne funkcje postmitotyczne, zwłaszcza w komórkach nerwowych. Plk3 reguluje także współdziałanie przemian w centrosomach z przebiegiem mitozy, i przemianami w aparacie Golgiego. Jest też aktywnym enzymem związanym z odpowiedzią na czynniki stresu, oraz na uszkodzenia struktury DNA. Nadekspresja Plk3 w hodowlach tkankowych komórek ssaczy hamuje proliferację i indukuje apoptozę. Co więcej Plk3, podobnie jak Plk1 wiązała się z białkiem p53, fosforylując to białko. Jednak w odróżnieniu od fosforylacji przeprowadzanej przez Plk1 i hamującej funkcje białka p53, Plk3 powoduje prawdopodobnie aktywację funkcji p53 [42]. Jak się wydaje polokinazy regulują także mapę wzrostu samej komórki i jej kształt [43].

Trzeba podkreślić, że działanie podstawowej izoformy Plk1 w regulacji cyklu komórkowego jest tak konserwowane w ewolucji, że wykazano doświadczalnie, że jest ona w stanie z powodzeniem zastępować swe homologi u tak odległych ewolucyjnie organizmów jak komórki ssaków i drożdże. Zdolność do komplementacji termosensytywnej mutacji *cdc5-1* w temperaturze restrykcyjnej posiada też Plk3 [44,45].

#### CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA GENU, TRANSKRYPTU I BIAŁKA POLOKINAZ, WARUNKI AKTYWACJI POLOKINAZ

*Transkrypt pierwotny.* Sekwencjonowanie genu polokinazy, i polo-like kinaz oraz dane bioinformatyczne wskazują, że ten gen, lub jego homologi daje transkrypt pierwotny długości około 2.2 – 2.5 Kb/kpz, który jest oflankowany niekodującymi 5' UTR, na który składa się 219 Bp/pz, oraz 3' UTR składający się z 330 lub 593 Bp/pz. Transkrypt pierwotny składa się z 5 egzonów. Ostateczne cDNA polokinazy wynosi około 2221-2541 Bp/pz [38]. Ludzka polokinaza (Plk1) mapuje się na pozycji p12 chromosomu 16, i nie wykazuje sprzężenia ze znanymi genami związanymi z transformacjami nowotworowymi [38].

*Charakterystyka białka.* Aktualnie obecność domeny, lub domen typu polobox przyjmuje się jako kryterium przynależności do tej rodziny kinaz. Białko polokinazy typu dzikiego (typu Plk1) migruje w żelu jako dublet 67 kDa, który po traktowaniu fosfatazą migruje jako pojedyncze białko składające się z 577 reszt aminokwasowych. Białko Plk2 migruje w żelu jako pojedyncze białko 78 kDa. Wszystkie białka należące do tej grupy oprócz wysoce konserwatywnej, aminoterminalnej domeny katalitycznej (50-65% homologii) [5] posiadają w niekatalitycznej części C-końcowej region 30 aminokwasów wykazujący także wysoką homologię. Są to 1, 2 lub 3 oddzielne konserwatywne regiony poloboxu [1,32].

Ponadto wewnątrz domeny katalitycznej w tzw. subdomenie I znajduje się sekwencja GxGGFAxC (gdzie x oznacza dowolny aminokwas), typowa dla polokinaz, która różni się od kanonicznej sekwencji GxGxxGxV występującej w innych kinazach serynowo-treoninowych [5]. Część znajdująca się pomiędzy domeną katalityczną a częścią poloboxu jest słabo konserwowana i u poszczególnych Plks ma różną długość [5]. Ale ta część ma pewne znaczenie, gdyż dopiero z poloboxem tworzy pełną domenę PBD. Prawdopodobnie część łącznikowa, różna w Plk1 i Plk2/Snk powoduje różną specyficzność substratową tych kinaz [41].

*Substraty polokinaz i regulacja aktywności enzymatycznej kinazy.* Optymalnymi substratami dla Plk1 (a zatem prawdopodobnie także dla innych Plk) są miejsca serynowe w sekwencjach bogatych w hydrofobowe i kwaśne aminokwasy [6]. Z tego powodu jako probierz aktywności Plks stosowana jest kazeina (jednocześnie wiadomo też, że Plks nie fosforylują histonu H1) [39]. Do grupy niekwestionowanych substratów Plks należą: fosfataza Cdc25C [39], cyklina B1 [6], tubuliny  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  [30, 46], pewne białka centrosomalne [20,25,41,47,48], białka towarzyszące mikrotubulom [49], nadrzędne kinazy mitotyczne Myt1 [1] i Wee1 [12], podjednostka kohezyny [50], a także białka motoryczne należące do grupy kinezyn, białko stabilizujące mikrotubule TCTP [41] oraz kofaktory proteasomów [21].

*Regulacja aktywności enzymatycznej kinazy.* W części katalitycznej wszystkich polokinaz znajduje się subdomena VIII (inaczej pętla T, nazwana segmentem aktywacyjnym) odpowiedzialna za aktywność kinazową polokinaz. Subdomena ta zawiera konserwowaną ewolucyjnie treoninę (w Plx *Xenopus* jest to Thr201, a w Plk1 myszy jest to Thr210), której fosforylacja powoduje aktywację enzymu. Zamiana tej treoniny na kwas asparaginowy (co konformacyjnie przypomina fosforylację), tak w Plk1 jak i w Plx1 powodowała podwyższenie aktywności kinazowej tych polokinaz. Jest to zatem następny dowód na istotność fosforylacji odpowiedniej treoniny dla aktywacji enzymatycznej polokinaz [26].

*Aktywacja polokinazy Plx przez nadrzędną kinazę xPlkk1 i krytyczne fosfoepitopy polokinaz.* W genomie *Xenopus laevis* udało się zidentyfikować nadrzędną kinazę aktywującą Plx1 przez fosforylację odpowiedniej kluczowej treoniny Plx1. Tę nadrzędną kinazę nazwano xPlkk1. Spokrewniona z nią pewna kinaza ssaków (SLK) ma także pewną zdolność do fosforylacji i aktywacji egzogennej Plk1. Chociaż zmiany jej aktywności w trakcie cyklu komórkowego, w porównaniu ze zmianami aktywności Plk1 są niewielkie, jednak uznaje się ją za kinazę odpowiadającą za aktywność Plk1 u ssaków [26]. Według innych, późniejszych danych [51] Plx1 fosforylowana jest głównie w czterech miejscach: na Ser-260 i Ser-326 na skutek autofosforylacji oraz na Thr-201 (przez kinazę białkową A) i Ser-340 (przez kompleks Cdk1-cyklina B). Natomiast xPlkk fosforyluje głównie Thr-210. Istotną rolę może odgrywać też fosforylacja innych aminokwasów polokinazy, np. mutacja Plx, naśladująca fosforylację Ser128 (Ser 137 dla Plk1), powoduje dalsze zwiększenie aktywności tej kinazy [26].

Jak się wydaje w komórkach linii HeLa, Plk jest fosforylowana głównie w dwóch miejscach: w tym jedna to Thr210



[50] lub na Ser137 i Thr210 [52]. Stwierdzono, że podmienienie Ser137 lub Thr210 na kwas asparaginowy (Asp), naśladujący strukturalnie fosfoepitop, powoduje zwiększenie aktywności Plk. Co więcej, ekspresja zmutowanego konstruktów, w którym zamiast Ser137 podstawiono Asp powodowała zatrzymanie przebiegu cyklu komórkowego w fazie S ze zduplikowanymi centrosomami, które jednak pozostają blisko siebie i nie tworzą dwubiegunowego wrzeciona. Podobnie ekspresja Plk wraz z podmienioną Thr210 na kwas asparaginowy powoduje zatrzymanie komórek HeLa w trakcie mitozy [52].

Rola białek opiekuńczych (czaperonów) w regulacji aktywności polokinaż. Do zachowania aktywności polokinaż i uchronienia ich przed degradacją potrzebna jest ich interakcja z białkiem opiekuńczym Hsp90. Hsp90 należy do rodziny silnie konserwowanych ewolucyjnie białek opiekuńczych obecnych u wszystkich *Eukaryota*, zwanych białkami szoku cieplnego (ang. *heat shock protein*). Interakcja białek z Hsp90 prowadzi do modulacji struktury białek, przedłuża ich okres półtrwania i ułatwia ich interakcje np. kinazy CDK1 i polokinaży [53]. Ta interakcja odbywa się na centrosomach i jest niezależna od obecności mikrotubul [53]. Podobnie Hsp90 gromadzi się na centromerach chromatyny, także niezależnie od obecności mikrotubul wrzeciona mitotycznego [54]. Zgodnie z oczekiwaniami, po zablokowaniu wiązania polokinaży z Hsp90 specyficznym kompetycyjnym inhibitorem (laktacystyną), kinaza ta ulegała inaktywacji i szybkiej degradacji [53]. Taka komórka traktowana laktacystyną zachowuje się wtedy jak komórka mutanta *null* polokinaży [33], co przejawia się zarówno w złej segregacji centrosomów, jak i nieprawidłowym wrzecionem podziałowym i zaburzonym rozdziałem chromatyd. Zatem Hsp90, prócz ochrony Plks przed degradacją, wpływa też na aktywność tego enzymu [53].

Kluczowa rola poloboksu w zmianie lokalizacji polokinaż(y). Nawet wtedy gdy zmutowana część katalityczna kinazy Plk nie funkcjonuje, a więc kiedy jest to niefunkcjonalne enzymatycznie białko (ang. *dead kinase*), obecność odcinka polobox wystarcza do przemieszczenia takiej defektywnej polokinaży do centrosomów, do związania jej z Hsp90, z translokacją tego białka z kinetochorów do strefy środkowej wrzeciona w trakcie anafazy i do tzw. śródciałka (ang. *midbody*) w trakcie cytokinezy [4]. Natomiast mutacja w regionie domeny polobox, nie wpływająca na aktywność kinazy polokinaży, zarówno w mysiej Plk jak i u jej homologa *Cdc5 Saccharomyces cerevisiae* uniemożliwiała funkcjonalną komplementację termosensytywnej mutacji polokinaży *cdc5-1* o prawidłowej budowie poloboksu ale nieczynnej enzymatycznie. Ten wyjątkowy brak komplementacji w tym przypadku wynika z nieprawidłowej lokalizacji w drożdżu własnej nieczynnej polokinaży *cdc5-1* i zmutowanych w poloboksach białek Plk i *Cdc5* [4].

## ROLA POLOKINAŻ(Y) W REGULACJI PRZEBIEGU CYKLU KOMÓRKOWEGO

Obecnie wiadomo, że polokinaży biorą udział w szeregu wydarzeń ważnych dla prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego [22], kontroli stabilizacji innych białek i na dyslokację struktur [20,41,55]. A jednak najnowsze badania [23,37] z użyciem techniki RNAi wskazują, że główną funk-

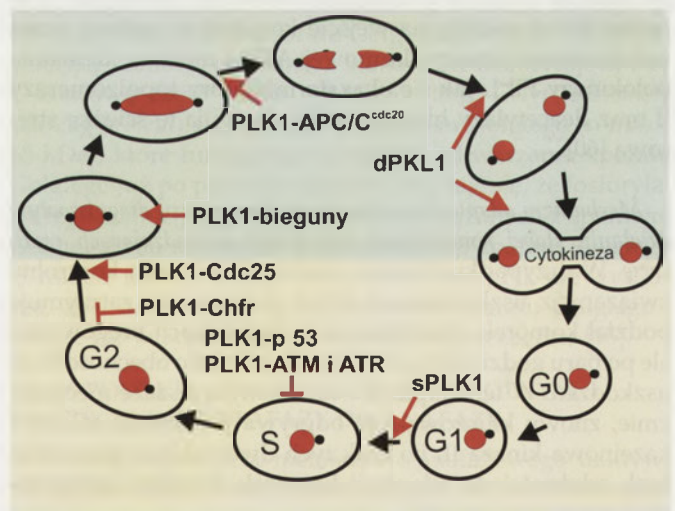
cją Plk1 jest nadanie dwubiegunowego charakteru wrzecionu mitotycznemu (ang. *bi-orientation of the mitotic spindle*). Okazało się, że inne niewątpliwie funkcje Plk1 mogą być kompensowane alternatywnymi mechanizmami, bo komórki, w których brakuje Plk1 jednak wchodzą w opóźnioną i niezbyt prawidłową mitozę. A oto główne etapy udziału polokinaż w kontroli przebiegu cyklu komórkowego.

### POBUDZENIE SYNTEZY POLOKINAŻ W INTERFAZIE

W większości typów komórek w okresie interfazy nie ma syntezy i aktywności głównej polokinaży Plk1, natomiast Plk2 i Plk3 (zapewne ewolucyjnie wtórnie) są zależne od aktywacji komórki czynnikami wzrostu [16]. W fazie G1 aktywacja czynnika transkrypcyjnego -forkhead- pobudza między innymi transkrypcję i syntezę cykliny B i polokinaż(y), a więc białek krytycznych dla wejścia komórek w mitozę [12,56] (Rys. 4: sPLK1).

### PUNKT KONTROLNY WEJŚCIA KOMÓREK W REPLIKACJĘ DNA ORAZ PUNKT KONTROLNY STYMULOWANY USZKODZENIEM W REPLIKACJI DNA (ANG. *S DNA DAMAGE CHECKPOINT*)

Różne inhibitory replikacji DNA powodują zatrzymanie komórek w fazie G1 związanych z mechanizmem aktywacji kaskady specjalnego typu kinaz wykonawczych z podrodziny kinaz NIMA-RK (ang. *NIMA related kinases*) znajdujących się w jąderku [57]. Uszkodzenia DNA, które mogą wystąpić np. na skutek nieukończenia replikacji DNA w fazie S, lub też pęknięcia jednej lub dwóch nici DNA pod wpływem różnych czynników mutagennych takich jak czynniki chemiczne (adriamycyna, hydroksymocznik), czy promieniowanie  $\gamma$  i UV, powodują zatrzymanie przebiegu cyklu. Głównymi białkami wykrywającymi takie uszkodzenia w komórkach



Rysunek 4. Główne regulacje przebiegu cyklu komórkowego związane z aktywnością polokinaży. Objasnienia stadiów według Rys. 1. sPLK1 - stadium syntezy i aktywacji polokinaży mitotycznej; PLK1-p53 i PLK1- ATM i ATR - zatrzymanie (czerwony znak zatrzymania) przechodzenia do następnych stadiów cyklu przez aktywację punktów kontrolnych związanych albo z obecnością inhibitorów replikacji, albo z powstaniem uszkodzeń DNA w trakcie replikacji, PLK1-Chfr - udział polokinaży w aktywacji punktu kontrolnego wejścia w mitozę związany z aktywacją ligazy ubikwitylowej Chfr (czerwona strzałka); PLK1-Cdc25- główna funkcja polokinaży w aktywacji fosfatazy Cdc25 oraz regulacja dwubiegunowego charakteru wrzeciona mitotycznego (czerwone strzałki); PLK1-APC/Ccdc20 - udział polokinaży w aktywacji zmiany typu proteolizy w punkcie kontrolnym przejścia od metafazy do anafazy (czerwony znak zatrzymania); dPLK - degradacja proteolityczna wszystkich cyklin mitotycznych i polokinaży w okresie wychodzenia komórek potomnych z mitozy.



ssaków są kinazy alarmowe ATM, ATR (ang. *Ataxia Telangiectasis Mutated*, i *ATM-related kinase/RAD3*) i Chk1 (ang. *checkpoint kinase 1*) zatrzymujące wejście komórek w mitozę. Aktywacja tego punktu progowego jest sprzężona, ale pośrednio, z inaktywacją polokinazy [61,62] (Ryc 4; PLK1-p53 i PLK1-ATM I ATR).

W komórkach ssaków Plk1 fosforyluje główne białko supresorowe p53 i łączy się fizycznie z sekwencjami p53 wiążącymi DNA. Ten fizyczny kontakt Plk1 z p53 hamuje funkcję proapoptotyczną tego czynnika transkrypcyjnego. Natomiast Plk3 w komórkach ssaków działa w sposób odwrotny. Białko p53 jest wciąż aktywne po ufosforylowaniu go przez Plk3 [42] i aktywuje syntezę białka p21, które jest inhibitorem cyklu komórkowego.

Polokinaza uczestniczy w procesach reperacji uszkodzeń DNA. Reperacja wiąże się z przyłączeniem kompleksu białek do nici DNA w miejscu jego uszkodzenia [63,64].

#### PRÓG KONTROLNY ZWIĄZANY Z AKTYWACJĄ ŚCIEŻKI STRESU I FUNKCJONOWANIA TOPOIZOMERAZY II W INTERFAZIE

Aktywacja tego punktu kontrolnego (Rys. 4: PLK1-Chfr) związana jest z różnymi stresami takimi jak stres osmotyczny, stres zimna, czynniki zakłócające polimeryzację mikro-tubul lub uszkodzające DNA w jądrze komórkowym i powoduje aktywację ligazy ubikwitylowej Chfr (białka z domeną forkhead i kofaktorem ring) [28,58]. Punkt kontrolny powoduje, że komórki w stadium prometafazy z częściową kondensacją chromosomów, a nawet z aktywnymi kinazami cyklozależnymi (cykliną A-cdk2 i cykliną B-cdk1) wracają z powrotem do stadium interfazy [59]. Aktywne białko Chfr ubikwityluje polokinazę Plk1 i inaktywuje MPF [28]. W fazie G2 inhibitory funkcjonowania topoisomerazy II w jądrze nie pozwalają na wejście komórek w mitozę przez uruchamianie kinazy alarmowej ATR i inhibicję działania polokinazy Plk1. Jak się okazało inhibitory topoisomerazy II oraz deacetylazy histonu także aktywują tę ścieżkę stresową [60].

*Mechanizm adaptacji punktu kontrolnego przy długotrwałym działaniu słabej koncentracji czynników uszkodzających replikację.* W przypadku drożdży wykryto, że punkt kontrolny związany z uszkodzeniem DNA początkowo zatrzymuje podział komórek, podobnie jak w komórkach kręgowców, ale po paru godzinach następuje adaptacja do obecności tych uszkodzeń. W tej adaptacji o nie znanym jeszcze mechanizmie, znowu kluczową rolę odgrywa polokinaza (Cdc5) i kazeinowa kinaza II, bo brak tych dwóch kinaz powoduje brak zdolności do adaptacji komórek drożdży zatrzymanych na tym progu [65].

#### ROLA POLOKINAZ W REGULACJI PUNKTU KONTROLNEGO WEJŚCIA W MITOZĘ

*Aktywacja przejścia G2-M.* Można wyróżnić kilka funkcji polokinaz w przejściu od G2 do M. Pierwszym warunkiem wejścia komórek w mitozę jest zniesienie inhibicji aktywności kompleksu cyklina B-CDK1, zwanego także kompleksem MPF (ang. *mitosis promoting factor*). Inhibicja MPF odbywa się przez fosforylację na CDK1 (na thr14 i tyr15) dwóch kluczowych aminokwasów przez nadrzędne kina-

zy (Myt1, Wee1). Z kolei polokinaza (Plx komórek *Xenopus*) działa jako represor tych nadrzędnych kinaz fosforylujących nadrzędną kinazę jądrową Myt1 [1]. Podobnie kinaza Wee1 drożdży podlega inhibicji pod wpływem Plk1 [14] (Ryc 4; PLK1-Cdc25 i PLK1-bieguny mitotyczne).

Uaktywnienie i translokacja do jądra MPF wymaga nie tylko zniesienia inhibicji przez Wee1 i Myt1 kinazy, ale także aktywnego zadziałania głównej fosfatazy tyrozynowej Cdc25C (Ryc 2; aktywacja fosfatazy Cdc25). Białko Cdc25 jest fosfatazą działającą antagonistycznie do nadrzędnych kinaz inhibujących wejście w mitozę (Myt1, Wee1) usuwając reszty fosforanowe z thr14 i tyr15 z MPF [44]. Równocześnie polokinaza fosforyluje cyklinę B na ser 147 znajdującej się w sekwencji NES (ang. *nuclear export signal*), a to powoduje zablokowanie mechanizmu wyrzucania kompleksu MPF z terenu jądra. Oznacza to, dosyć przewrotnie, translokację cykliny B-CDK1 do jądra. Podobnie ssacza Plk1 fosforyluje sekwencje NES na serynie 198 w fosfatazie Cdc25 co powoduje zmianę lokalizacji tej fosfatazy [6, 39]. Aktywacji Cdc25 towarzyszy fosforylacja części aminoterminalnej enzymu. Jest jednak kwestią sporną, czy istotnie tę fosforylację przeprowadza polokinaza, bo komórki pozbawione Plk1 jednak wchodziły w prometafazę, a niektóre z nich po okresowym zatrzymaniu w tym stadium wchodziły w anafazę [23]. Być może, że do translokacji fosfatazy Cdc25 z cytoplazmy do jądra potrzebne jest także zniesienie wiązania tej fosfatazy z białkiem 14-3-3 stabilizującym jego lokalizację w cytoplazmie. Wiadomo bowiem, że białka 14-3-3 wiążą się z miejscami fosfoserynowymi różnych białek regulując w ten sposób ich funkcję. W przypadku Cdc25 człowieka miejscem wiążącym białko 14-3-3 jest ufosforylowana seryna 216. Defosforylacja tej seryny zachodzi w komórkach w fazie M, a również wykazano, że ta defosforylacja znosi wiązanie białka 14-3-3 do fosfatazy Cdc25 [39]. W komórkach *Xenopus* aktywny MPF inicjuje kondensację chromosomów i rozpad otoczki jądrowej w przypadku mitozy zwierzęcej i roślinnej (ale nie ma tego procesu w komórkach drożdży, glonów i pierwotniaków) oraz formowanie wrzeciona mitotycznego.

*Rola polokinaz w wyodrębnianiu chromosomów mitotycznych.* W komórkach *Drosophila* polokinaza występuje w okresie interfazy jako śladowe białko na terenie cytoplazmy, a w profazie pojawia się w jądrze, a także występuje na kondensujących chromosomach w regionie centromerów [5,54]. Rola polokinazy w wiązaniu kohezyn do zduplikowanej nici DNA jest związana z podjednostką kohezyny (Scc1) odpowiedzialną za połączenie obu chromatyd we wczesnych stadiach mitozy w drożdżach [50,66]. Dysocjacja kohezyn od chromosomów w trakcie mitozy jest także regulowana przez polokinazę, ale nie wpływa na kondensację chromatyny i wiązanie kondensyn [23,67]. W komórkach człowieka polokinaza (Plk1) powodowała częściową stratę kohezji chromatyd w profazie gdy jeszcze nie nastąpiła degradacja kohezyny SCC1. W profazie w obecności aktywności MPF i NIMA kinaz drożdży i u *Aspergillus* z kolei uaktywniają się kinazy z rodziny Aurora. Ta kolejna kaskada aktywacji jest bezpośrednio skorelowana z fosforylacją histonu H3 i z kondensacją chromosomów [11].

*Rola polokinaz w tworzeniu biegunów wrzeciona mitotycznego i osiągnięcia stadium metafazy.* Centrosom (to znaczy



podwójna centriola i otaczający ją zespół centrosomalnych białek peryferycznych) na ogół podlega duplikacji w fazie S (Rys. 1; faza replikacji DNA). Każda centriola stymuluje powstanie drugiej nowej centrioli, a obydwa zespoły rekrutują wokół siebie zespół białek centrosomów. Centrosom pełni w komórce funkcję centrum polimeryzacji mikrotubul, w skrócie MTOC (ang. *microtubule organizing center*). Aktywacja kinazy Plk2 (Snk) w okresie przejścia komórki z fazy G1 do S jest niezbędna dla translokacji polokinazy do centrosomów. Przemieszczenie CDK i polokinazy do centrosomów jest konieczne dla ich duplikacji, a jest to także związane z fosforylacją białek centrosomu przez kompleks cykliny E-CDK2 kinaza [68]. W fazie aktywności cykliny E-CDK2, jeszcze przed inicjacją replikacji DNA, polokinaza Plk1 fosforyluje i stabilizuje lokalizację kompleksu inicjującego mikrotubulogenezę w centriolach (na centrach nukleacji tzw.  $\gamma$  TuRC, ang.  *$\gamma$ -tubulin ring complex*) [46]. W okresie interfazy stosunkowo stabilne mikrotubule wychodzące z centrosomu są zwykle organizatorem rozmieszczenia organeli w komórce i tworzą szlaki transportu wewnątrz komórki. Natomiast przed podziałem odbywa się zmiana ich funkcji – zanikają mikrotubule interfazowe, a wytwarzają się bieguny wrzeciona podziałowego. Jak się wydaje cały szereg innych białek (w tym kinazy z grupy NIMA kinaz) są niezbędne w procesie dojrzewania centrioli potomnej i wytworzenia drugiego bieguna wrzeciona mitotycznego [41,47,48] i powodują przyłączenie kilku innych białek towarzyszących mikrotubulom [47,49].

*Punkt kontrolny wrzeciona mitotycznego* (ang. *spindle checkpoint*). (Ryc 4: PLK1-bieguny). W trakcie wczesnej mitozy tworzą się dwa aktywne bieguny nukleujące wrzeciono mitotyczne. Bieguny te są związane z otoczką jądrowa w przypadku mitozy wewnątrz jądra drożdży (ang. *spindle polar bodies*), lub są to cytoplazmatyczne centrosomy zawierające dwie centriole w komórkach zwierzęcych, gdy otoczka jądrowa jest rozpraszana w trakcie wejścia do mitozy. Zgodnie z oczekiwaniami komórki pozbawione genu *plk1* aktywują punkt kontrolny tworzenia wrzeciona mitotycznego i albo nie wchodzi w podział, albo tworzą wrzeciono jednobiegunowe. Ale z drugiej strony, w drożdżach to nadekspresja genu *plk1* powoduje nie tylko tworzenie wrzecion monopolarnych, ale stanowi również punkt kontrolny cyklu komórkowego [8]. Komórki takie wykazują nieprawidłową organizację kinetochorów i są zatrzymane w stadium prometafazy ze skondensowanymi chromosomami w mitozie jednobiegunowej. A więc te na razie sprzeczne wyniki bardzo dobrych doświadczeń wskazują, że zagadka kontroli dwubiegunowego charakteru wrzeciona nie jest jeszcze rozwikłana. Co więcej, okazało się, że pewna izoforma fosfatazy Cdc14 (Cdc14A) reguluje separację centrosomów i segregację chromosomów [19], a więc działa na stadium znacznie wcześniejszym, niż inna izoforma Cdc14 odpowiedzialna za proces wychodzenia komórek z mitozy (Rys. 2, cdc14).

Polokinaza również zapewnia fosforylację białką związaną z  $\beta$  tubuliną [49] i prawidłową lokalizację i funkcjonowanie białek motorycznych typu kinezy, które zawierają także „destruction box” a więc podlegają ubiquitylacji i proteolizie po aktywacji APC/cyklosomów w anafazie. Na przykład kinezyzna CHO1/MKLP1, która jest fosfo-

rylowana przez Plk1 *in vivo* i *in vitro* jest przemieszczana wraz z Plk1 do centralnej części wrzeciona mitotycznego i do śródciałka [69]. Do mikrotubul wrzeciona kariokinezy przyłączają się także białka motoryczne zdolne po aktywacji do przesuwania się po mikrotubulach wrzeciona albo w kierunku plus (+) spolaryzowanej mikrotubuli (większość kinezy, lub w kierunku biegunów minus (-) (a więc w kierunku biegunów białka motoryczne z grupy dynein). Niektóre białka centrosomu pozostają na nim do stadium telofazy i przytrzymują końce minusowe mikrotubuli wokoło powierzchni centrosomów. Polokinaza aktywuje te białka fosforylując je, co umożliwia prawidłowe ich funkcjonowanie [25,53] i zachowanie dwubiegunowego charakteru wrzeciona [23], chociaż nie jest to już niezbędne dla wykonania prawidłowej cytokinezy [70].

Synchronizowane komórki ssaków pozbawione Plk1 (techniką RNAi) nie tworzą wyraźnych i skupionych biegunów wrzeciona mitotycznego, nie są związane z centrosomami i nie przytrzymują mikrotubuli wokoło biegunów. A więc polokinaza (Plk1) jest potrzebna do wytworzenia prawidłowego i funkcjonalnego wrzeciona z polokinazą skondensowaną w centrosomach lub biegunach wewnątrzjądrowego wrzeciona drożdży [23]. Zastosowanie inhibitora kinazy Aurora (hesperadyny), co stabilizuje połączenia pomiędzy kinetochorami i mikrotubulami powoduje, że komórki bez Plk1 jednak uzyskują aktywację APC/cyklosomów ale wtedy wychodzą z mitozy bez segregacji chromosomów i bez cytokinezy [23]. Takie komórki mają tendencję do wchodzenia w apoptozę, a zjawisko to jest powszechne w komórkach linii transformowanych nowotworowo pozbawionych genu *plk1* [29].

*Polokinazy biorą udział we fragmentacji aparatu Golgiego.* W komórkach linii ssaków wykazano, że w czasie mitozy odbywa się rozdzielenie aparatu Golgiego pomiędzy dwie powstające komórki potomne, a białko Plk1 fosforyluje *in vivo* C-końcówką część białka GRASP65 (ang. *Golgi reassembly stacking protein*) związanego z aparatem Golgiego (o masie 65 kDa), które funkcjonuje w trakcie odtwarzaniu aparatu Golgiego już po podziale komórki. Wydaje się, że fosforylacja tego białka (jak też innych białek związanych z aparatem Golgiego) ma znaczenie dla fragmentacji aparatu Golgiego w trakcie mitozy. Jednak aktywność samej Plk nie wystarcza, aby stabilizować funkcjonowanie aparatu Golgiego i jeszcze nie wiadomo jakie inne białka są niezbędne [55].

## ROLA POLOKINAZ W PUNKCIE KONTROLNYM PRZEJŚCIA OD METAFAZY DO ANAFAZY

W trakcie przejścia metafazowo-anafazowego uaktyw- nia się proteoliza białek zawierających motyw „destruction box” i prawdopodobnie białek zawierających sekwencję PEST, a więc między innymi cykliny A i E oraz samej polokinazy (typu Plk1), oraz białka z grupy sekury (14,21) (Rys. 4; PLK1-APC/C<sup>cdc20</sup>). Proteasomy interfazy i wczesnej fazy mitozy są aktywowane przez kompleks SCF (Rys. 2, strzałka niebieska) i wobec tego cykliny nie są degradowane. Jednakże proteasomy ufosforylowane zarówno przez kompleks MPF, jak i przez polokinazę wraz z kofaktorem Cdc20/fizy tworzą proteasomy anafazowe APC<sup>cdc20</sup> [7,21] (Rys. 2, strzałka fioletowa) zdolne do degradowania większości cyklin i innych nowych substratów. Na rolę tego



ufosforylowania proteasomów przez polokinazę wskazuje fakt, że komórki HeLa poddane działaniu inhibitora chaperonów, który powoduje wtórnie degradację polokinazy zostają w cyklu mitotycznym zatrzymane na stadium metafazy [53].

*Degradacja sekuryiny jako punkt kontrolny w przebiegu cyklu komórkowego.* Sekuryna (białko Pds1 w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, Cut 2 w *Schizosaccharomyces pombe* i homologi Pds1 kręgowców) jest inhibitorem wejścia komórek w anafazę [13]. Sekuryna staje się jednak substratem proteasomów typu APC<sup>CDC20</sup> i jest właśnie wtedy degradowana proteolitycznie. Sekuryna w profazie i w metafazie hamuje aktywność białka Esp1 (*Saccharomyces cerevisiae*), czy też białka Cut1 (*Schizosaccharomyces pombe*), nazwanego separyną albo separazą. Separaza jest białkiem o aktywności proteazy cysteinowej, ale poprzez jej związanie z sekuryną ten enzym jest nieaktywny we wczesnych stadiach mitozy. Dopiero degradacja proteolityczna sekuryiny umożliwia aktywację enzymatyczną separazy, która rozcina pierścienie kohezyn a to powoduje rozdział chromatyd. Skoro siostrzane chromatydy podczipione są przez mikrotubule do przeciwnych biegunów wrzeciona mitotycznego to rozlepianie centromerów działaniem separazy prowadzi do anafazowej segregacji chromatyd. A więc reasumując, polokinazy poprzez aktywację APC/cyclosomów włączają degradację sekuryiny i to wyzwala aktywność separazy i dwubiegunowy rozdział chromatyd [66].

#### **ROLA POLOKINAZ W TELOFAZIE, CYTOKINEZIE I W PRZEJŚCIU KOMÓREK POTOMNYCH W INTERFAZĘ**

W trakcie anafazy (komórek embrionalnych *Drosophila*) odbywa się przemieszczanie się aktywnej polokinazy z centromerów do centralnej części wrzeciona mitotycznego, a następnie resztki pozostają w tzw. śródciałku tworzonym w trakcie cytokinezy [42]. Ta translokacja obejmuje kompleks białek centromerowo-kinetochorowych w tym polokinazę, kinazę Aurora, białko BIR i białko kinetochorowe INCENP (ang. *inner centrosomal protein*). Aktywna polokinaza lokalizuje grupę białek podróżujących w środkowym regionie wrzeciona z przeciwstawnie skierowanymi mikrotubulami wybiegającymi z obu biegunów tego wrzeciona i tworzy z nich strukturalną przegrodę [71].

Aktywna separaza zwalnia z jąderka drugą główną fosfatę cyklu komórkowego Cdc14 inicjując telofazę i następne etapy przejścia komórek drożdży przez cytokinezę i wyjścia z mitozy [18]. Uwolnienie fosfatazy Cdc14 z jąderka pozwala zdefosforylować kompleks białek podróżujących we wrzecionie mitotycznym w okresie telofazy. W okresie przejścia od anafazy do telofazy odbywa się stopniowo zmiana typu proteolizy przez proteasomy zdefosforylowane [7], które stają się proteasomami typu APC/C<sup>CDH1</sup> (Rys. 2, strzałka żółta). Powoduje to degradację wszystkich typów cyklin, w tym cykliny B, co powoduje kompletną inaktywację cyklino-zależnych kinaz. W tym okresie odbywa się także ostateczna proteoliza białka PLK1 oraz innych białek towarzyszących mitozie (z motywem KEN)(Rys 4; dPLK1, strzałka).

*Cytokineza.* Cytokinezie towarzyszy ostateczny rozdział potomnych jąder połączonych zanikającym wrzecionem mikrotubuli rozciągającym się pomiędzy obydwooma biegunami z białkami podróżującymi z resztkową polokinazą [42]. Udział polokinazy w regulacji przebiegu cytokinezy odnosi się zarówno do procesów wyboru miejsca podziału komórki [17], mechanizmu przemieszczania się polokinaz i białek podróżujących w trakcie telofazy i cytokinezy, jak też roli polokinaz w wychodzeniu ze stadium mitozy i osiągnięcia interfazy [44]. Polokinaza (Cdc5 drożdży pączkujących) wchodzi w skład mechanizmu MEN (ang. *mitotic exit network*) warunkującego zarówno prawidłowe przemieszczenie jednego bieguna wrzeciona mitotycznego do pączka, jak też przemieszczenia polokinazy do granicy pomiędzy pączkiem a komórką rodzicielską [72]. Obecność funkcjonalnego poloboksu warunkuje, że w trakcie cytokinezy do pierścienia aktywnego i towarzyszącego mu pierścienia polokinazy dołącza trzeci pierścień struktur septynowych [72]. O ile cyklina B i sama Plk1 podlegają proteolizie w telofazie, to uwolniona z jąderka i aktywna fosfataza Cdc14 po podziale przemieszcza się z powrotem do jąderka, a następnie pewna frakcja tej fosfatazy stabilizuje interfazowy centrosom [19].

*Zaburzenia przebiegu cytokinezy w komórkach z defektywną, lub nieobecną polokinazą.* Mutanty drożdży *Saccharomyces pombe* ze stratą funkcji białka Plo1 powodowały nie tylko zatrzymanie się komórek na stadium przejścia z G2 do M ze skondensowaną chromatyną i monopolarnym wadliwym wrzecionem, ale także wykazywały liczne niefunkcjonalne zawiązki przegród (septae). Takie komórki były zatrzymane w cytokinezie [8,44]. W tych drożdżach strata funkcji białka w mutantach *plo1* powodowała zaburzenia w determinacji miejsca podziału komórki [17]. Drożdże pączkujące pozbawione funkcjonalnej polokinazy Cdc5 przybierają kształt wrzeciona z jądrami prawie rozdzielonymi, ale połączonymi cienkim mostem chromatyny z zaburzeniami w przebiegu cytokinezy i licznymi zawiązkami sept. Brak polokinazy powodował brak tworzenia obrączki polokinazy na granicy pomiędzy tworzonym pączkiem i komórką rodzicielską. Takie komórki tworzą liczne septy, a pączki mają zmieniony elipsoidalny kształt co sugeruje zmianę strefy lokalizacji wzrostu i nie kończą cytokinezy [45]. Użycie przeciwciał anti-septynom sugeruje, że powstaniu licznych sept towarzyszy zlokalizowanie polokinazy w tych septach. Te komórki tworzyły także dodatkowe pierścienie aktywne, a towarzyszyło temu wytworzenie licznych (a nie tylko dwóch) biegunów wewnątrzjądrowego wrzeciona mitotycznego. Te dane wskazują, że cała domena poloboksu wraz z końcem terminalnym C jest związana z organizacją pojedynczych struktur pierścienia cytokinezy, z regulacją mapy wzrostu korteksu i przebiegiem samej cytokinezy [44,45]. Inne mutanty komórek ssaków z defektywnym regionem poloboksu nie są zdolne do prawidłowej orientacji wrzeciona mitotycznego w komórce [44]. Eliminacja genu *plk1* z genomów wykazała, że obecność polokinazy Plk1 jest niezbędna dla ukończenia mitozy komórek linii człowieka i pączkujących drożdży [14, 15]. Znakomitych publikacji na temat roli polokinaz w cyklu komórkowym *Eukaryota* jest wiele. Coraz więcej mamy wiadomości, w jaki sposób polokinazy regulują przebieg mitozy. Z badań tych wynika, że polokinazy są wielokrotnie regulatorami poszczególnych



bardzo różnorodnych i kluczowych przemian w cyklu komórki eukaryotycznych (Rys. 4).

## PIŚMIENNICTWO

- Glover DM, Hagan IM, Tavares AAM (1998) Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Develop* 12: 3777-3787
- Cheng K-Y, Lowe ED, Sinclair J, Nigg EA, Johnson LN (2003) The crystal structure of the human polo-like kinase-1 polo box domain and its phospho-peptide complex. *EMBO J* 22: 5657-5768
- Reynolds V, Ohkura H (2003) Polo boxes form a single functional domain that mediates interactions with multiple proteins in fission yeast polo kinase. *J Cell Sci* 116: 1377-1387
- Liu J, Lewellyn AL, Chen LG, Maller JL (2004) The Polo box is required for multiple functions of Plx1 in mitosis. *J Biol Chem* 279: 21367-21373
- Nigg EA (1998) Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr Opin Cell Biol* 10: 776-783
- Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Nishida E (2002) Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep* 3: 341-348
- Vodermeier HC (2004) APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr Biol* 14: R787-R796
- Ohkura H, Hagan JM, Glover DM (1995) The conserved *Schizosaccharomyces pombe* kinase plo1 required to form a bipolar spindle, the actin ring and septum can drive septum formation in G1 and G2. *Genes Develop* 9: 1059-1073
- Ouyang B, Pan H, Lu L, Li J, Stambrook P, Li B, Dai W (1997) Human Prk is a conserved protein serine/ threonine kinase involved in regulating M phase functions. *J Biol Chem* 272: 28646-28651
- Roberts EC, Shapiro PS, Stines-Nahreini T, Pages G, Pouyssegur J, Ahn NG (2002) Distinct cell cycle timing requirements for extracellular signal regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways in somatic cell mitosis. *Mol Cell Biol* 22: 7226-7241
- O'Connell MJ, Krien MJE, Hunter T (2003) Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol* 13: 221-228
- Bartholomew CR, Woo SH, Chung YS, Jones C, Hardy CFJ (2001) Cdc5 interacts with the Wee1 kinase in budding yeast. *Mol Cell Biol* 21: 4949-4959
- Shirayama M, Toth A, Galova M, Nasmyth K (1999) APC(Cdc 20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature* 402: 203-207
- Lindon C, Pines J (2004) Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J Cell Biol* 164: 233-241
- Charles JF, Jaspersen SL, Tinker-Kulberg RL, Hwang L, Szidon A., Morgan DO (1998) The Polo-related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 8: 497-507
- Dai W, Cogswell JP (2003) Polo-like kinases and the microtubule organization center: targets for cancer therapies. *Progr Cell Cycle Res* 5: 327-334
- Bahler J, Steever AB, Wheatley S, Wang YI, Pringle JR, Gould KL, McCollum D (1998) Role of polo kinase and Mid1p in determining the site of cell division in fission yeast. *J Cell Biol* 143: 1603-1616
- Kaiser BK, Nachury MV, Gardner BE, Jackson PK (2004) *Xenopus* Cdc14  $\alpha/\beta$  are localized to the nucleolus and centrosome and are required for embryonic cell division. *BMC Cell Biol* 5: 5-27
- Mailand N, Lukas C, Kaiser BK, Jackson PK, Bartek J, Lukas J (2002) Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. *Nature Cell Biol* 4: 317-322
- Nigg EA (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev* 2: 21-32
- Harper JW, Burton JL, Solomon MJ (2002) The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Develop* 16: 2179-2205
- Barr FA, Sillje HH, Nigg EA (2004) Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 429-440
- Sumara I, Giménez-Abián JF, Gerlich D, Hirota T, Kraft C, de la Torre C, Ellenberg J, Peters J-M (2004) Roles of Polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. *Curr Biol* 14: 1712-1722
- Park J-E, Park CJ, Sakchaisri K, Karpova T, Asano S, McNally J, Sunwoo Y, Leem S-H, Lee KS (2004) Novel functional dissection of the localization-specific roles of budding yeast Polo kinase Cdc5p. *Mol Cell Biol* 24: 9873-9886
- Donaldson MM, Tavares AA, Hagan IM, Nigg EA, Glover DM (2001) The mitotic roles of Polo-like kinases. *J Cell Sci* 114: 2357-2358
- Smits VAJ, Medema RH (2001) Checking out the G2/M transition. *Biochim Biophys Acta* 1519: 1-12
- Hartwell LH, Weinert TA (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634
- Kang D, Chen J, Wong J, Fang G (2002) The checkpoint protein Chfr is a ligase that ubiquitinates Plk1 and inhibits Cdc2 at the G2 to M transition. *J Cell Biol* 156: 249-259
- Liu X, Erikson RL (2002) Polo-like kinase (Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5789-5794
- Simizu S, Osada H (2000) Mutations in *Plk* gene lead to instability of Plk protein in human tumor cell lines. *Nat Cell Biol* 2: 852-854
- Pawson T, Nash P (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300: 445-452
- Elia AEH, Cantley LC, Yaffe MB (2003) Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* 299: 1228-1231
- Sillje HHW, Nigg EA (2003) Capturing polo kinase. *Science* 299: 1190-1191
- Westendorf JM, Rao PN, Gerace L (1994) Cloning of cDNA for M-phase phosphoproteins recognized by the MPM2 monoclonal antibody and determination of the phosphorylated epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 714-718
- Seong YS, Kamijo K, Lee JS, Fernandez E, Kuriyama R, Miki T, Lee KS (2002) A spindle checkpoint arrest and a cytokinesis failure by the dominant -negative Polo-Box domain of Plk1 in U-2OS cells. *J Biol Chem* 277: 32282-32293
- Dominguez-Sola D, Dalla-Favera R (2004) PINning down the c-Myc oncoprotein. *Nature Cell Biol* 6: 288-289
- Sunkel CE, Glover DM (1988) Polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci* 89: 25-38
- Goldsteyn RM, Schultz SH, Bartek J, Ziemiecki A, Ried T, Nigg EA (1994) Cell cycle analysis and chromosomal localization of human Plk1, a putative homologue of the mitotic kinases *Drosophila* polo and *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5. *J Cell Sci* 107: 1509-1517
- Kumagai A, Dunphy WG (1996) Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science* 273: 1377-1380
- Duncan PI, Pollet N, Niehrs Ch, Nigg EA (2001) Cloning and characterization of Plx2 and Plx3, two additional Polo-like kinases from *Xenopus laevis*. *Exp Cell Res* 270: 78-87
- Yarm FR (2002) Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol Cell Biol* 22: 6209-6221
- Balasubramanian MK, Bi E, Glotzer M (2004) Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr Biol* 14: R806-R818
- Bachewich C, Thomas DY, Whiteway M (2003) Depletion of a Polo-like kinase in *Candida albicans* activates cyclase-dependent hyphal-like growth. *Mol Biol Cell* 14: 2163-2180
- Lee KS, Erikson RL (1997) Plk is a functional homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5, and elevated Plk activity induces multiple septation structures. *Mol Cell Biol* 17: 3408-3417
- Song S, Grenfell TZ, Garfield S, Erikson LR, Lee KS (2000) Essential function of the polobox of the Cdc5 in subcellular localization and induction of the cytokinetic structures. *Mol. Cell Biol* 20: 286-298



46. Feng Y, Hodge DR, Palmieri G, Chase DL, Longo DL, Ferris DK (1999) Association of polo-like kinase with alpha-, beta- and gamma-tubulins in a stable complex. *Biochem J* 339: 435-442
47. Cambiazio V, Logarinho E, Pottstock H, Sunkel CE (2000) Microtubule binding of the *Drosophila* DMAP-85 protein is regulated by phosphorylation *in vitro*. *FEBS Lett* 483: 37-42
48. do Corno Avides M, Tavares A, Glover DM (2001) Polo-like kinase and Asp are needed to promote the mitotic organizing activity of centrosomes. *Nat Cell Biol* 3: 421-424
49. Tavares AAM, Glover DM, Sunkel CE (1996) The conserved mitotic kinase polo is regulated by phosphorylation and has preferred microtubule-associated substrates in *Drosophila* embryo extracts. *EMBO J* 15: 4873-4883
50. Alexandru G, Uhlmann F, Mechtler K, Poupard M, Nasmyth K (2001) Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in *Yeast*. *Cell* 105: 459-472
51. Kelm O, Wind M, Lehmann WD, Nigg EA (2002) Cell cycle-regulated phosphorylation of the *Xenopus* Polo-like kinase Plx1. *J Biol Chem* 277: 25247-25256
52. Jang Y-J, Ma S, Terada Y, Ericson RL (2002) Phosphorylation of threonine 210 and the role of serine 137 in the regulation of mammalian polo-like kinase. *J Biol Chem* 277: 44115-44120
53. de Carcer G, do Corno Avides M, Lallen MJ, Glover DM, Gonzales C (2001) Requirement of Hsp90 for centrosomal function reflects its regulation of Polo kinase stability. *EMBO J* 20: 2878-2884
54. Logarinho E, Sunkel C (1998) The *Drosophila* POLO kinase localizes to multiple compartments of the mitotic apparatus and is required for the phosphorylation of MPM2 reactive epitopes. *J Cell Sci* 111: 2897-2909
55. Sütterlin C, Lin C, Feng Y, Ferris DK, Erikson RL, Malhotra V (2001). Polo-like kinase is required for the fragmentation of pericentriolar Golgi stacks during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9128-9132
56. Alvarez B, Martinez C, Boudewijn M, Burgerung T, Carrera AC (2001) Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals. *Nature* 413: 74444-74447
57. Noguchi K, Fukuzawa H, Murakami Y, Uehara Y (2004) Nucleolar Nek11 is a novel target of Nek2A in G1/S-arrested cells. *J Biol Chem* 279: 32716-32727
58. Scolnick DM, Halazonetis TD (2000) Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature* 406: 430-435
59. Matsusaka T, Pines J (2004) Chfr acts with the p38 stress kinases to block entry to mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol* 166: 507-516
60. Mikhailov A, Shinohara M, Rieder CL (2004) Topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors delay the G2/M transition by triggering the p38 MAPK checkpoint pathway. *J Cell Biol* 166: 517-526
61. Tsvetkov L, Xu X, Li J, Stern DF (2003) Polo-like kinase1 (Plk) and Chk2 interact and co-localize to centrosomes and the midbody. *J Biol Chem* 278: 8468-8475
62. Yuan J-H, Feng Y, Fisher RH, Maloid S, Longo DL, Ferris DK (2004) Polo-like kinase 1 inactivation following mitotic DNA damaging treatment is independent of ataxia telangiectasia mutated kinase. *Mol Cancer Res* 2:417-426
63. Smits VA, Klompaker R, Arnaud L, Rijkse G, Nigg EA, Medema RH (2000) Polo-kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat Cell Biol* 2:672- 676
64. Ando K, Ozaki D, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, Nakagawara A (2004) Polo-like kinase1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J Biol Chem* 279: 25549-25561
65. Toczyski DP, Galgoczy DJ, Hartwell LH (1997) CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* 90: 1097-1106
66. Nasmyth K (2002) Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297: 559-566
67. Sumara I., Vorlaufer E, Stukenberg PT, Kelm O, Redemann N, Nigg EA, Peters JM (2002) The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* 9: 515-525
68. Warnke S, Kemmler S, Hames RS, Tsai H-L, Hoffmann-Rohrer U, Fry AM, Hoffmann (2004) Polo-like kinase-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr Biol* 14: 1200-1208
69. Liu X, Zhou T, Kuriyama R, Erikson RL ( 2004) Molecular interactions of Polo-like kinase1 with the mitotic kinesin-like protein CHO1/MKLP-1. *J Cell Sci* 117: 3233-3246
70. Feldman JL, Marshall WF (2004) Centrioles:Bad to be bold? *Curr Biol* 14: R659-R660
71. Terada Y (2001) Role of chromosomal passenger complex in chromosome segregation and cytokinesis. *Cell Struct Func* 26: 653-657
72. Surana U, Yeong FM, Lim HH (2002) MEN, destruction and separation: mechanistic links between mitotic exit and cytokinesis in budding yeast. *BioEssays* 24: 659-666

## An involvement of polokinases in control of progress of the cell-cycle – the mechanism of transient translocation and formation of an activated protein-protein complexes during mitosis

Janina Kaczanowska, Dominika Piwońska, Andrzej Kaczanowski 

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

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

**Key words:** cell cycle, polokinases, PLK

### ABSTRACT

Polokinases are a subfamily of the mitotic serine/threonine kinases involved in coordination of a run of mitosis of eukaryotic cells. The main polo-like-kinase 1p (PLK1) is a passenger protein transiently localized to centrosomes, kinetochores and central spindle during mitosis and is required for bi-orientation of the normal metaphase spindle. Its activity is regulated at the level of protein stability and by action of upstream kinases, so that it peaks in metaphase and drops as cells exit mitosis. Regulation of location and activity of Plk1p is bi-phasic: the COOH terminal polo box domain binds to an array of mitotic phosphoproteins and followed by an allosteric conformation is activated to phosphorylate many its substrates. These mode of action involves polokinases into critical transitions of the cell cycle phases, and in control at some checkpoints of this cycle.



## STRESZCZENIE

**B**iałka 14-3-3 to rodzina wielofunkcyjnych białek występujących w postaci homo- i heterodimerów w organizmach eukariotycznych. Białka te uczestniczą w regulacji wielu procesów zachodzących na poziomie komórkowym, w tym biosyntezy melatoniny u kręgowców. Produkcja melatoniny przebiega w rytmie dobowym bądź okołodobowym, uzyskując niskie wartości w dzień a wysokie w nocy. W nocy, w komórkach syntetyzujących melatonin (pinealocytach szyszynki i fotoreceptorach siatkówki), dochodzi do wzrostu poziomu cAMP i aktywności PKA, która fosforyluje Thr<sup>31</sup> i Ser<sup>205</sup>, odpowiednio na końcu aminowym i karboksylowym cząsteczki N-acetylotransferazy serotoninowej (AANAT; kluczowego enzymu regulacyjnego w szlaku biosyntezy melatoniny). Ufosforylowany enzym łączy się z białkami 14-3-3. Utworzenie kompleksu pAANAT/14-3-3 z jednej strony stabilizuje białko enzymatyczne i ochrania je przed degradacją, a z drugiej wywołuje zmiany allosteryczne prowadzące do zwiększenia jego aktywności. Spadek poziomów cAMP w dzień lub pod wpływem ekspozycji na światło w nocy, pociąga za sobą przewagę procesu defosforylacji białka AANAT nad procesem jego fosforylacji przez kinazy PKA. Nieufosforylowane białko AANAT oddysocjuje od dimeru 14-3-3 i podlega proteosomalnej proteolizie. Dynamiczna równowaga pomiędzy procesami aktywacji/stabilizacji i degradacji cząsteczek AANAT optymalizuje natężenie produkcji melatoniny.

## BIAŁKA RODZINY 14-3-3

### BUDOWA I FUNKCJA

Białka 14-3-3 należą do rodziny wielofunkcyjnych białek o m. cz. około 30 kDa, które występują w postaci homo- lub heterodimerów w komórkach eukariotycznych. Nazwa rodziny pochodzi od wzoru migracji jej przedstawicieli otrzymanego przy zastosowaniu dwóch metod: dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej z wykorzystaniem DEAE-celulozy oraz elektroforezy w żelu skrobiowym. W genomie człowieka wykazano obecność siedmiu genów (a także szeregu potencjalnych pseudogenów) kodujących odrębne izoformy białek 14-3-3:  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$ ,  $\tau$  ( $\theta$ ) i  $\zeta$ , które nazwano zgodnie z kolejnością ich wypływania z kolumny podczas rozdzielania z wykorzystaniem wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej z odwróconą fazą. Ponadto, izoformy  $\beta$  i  $\zeta$  wyizolowano w postaci ufosforylowanej i nadano im odpowiednio nazwy  $\alpha$  i  $\delta$  [1,2]. Wymienione izoformy białek 14-3-3 występują u różnych gatunków ssaków, a także u innych gromad kręgowców. Obecność odpowiedników białek rodziny 14-3-3 ssaków wykazano u roślin, u których występuje dziesięć izoform 14-3-3, natomiast tylko po dwie izoformy zidentyfikowano u drożdży, nicieni, owadów, płazów [3,4]. Pomimo tak dużej różnorodności, wszystkie znane izoformy białek 14-3-3 charakteryzują się wysokim stopniem homologii strukturalnej. W szczególności, regiony zachowane ewolucyjnie występują w obszarze dimeryzacji białka oraz wyszczelniają tzw. kanał wiązania przez dimer 14-3-3 jego białkowego liganda [3,5,6]. Białka 14-3-3 występują głównie w cytosolu, a także w błonie komórkowej i jądrze komórkowym [5,7].

Członkowie rodziny 14-3-3, występujący w organizmach ssaków, mogą oddziaływać z ponad 200 białkami należącymi do różnych grup funkcjonalnych, w tym z kinazami białkowymi (np. kinazą C, kinazą B-Raf, zależną od wapnia i kalmoduliny kinazą lekkiego łańcucha miozyny, MEKK1, MEKK2, MEKK3), fosfatazami (Cdc25A, Cdc25C, fosfatazą tyrozyny), receptorami (np. receptorem jądrowym Nur77, podjednostką 2A receptora NMDA, receptorami 3, 5 i 9 interleukiny, receptorem glikokortykosteroidów, receptorem GABA, receptorem  $\alpha_2$ -adrenergicznym), białkami G i ich regulatorami (np. fosducyną, RGS3, RGS5), białkami regulującymi apoptozę (np. BAD, ASK I, A20), czynnikami transkrypcyjnymi i białkami jądrowymi (np. p53, TAZ, deacetylazą histonu HDAC4, HDAC5 i HDAC7, czynnikami transkrypcyjnymi NFAT, Msn2p, Msn4p), białkami strukturalnymi i cytoskieletu (np. Tau, wimentyną, keratyną), enzymami zaangażowanymi w syntezę i metabolizm białek, kwasów nukleinowych, wę-

Jolanta Rosiak<sup>1,✉</sup>

Jolanta Barbara Zawilska<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centrum Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, Łódź

<sup>2</sup>Zakład Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź

✉Centrum Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, ul. Lodowa 106, 93-232 Łódź; e-mail: jrosiak@cbm.pan.pl, tel. (042) 681 51 01

Artykuł otrzymano 12 lipca 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 9 sierpnia 2005 r.

**Słowa kluczowe:** N-acetylotransferaza serotoninowa, melatonina, cAMP, białka 14-3-3, kompleks AANAT/14-3-3

**Wykaz skrótów:** AANAT (ang. *arylalkylamine N-acetyltransferase* = *serotonin N-acetyltransferase*) – N-acetylotransferaza aryloalkiloaminowa = N-acetylotransferaza serotoninowa; ADDD (ang. *aromatic amino acid decarboxylase*) – dekarboksylaza aromatycznych aminokwasów; cAMP (ang. *cyclic adenosine 3',5'-monophosphate*) – cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan; DEAE (ang. *diethylaminoethyl*) – dwuetyloaminoetyl; GCN5 (ang. *general control non-repressed protein 5*) – nierepresorowe białko 5 kontroli ogólnej; GNAT (ang. *GCN5-related N-acetyltransferase*) – nadrodzina N-acetylotransferaz spokrewnionych z GCN5; HIOMT (ang. *hydroxyindole-O-methyltransferase*) – hydroksyindolo-O-metylotransferaza; PKA (ang. *protein kinase A*) – kinaza białkowa A; TPH (ang. *tryptophan hydroxylase*) – hydroksylaza tryptofanowa

**Podziękowanie:** Praca finansowana przez Centrum Biologii Medycznej PAN w Łodzi i Uniwersytet Medyczny w Łodzi (projekt No 502-13-409)



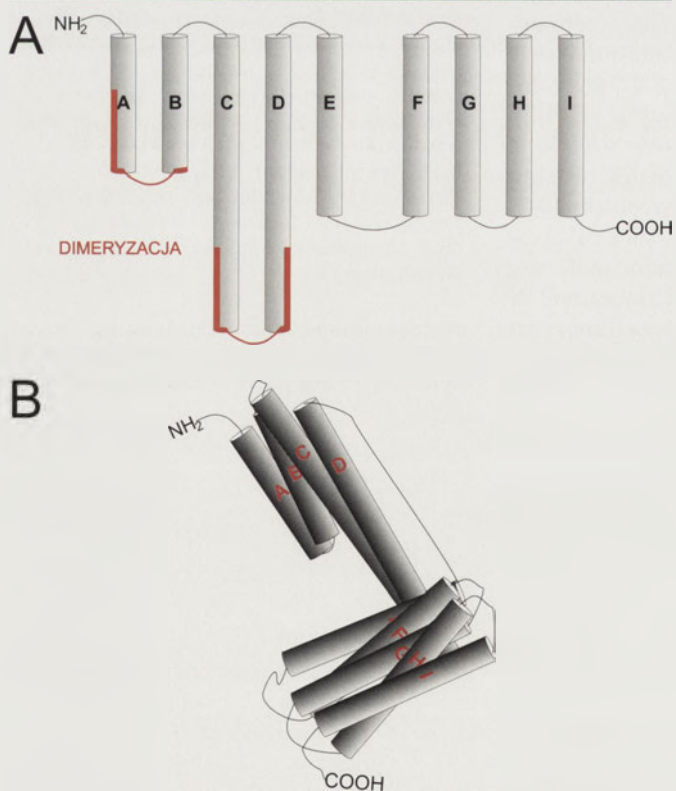
głowodanów i tłuszczu, białkami transportowymi, białkami odpowiedzialnymi za dynamikę zmian aktywności [3,6,8]. Przedstawiciele tej „wszędobylskiej” rodziny są włączeni w kontrolę cyklu komórkowego, regulację różnicowania i proliferacji, kontrolę organizacji chromatyny, kontrolę metabolizmu komórkowego, inicjację lub hamowanie apoptozy, plastyczność neuronalną, syntezę i uwalnianie neuroprzekazników, regulację funkcji receptorów, aktywność kanałów jonowych, transdukcję sygnału, w tym również fototransdukcję, transport białek. Białka 14-3-3 modulują aktywność katalityczną białek (efekt alosteryczny), z którymi tworzą kompleksy [3,7-11]. Ekspresja tkankowa poszczególnych izoform białek 14-3-3 wykazuje duże zróżnicowanie w zależności od wieku, a także ulega zmianom w odpowiedzi na uszkodzenie tkanki [6]. W diagnostyce wykrycie białek 14-3-3 w płynie rdzeniowo-mózgowym jest stosowane jako wskaźnik niektórych chorób neurodegeneracyjnych, np. choroby Creutzfelda-Jakoba oraz encefalopatii gąbczastej bydła [12,13].

Badania rentgenograficzne i krystalograficzne wykazały, że białka 14-3-3 występują w postaci homo- lub heterodimerów, których tworzenie ma kluczowe znaczenie dla biologicznej aktywności białek 14-3-3 [5]. Mechanizm procesu dimeryzacji nie został w pełni wyjaśniony. Każdy monomer składa się z dziewięciu ściśle upakowanych przeciwnoległych  $\alpha$  helis (oznaczonych literami A-I), oddzielonych krótkimi pętlami. Do powstania dimeru prowadzi interakcja pomiędzy aminokwasami N-końca (5-21) jednego monomeru (pętla A-B) i aminokwasami N-końca (58-89) drugiego monomeru (pętla C-D) (Rys. 1A). Aminokwasy uczestniczące w tworzeniu dimeru są zachowane ewolucyjnie u wszystkich białek rodziny 14-3-3. Pozostałe pięć helis (E-I),

zbudowane z C-końcowych aminokwasów, jest położonych pod kątem prawie  $90^\circ$  w stosunku do powierzchni utworzonej przez pętle A-B i C-D. Powstały dimer widziany z boku przypomina kształtem szpon (ang. *claw*) z wklęsłym rowkiem (Rys. 1B). Innym często spotykanym opisem dimeru białek 14-3-3 jest porównanie go do miseczek [5]. Zarówno N-koniec jak i C-koniec każdego z monomerów tworzy rowek, którego wewnątrz ułożone w kształt podkowy aminokwasy uczestniczą w tworzeniu połączeń z innymi białkami poprzez oddziaływania amfipatyczne. Struktura pierwszorzędowa aminokwasów tworzących ujemnie naładowany rowek jest wysoce zachowana ewolucyjnie, w odróżnieniu do sekwencji zewnętrznie położonych aminokwasów w pozycjach 9-16. Występująca wśród nich duża zmienność prawdopodobnie odpowiada za liczbę istniejących kombinacji homo- lub heterodimerów oraz nadaje specyficzność działania powstałym dimerom [3-5,10]. Każdy monomer wchodzący w skład dimeru ma zdolność do wiązania ufosforylowanego białka. Oznacza to, że jeden dimer jednocześnie może łączyć się z dwoma miejscami tego samego białka lub z dwoma różnymi białkami [3,4,10]. Pomimo, że cząsteczki niektórych białek mogą łączyć się tylko z jednym miejscem w dimerze 14-3-3, to przypuszcza się, że tylko podwójne połączenie tworzy w pełni stabilny kompleks [6]. Ze względu na oddziaływania pomiędzy  $\alpha$ -helisami cząsteczka 14-3-3 jest bardzo sztywna i ulega niewielkim zmianom w następstwie przyłączenia białka.

#### MIEJSCA ROZPOZNAWANE PRZEZ DIMER 14-3-3

Wiele białek tworzących kompleksy z przedstawicielami rodziny 14-3-3 posiada charakterystyczny motyw R(S/Ar)(+) $pSXP$  bądź RX(Ar)(+) $pSXP$ , gdzie pS oznacza fosfoserynę, S – serynę, R – arginę, P – prolinę, Ar – aminokwas aromatyczny (głównie tyrozynę lub fenyloalaninę), X – dowolny aminokwas, a „+” zasadowy aminokwas. Aminokwasy często występujące po fosfoserynie to leucyna, kwas glutaminowy, alanina lub metionina. W niektórych białkach w miejscu seryny występuje ulegająca fosforylacji treonina [3,5,10,14]. Możliwe jest również tworzenie kompleksów dimerów 14-3-3 z nieufosforylowanymi białkami (np. Cdc25B) czy modyfikowanymi peptydami. W przypadku nieufosforylowanych białek tworzących połączenia z białkami 14-3-3 sądzi się, że muszą one posiadać motyw  $[RSX_{(1-4)}]$  lub tzw. palec cynkowy [4,5,15,16]. Grupa fosforanowa fosfopeptydu tworzy wiązania jonowe i wodorowe z trzema zasadowymi aminokwasami, które występują we wszystkich białkach 14-3-3, tj. Lys<sup>49</sup>, Arg<sup>56</sup> i Arg<sup>127</sup>, oraz dodatkowo wiązanie z Tyr<sup>128</sup>. W białkach wchodzących w interakcję z dimerem 14-3-3 jedno z dwóch miejsc podlegających fosforylacji i wiążących się z 14-3-3 jest miejscem dominującym, od którego zależy utworzenie stabilnego kompleksu białko/14-3-3. Wykazano, że w przypadku braku tego miejsca (mutacja punktowa) bądź jego występowania w formie nieufosforylowanej, drugie miejsce jest zbyt słabe, aby zapewnić stabilne połączenie z dimerem 14-3-3. Jednym z pierwszych białek, dla którego szczegółowo określono przebieg interakcji z białkami 14-3-3 i fizjologiczne następstwa tej interakcji była N-acetylotransferaza serotoninowa, kluczowym enzymem regulacyjnym w szlaku biosyntezy melatoniny.



Rysunek 1. Schemat struktury monomeru białka 14-3-3 (wyjaśnienia w tekście): A – miejsca monomeru zaangażowane w tworzenie dimeru; B – struktura monomeru 14-3-3 widziana z boku, która kształtem przypomina szpon.



## MELATONINA - ENDOGENNY PRZEKAŹNIK SYGNAŁU FOTOPERIODYCZNEGO

Wiele procesów życiowych w organizmach prokariotycznych i eukariotycznych przebiega w sposób rytmiczny. Spośród różnorodnych rytmów biologicznych najlepiej opisane i poznane są rytmy okołodobowe, regulowane przez endogenne zegary biologiczne. U kręgowców ważnym endogennym koordynatorem rytmów biologicznych jest melatonina (nazywana przez niektórych badaczy hormonem ciemności), która pełni w organizmie rolę swoistego biochemicznego zegara i rolę biochemicznego kalendarza [17-19]. Biosynteza melatoniny przebiega w zależnym od warunków oświetlenia środowiska rytmie dobowym bądź okołodobowym regulowanym przez endogenne oscylatory. Niezależnie od trybu życia jaki prowadzą zwierzęta danego gatunku (dzienny, nocny czy mieszany), wytwarzanie melatoniny jest najwyższe w nocy, a najniższe w dzień. Ekspozycja na światło w nocy prowadzi do gwałtownego obniżenia zawartości melatoniny. Należy podkreślić, że sygnał melatoninowy jest zawsze dodatnio skorelowany z długością nocy [17-19].

U kręgowców głównym źródłem ustrojowej melatoniny jest szyszynka i, w mniejszym stopniu, siatkówka [18]. Melatonina powstaje również w przewodzie pokarmowym, ale w przeciwieństwie do hormonu zsyntetyzowanego w szyszynce i siatkówce, synteza melatoniny jelitowej nie podlega kontroli ze strony zegara biologicznego, a jej rola w organizmie pozostaje nie do końca wyjaśniona [20]. Melatonina jako związek wysoce lipofilowy nie jest magazynowana w miejscach syntezy. Melatonina powstała w szyszynce jest pulsacyjnie uwalniana do krwiobiegu i płynu mózgowodrdzeniowego, a następnie dociera do wszystkich narządów organizmu, gdzie wywiera swoje działania biologiczne. Melatonina wpływa na okołodobowe rytmy sen-czuwanie, zmiany temperatury ciała i rytmikę przyjmowania pokarmów, oraz na sezonowe zmiany poziomów prolaktyny w osoczu i aktywności rozrodczej zwierząt, koloru i gęstości sierści, oraz na hibernację [18,21]. Sugeruje się również, że melatonina posiada działanie immunostymulujące i onkostatyczne [22,23]. Związek zastosowany w wysokich stężeniach/dawkach działa przeciwutleniająco (zwiększając aktywność dysmutazy nadtlenkowej, peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej) i unieczynnia wolne rodniki [24,25]. Badania przeprowadzone na siatkówkach różnych gatunków kręgowców wykazały, że zsyntetyzowana w tej tkance melatonina pełni rolę lokalnego regulatora procesów fizjologicznych zachodzących w obrębie oka, zależnych od warunków oświetlenia i rytmu dobowego bądź okołodobowego: fototropowych ruchów adaptacyjnych fotoreceptorów i agregacji ziarnistości melaniny w nabłonku barwnikowym siatkówki (niższe kręgowce), fagocytozy szczytowych fragmentów segmentów zewnętrznych pręcików zawierających dyski i obrotu błon komórek fotoreceptorów, a także syntezy i uwalniania dopaminy [26,27]. Melatonina zwiększa zdolność percepcyjną siatkówki i ułatwia widzenie w warunkach słabego oświetlenia, a u ptaków integruje i moduluje informację wzrokową [26-28].

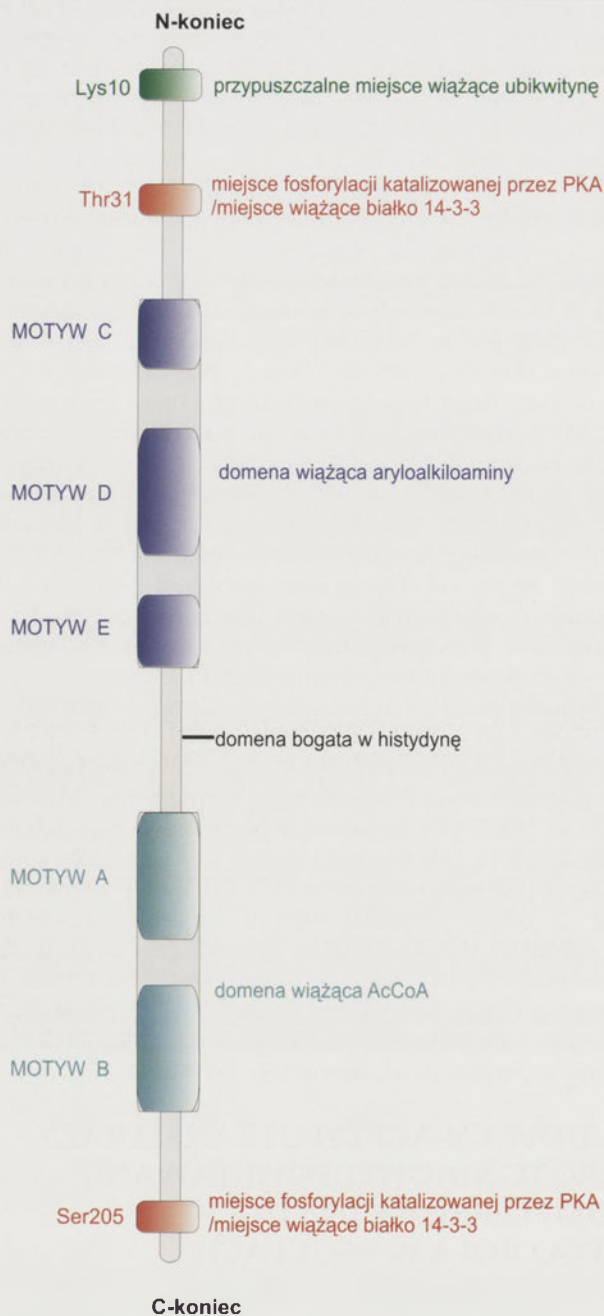
Melatonina (N-acetylo-5-metoksytryptamina) jest syntetyzowana z aminokwasowego prekursora L-tryptofanu

przy udziale czterech enzymów: hydroksylazy tryptofanowej (TPH; EC 1.14.6.4), dekarboksylazy aromatycznych aminokwasów (AAAD; EC 4.1.1.28), N-acetylotransferazy serotoninowej (N-acetylotransferazy aryloalkiloaminowej, AANAT; EC 2.3.1.87) oraz hydroksyindolo-O-metylotransferazy (HIOMT; EC 2.1.1.4). O natężeniu biosyntezy melatoniny decyduje przede wszystkim AANAT. Zmiany w aktywności AANAT (będące głównie odzwierciedleniem zmian w ilości białka enzymatycznego) przebiegają równoległe do zmian zawartości melatoniny. Z uwagi na rolę jaką AANAT odgrywa w kontroli rytmicznej biosyntezy melatoniny jest on nazywany enzymem rytmu melatoniny. Wysoka aktywność enzymu w nocy prowadzi do powstania dużych ilości N-acetyloserotoniny, która przy udziale HIOMT (aktywność tego enzymu nie wykazuje istotnych różnic w ciągu doby) jest przekształcana do melatoniny. Z kolei w dzień, niska aktywność AANAT pociąga za sobą spadek produkcji N-acetyloserotoniny i, w konsekwencji, spadek produkcji hormonu. Poziom białka AANAT zależy z jednej strony od stopnia jego syntezy, a z drugiej – degradacji. W obu tych procesach ważną rolę przypisuje się zmianom w wewnątrzkomórkowym stężeniu cyklicznego 3',5'-adenozynomonofosforanu (cAMP). U zwierząt kopytnych, małych naczelnych i niektórych gatunków ryb kostnoszkieletowych, u których ekspresja mRNA-AANAT ulega stosunkowo małym zmianom w ciągu doby, rozpad białka jest podstawowym mechanizmem regulującym aktywność AANAT [29-31]. Proteosomalna proteoliza odpowiada także za szybki ( $t_{1/2}$  około 3 min) spadek poziomu i aktywności AANAT pod wpływem światła [31-35]. Z kolei u gryzoni, u których różnice pomiędzy nocnymi a dziennymi poziomami mRNA-AANAT są bardzo wysokie (ponad stukrotne) aktywność AANAT zależy zarówno od stopnia syntezy jak i rozpadu cząsteczek enzymu [20,36,37]. W regulacji aktywności enzymu kluczową rolę odgrywają białka 14-3-3; zagadnienie to jest przedmiotem tego artykułu.

## BUDOWA N-ACETYLOTANSFERAZY SEROTONINOWEJ, POWSTAWANIE KOMPLEKSU pAANAT/14-3-3 I JEGO ROLA W REGULACJI AKTYWNOŚCI ENZYMU

Momentem przełomowym w badaniach nad regulacją biosyntezy melatoniny było sklonowanie cDNA dla białka AANAT oraz poznanie jego sekwencji aminokwasowej [30,38]. U kręgowców AANAT jest rozpuszczalnym białkiem cytosolowym zbudowanym z 203-207 reszt aminokwasowych (m.c.  $\approx$  24 kDa), natomiast AANAT drożdży składa się z 191 reszt aminokwasowych (m.c.  $\approx$  23 kDa); obie grupy białek charakteryzuje wysoki stopień homologii w obrębie 165-aminokwasowej centralnej części katalitycznej [30,36,39]. Poznanie struktury pierwszorzędowej białka AANAT umożliwiło przyporządkowanie enzymu do licznej nadrodziny N-acetylotransferaz spokrewnionych z GCN5 (GNAT). Wymiennie stosuje się także nazwę nadrodzina z motywem A/B; nazwa ta pochodzi od dwóch zachowanych ewolucyjnie miejsc, tzw. motywu A i B (Rys. 2), występujących w kieszeni wiążącej acetylokoenzym A. Enzymy nadrodziny GNAT wykorzystują acetylokoenzym





Rysunek 2. Schemat przedstawiający budowę N-acetylotransferazy serotoninowej

A jako jedyne źródło grup acetylowych i katalizują reakcje acetylowania aryloalkiloamin, histonów oraz antybiotyków aminoglikozydowych. AANAT należy do grupy enzymów acetylujących wyłącznie aryloalkiloaminy (np. serotoninę, tryptaminę) [38]. W cząsteczce AANAT wyróżnia się następujące domeny funkcjonalne: centrum katalityczne, w skład którego wchodzi bogata w reszty histydynowe domena katalityczna, obszar wiązania acetylokoenzymu A i obszar wiązania aryloalkiloamin oraz dwa miejsca fosforylacji katalizowanej przez kinazę białkową zależną od cAMP (PKA), Thr<sup>31</sup> na N-końcu i Ser<sup>205</sup> na C-końcu (Rys. 2) [40]. Miejsca fosforylacji PKA stanowią jednocześnie miejsca wiązania AANAT z białkami 14-3-3 [41,42]. Ponadto na N-końcu cząsteczki białka enzymatycznego znajduje się lizyna (Lys<sup>10</sup>), z którą najprawdopodobniej wiąże się ubikwityna [38,39].

Obecność w tych samych regionach cząsteczki AANAT miejsc fosforylacji/przyłączenia dimeru 14-3-3 (motyw PKA/14-3-3) oraz lizyny sugeruje, że mogą one być zaangażowane w degradację proteolityczną enzymu zależną od cAMP [36,40]. Spośród wszystkich członków nadrodziny GNAT tylko AANAT wiąże się z białkami 14-3-3 [39].

Precyzyjne badania przeprowadzone na półsyntetycznych białkach AANAT (do syntezy których wykorzystano fragmenty AANAT z szyszynki owcy) wykazały, że dimer 14-3-3 tworzy wiązania z aminokwasami AANAT znajdującymi się w pozycjach 24-39 oraz 192-207, wśród których znajdują się aminokwasy fosforylowane przez PKA [41,42]. Usunięcie aminokwasów 24-39 z cząsteczki AANAT uniemożliwiło połączenie się białka z 14-3-3 [41,43]. Położony na N-końcu AANAT ufosforylowany motyw RRHpTLP (tzw. motyw PKA/14-3-3, w którym R oznacza argininę, H - histydyne, pT - ufosforylowaną treoninę, L - leucynę, a P - prolinę), występujący w pozycji 28-33, odgrywa dominującą rolę w wiązaniu cząsteczki enzymu z 14-3-3 [41]. W obrębie RRHTLP można wyróżnić tzw. motywy PKA (sekwencja RRHT), w którym Thr<sup>31</sup> (T<sup>31</sup>) ulega fosforylacji katalizowanej przez PKA [41]. Wykazano, że mutacja Thr<sup>31</sup> → Ala<sup>31</sup> zapobiega indukowanemu przez forskolinę (bezpośredniego aktywatora cykazy adenylanowej) zwiększeniu aktywności AANAT [30,41]. Drugie miejsce rozpoznawane przez dimer 14-3-3 znajduje się na C-końcu AANAT. W obszarze tym nie występuje jednakże motyw PKA/14-3-3, a fosforylacji zależnej od PKA ulega Ser<sup>205</sup>, która jest również miejscem przyłączenia cząsteczki 14-3-3. Zamiana Ser<sup>205</sup> → Glu<sup>205</sup> lub Ser<sup>205</sup> → Ala<sup>205</sup> zapobiegała zależnej od cAMP aktywacji enzymu [41,42]. Dwupunktowa mutacja (Thr<sup>31</sup> i Ser<sup>205</sup>) całkowicie uniemożliwiła połączenie AANAT z 14-3-3 [42]. Obecność w komórkach nieufosforylowanych i ufosforylowanych form AANAT wskazuje na jednoczesny przebieg procesów fosforylacji i defosforylacji białka enzymatycznego. Wykazano ponadto, że defosforylacja AANAT może również występować podczas przygotowywania homogenatów tkankowych, co z kolei może w istotny sposób zmniejszać poziom mierzalnej doświadczalnie aktywności enzymu [42]. Badania przeprowadzone przez zespoły D.C. Kleina (NIH, Bethesda, USA) i P.A. Cole (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA) wykazały, że w skład kompleksów ufosforylowane białko AANAT-dimer 14-3-3 (pAANAT/14-3-3) wchodzi tylko określone izoformy białka 14-3-3, tj. ε, γ i ζ oraz prawdopodobnie także β i θ [7,41].

Warunkiem koniecznym do powstania kompleksu pAANAT/14-3-3 jest katalizowane przez PKA ufosforylowanie cząsteczki enzymu w dwóch miejscach, tj. Thr<sup>31</sup> i Ser<sup>205</sup> [42]. Kompleks pAANAT/14-3-3 tworzy jedna cząsteczka AANAT łącząca się z jednym dimerem 14-3-3 [10,41,43]. Wielokrotnie wyższe powinowactwo 14-3-3 do ufosforylowanej Thr<sup>31</sup> niż Ser<sup>205</sup> wskazuje na dwuetapowe powstawanie kompleksu pAANAT/14-3-3. Na początku do dimeru 14-3-3 przyłącza się N-końiec białka pAANAT konieczny do powstania kompleksu, tzw. „stróż” (ang. *gatekeeper*) wiązania. Związanie się tego fragmentu pAANAT z białkiem 14-3-3 jest niezbędne po to, aby w kolejnym etapie mogło nastąpić przyłączenie C-końca enzymu [42,44] (Rys. 3). Uważa się, że jedynie przyłączenie się dimeru 14-3-3 do



dwóch miejsc pAANAT w pełni stabilizuje i ochrania pAANAT, uniemożliwiając dostęp do niego innym enzymom, w tym fosfatazom [41,43]. W sytuacji, gdy pAANAT związany jest z dimerem 14-3-3 tylko w jednym miejscu może zachodzić proces wolnej proteolitycznej degradacji enzymu [39,41,42] (Rys. 3).

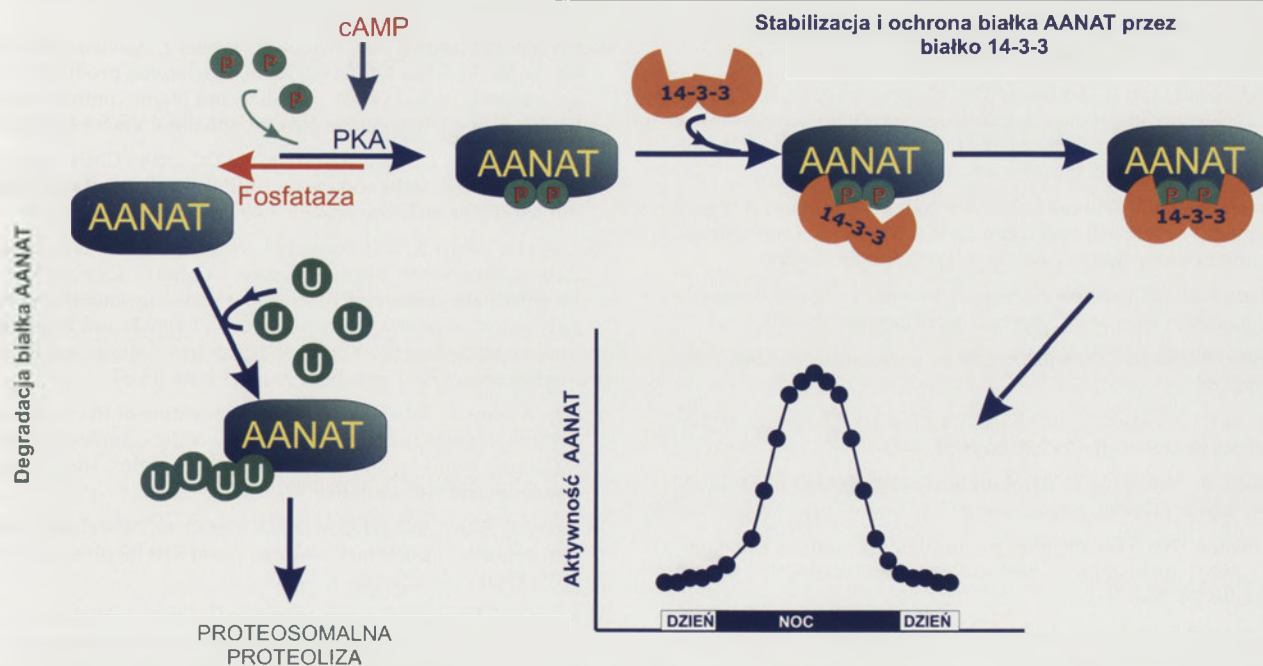
Powstanie kompleksu pAANAT/14-3-3 powoduje ponadto zmianę konformacyjną białka enzymatycznego, w wyniku której dochodzi do stabilizacji kieszeni wiążącej aryloalkiloaminy oraz miejsca wiązania acetylokoenzymu A. Z kolei ponad 10-krotne zmniejszenie stałej powinowactwa ( $K_m$ ) enzymu do substratów pociąga za sobą nasilenie przebiegu reakcji katalizowanej przez AANAT, a powstała w dużych ilościach N-acetyloserotonina jest dalej przekształcana do melatoniny [41]. Spadek wartości  $K_m$  tłumaczy także, dlaczego w nocy, pomimo obniżenia poziomu serotoniny w szyszynce (nawet o 95%) [39], produkcja melatoniny pozostaje na wysokim poziomie.

Jedną z charakterystycznych cech układu generującego melatoninę jest jego wrażliwość na światło. W badaniach przeprowadzonych na różnych gatunkach zwierząt oraz na ludziach wykazano, że ekspozycja na światło w nocy, a zatem wówczas gdy natężenie produkcji melatoniny jest wysokie, powoduje spadek aktywności AANAT i zawartości melatoniny w szyszynce i siatkówce [18]. Molekularne procesy leżące u podłoża tego zjawiska nie zostały w pełni wyjaśnione. Obecnie uważa się, że światło uruchamia kaskadę procesów, w której jednym z pierwszych etapów jest obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP, zarówno w szyszynce jak i siatkówce [30,31,34-36]. Spadek aktywności PKA pociąga za sobą przewagę procesu defosforylacji białka AANAT nad procesem jego fosforylacji. Ostatnio wykazano, że bodziec świetlny obniża o około 20% ilość ufosforylowanych form AANAT, zarówno w pozycji Thr<sup>31</sup> jak i Ser<sup>205</sup> [42]. Nieufosforylowane białko AANAT oddysocjuje od dimeru 14-3-3 i przypuszczalnie po ubikwitylacji

lizyny w pozycji 10 ulega proteosomalnej proteolizie (Rys. 3) [30,36,40-42]. Spowodowany degradacją spadek AANAT jest dodatkowo pogłębiany w wyniku zahamowania zależnej od cAMP ekspresji genu *Aanat* [30, 34, 36, 40, 42].

## PODSUMOWANIE

Białka rodziny 14-3-3 występujące w królestwie *Eukaryota* są niezbędne do prawidłowego przebiegu wielu procesów zachodzących w komórce. AANAT, kluczowy enzym regulacyjny w szlaku biosyntezy melatoniny, jest klasycznym przykładem białka, którego poziomy i aktywność znajdują się pod kontrolą białek 14-3-3. Oscylujące w rytmie dobowym bądź okołodobowym zmiany w aktywności AANAT powodują rytmiczne zmiany w stężeniach melatoniny krążącej we krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym oraz obecnej w oku. W nocy dochodzi do wzrostu poziomu cAMP w komórkach syntetyzujących melatoninę (pinealocytach szyszynki i fotoreceptorach siatkówki) i wzrostu aktywności PKA, która fosforyluje Thr<sup>31</sup> i Ser<sup>205</sup>, odpowiednio na końcu aminowym i karboksylowym cząsteczki AANAT. Ufosforylowany enzym łączy się z białkami 14-3-3. Utworzenie kompleksu pAANAT/14-3-3 z jednej strony stabilizuje białko enzymatyczne i zabezpiecza je przed degradacją (prawdopodobnie poprzez uniemożliwienie ubikwitylacji enzymu), a z drugiej wywołuje zmiany allosteryczne prowadzące do zwiększenia jego aktywności. Spadek poziomów cAMP w dzień lub pod wpływem ekspozycji na światło w nocy, pociąga za sobą przewagę procesu defosforylacji białka AANAT nad procesem jego fosforylacji przez kinazy PKA. Nieufosforylowane białko AANAT oddysocjuje od dimeru 14-3-3 i podlega proteosomalnej proteolizie. Dynamiczna równowaga pomiędzy procesami aktywacji/stabilizacji i degradacji cząsteczek AANAT optymalizuje natężenie produkcji melatoniny i umożliwia pełnienie przez hormon jego podstawowej roli fizjologicznej - koordynatora rytmów biologicznych.



Rysunek 3. Schemat regulacji aktywności N-acetylotransferazy serotoninowej (AANAT). Przyłączenie ufosforylowanej cząsteczki AANAT do dimeru białek 14-3-3, stabilizuje AANAT, zabezpiecza enzym przed degradacją i zwiększa jego powinowactwo do substratu. U – ubikwityna. Pozostałe objaśnienia w tekście.



## PIŚMIENNICTWO

1. Aitken A, Howell S, Jones D, Madrazo J, Patel Y (1995) 14-3-3  $\alpha$  and  $\delta$  are the phosphorylated forms of raf-activating 14-3-3  $\beta$  and  $\zeta$ . *In vivo* stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys motif. *J Biol Chem* 270: 5706-5709
2. Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Takahashi N, Araki K, Kuwano R, Takahashi Y (1988) Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7084-7088
3. Aitken A (1996) 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signaling pathways. *Trends Cell Biol* 6: 341-347
4. Tzivion G, Avruch J (2002) 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 277: 3061-3064
5. Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 40: 617-664
6. Yaffe MB (2002) How do 14-3-3 protein work? - Gatekeeper phosphorylation and molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* 513: 53-57
7. Klein DC, Ganguly S, Coon SL, Shi Q, Gaidrat P, Morin F, Weller JL, Obsil T, Hickman A, Dyda F (2003) 14-3-3 Proteins in pineal photoneuroendocrine transduction: how many roles? *J Neuroendocrinol* 15: 370-377
8. Pozuelo Rubio M, Geraghty KM, Wong BHC, Wood NT, Campbell DG, Morrice N, Mackintosh C (2004) 14-3-3 affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J* 379: 395-408
9. Masters SC, Subramanian RR, Truong A, Yang H, Fujii K, Zhang H, Fu H (2002) Survival-promoting functions of 14-3-3 proteins. *Biochem Soc Trans* 30: 360-365
10. Obsil T, Ghirlando R, Klein DC, Ganguly S, Dyda F (2001) Crystal structure of the 14-3-3 $\zeta$ :serotonin N-acetyltransferase complex: a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* 105: 257-267
11. Yaffe MB (2004) Master of all things phosphorylated. *Biochem J* 379: e1-e2
12. Baxter HC, Fraser JR, Liu WG, Forster JL, Clokie S, Steinacker P, Otto M, Bahn E, Wiltfang J, Aitken A (2002) Specific 14-3-3 isoform detection and immunolocalization in prion diseases. *Biochem Soc Trans* 30: 387-391
13. Green AJE (2002) Use of 14-3-3 in the diagnosis of Creutzfeldt-Jacob disease. *Biochem Soc Trans* 30: 382-386
14. Obsil T, Ghirlando R, Anderson DE, Hickman AB, Dyda F (2003) Two 14-3-3 binding motifs are required for stable association of Forkhead transcription factor FOXO4 with 14-3-3 proteins and inhibition of DNA binding. *Biochemistry* 42: 15264-15272
15. Aitken A, Baxter H, Dubois T, Clokie S, Mackie S, Mitchell A, Peden A, Zemlickova E (2002) Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 30: 351-360
16. Hallberg B (2002) Exoenzyme S binds its cofactor 14-3-3 through a non-phosphorylated motif. *Biochem Soc Trans* 30: 401-405
17. Arendt J, Skene DJ (2005) Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev* 9: 25-39
18. Zawilska JB, Nowak JZ (1999) Melatonin: from biochemistry to therapeutic applications. *Pol J Pharmacol* 51: 3-23
19. Zawilska JB, Nowak JZ (2002) Rytmika okołodobowa i zegar biologiczny. *Sen* 2: 127-136
20. Bubenik GA (2001) Localization, physiological significance and possible clinical implication of gastrointestinal melatonin. *Biol Signals Recept* 10: 350-366
21. Arendt J (1995) (red) Melatonin and the Mammalian Pineal Gland. Chapman and Hall, London
22. Nelson RJ, Demas GE, Klein SL, Kriegsfeld LJ (1995) The influence of season, photoperiod and pineal melatonin on immune function. *J Pineal Res* 19: 149-165
23. Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT (2002) Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2:113-132
24. Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA (2003) The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* 34:1-10
25. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ (2004) Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 36:1-9
26. Green CB, Besharse JC (2004) Retinal circadian clocks and control of retinal physiology. *J Biol Rhythms* 19:91-102
27. Iuvone PM, Tosini G, Pozdeyev N, Haque R, Klein DC, Chaurasia SS (2005) Circadian clocks, clock network, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Ret Eye Res* 24:433-456
28. Zawilska JB (2004) Receptory melatoninowe. W: Nowak JZ, Zawilska JB (red) Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału, PWN, Warszawa, str. 414-437
29. Falcón J, Galarneau KM, Weller JL, Ron B, Chen G, Coon SL, Klein DC (2001) Regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase-2 (AANAT2, EC 2.3.1.87) in the fish pineal organ: evidence for a role of proteosomal proteolysis. *Endocrinology* 42: 1804-1813
30. Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Bégay V, Falcón J, Cahill GM, Cassone VM, Baler R (1997) The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res* 52: 307-358
31. Schomerus C, Korf H-W, Laedtke E, Weller JL, Klein DC (2000) Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *J Neurochem* 75: 2123-2132
32. Fukuhara C, Dirden JC, Tosini G (2001) Photic regulation of melatonin in rat retina and the role of proteosomal proteolysis. *NeuroReport* 12: 3833-3837
33. Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL, Klein DC (1998) Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 279:1358-1360
34. Iuvone PM, Brown AD, Haque R, Weller J, Zawilska JB, Chaurasia SS, Ma M, Klein DC (2002) Retinal melatonin production: role of proteosomal proteolysis in circadian and photic control of arylalkylamine N-acetyltransferase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 564-572
35. Zatz M, Gastel JA, Heath JR III, Klein DC (2000) Chick pineal melatonin synthesis: light and cyclic AMP control abundance of serotonin N-acetyltransferase protein. *J Neurochem* 74: 2315-2321
36. Klein DC, Baler R, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone MP, Bégay V, Falcón J, Cahill G, Cassone VM, Coon SL (1998) The molecular basis of the pineal melatonin rhythm: regulation of serotonin N-acetylation, W: Lydic R and Baghdoyan H (red) Handbook of Behavioral State Control: Cellular and Molecular Mechanisms. CRS Press, Boca Raton, FL str. 45-59
37. Simonneaux V, Ribelayga C (2003) Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55: 325-395
38. Dyda F, Klein DC, Hickman AB (2000) GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 81-31
39. Klein DC, Ganguly S, Coon S, Weller JL, Obsil T, Hickman A, Dyda F (2002) 14-3-3 Proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. *Biochem Soc Trans* 30: 365-373



40. Ganguly S, Coon SL, Klein DC (2002) Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res* 309: 127-137
41. Ganguly S, Gastel JA, Weller JL, Schwartz CH, Jaffe H, Namboodiri MAA, Coon SL, Hickman AB, Rollag M, Obsil T, Beauverger P, Ferry G, Boutin JA, Klein DC (2001) Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8083-8088
42. Ganguly S, Weller JL, Ho A, Chemineau P, Malpoux B, Klein DC (2005) Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 1222-1227
43. Zheng W, Zhang Z, Ganguly S, Weller JL, Klein DC, Cole PA (2003) Cellular stabilization of the melatonin rhythm enzyme induced by nonhydrolyzable phosphonate incorporation. *Nat Struct Biol* 10:1054-1057
44. Zheng W, Schwarzer D, Lebeau A, Weller JL, Klein DC, Cole PA (2005) Cellular stability of serotonin N-acetyltransferase conferred by phosphonodifluoromethylene alanine (Pfa) substitution for Ser205. *J Biol Chem* 280: 10462-10467

## 14-3-3 Proteins – a role in the regulation of melatonin biosynthesis

Jolanta Rosiak<sup>1,✉</sup>, Jolanta B. Zawilska<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre for Medical Biology, Polish Academy of Sciences, 106 Lodowa Str., 93-232 Łódź, Poland, <sup>2</sup>Department of Pharmacodynamics, Medical University of Łódź, 1 Muszyńskiego Str., 90-151 Łódź, Poland

✉ e-mail: jrosiak@cbm.pan.pl

**Key words:** serotonin N-acetyltransferase, melatonin, cAMP, 14-3-3 proteins, AANAT/14-3-3 complex

### ABSTRACT

14-3-3 proteins compose a large family of proteins that exist primarily as homo- and heterodimers within all eukaryotic cells. They are engaged in the regulation of numerous cellular processes, including melatonin biosynthesis. Melatonin, the hormone of darkness, is synthesized in a diurnal or circadian rhythm, with high levels at night. It has been demonstrated that cAMP levels and PKA activity in melatonin-synthesizing cells (pinealocytes and retinal photoreceptors) increase at night. PKA phosphorylates serotonin N-acetyltransferase (AANAT; the penultimate and key regulatory enzyme in melatonin biosynthesis pathway) at its N- (Thr31) and C-(Ser205) terminal region. Phosphorylated forms of AANAT bind to 14-3-3 proteins. The formation of pAANAT/14-3-3 complex stabilizes the enzyme and protects it against proteolytic destruction. Furthermore, this complex induces allosteric changes of the AANAT molecule resulting in an increase of the enzyme activity; this in turn enhances melatonin production by several fold. Exposure to light at night decreases intracellular cAMP level with concomitant dephosphorylation of pAANAT, its dissociation from 14-3-3 dimers, proteosomal proteolysis of free AANAT molecules, and finally turning off the melatonin production.



# Replikacja DNA bakteriofaga $\lambda$ – nowe odkrycia dokonane przy użyciu starego modelu badawczego

Grzegorz Węgrzyn<sup>1,✉</sup>

Alicja Węgrzyn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, Gdańsk

<sup>2</sup>Pracownia Biologii Molekularnej Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk afiliowana przy Uniwersytecie Gdańskim, Gdańsk

<sup>✉</sup>Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; e-mail: wegrzyn@biotech.univ.gda.pl, tel. (058) 346 30 14, faks: (058) 301 00 72

Artykuł otrzymano 23 sierpnia 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 23 sierpnia 2005 r.

**Słowa kluczowe:** replikacja DNA, czynniki transkrypcyjne, bakteriofag  $\lambda$ , regulacja rozwoju wirusa, białko DnaA, białko SeqA

**Podziękowania:** Autorzy dziękują członkom ich zespołów za pełną entuzjazmu pracę nad zrozumieniem mechanizmów regulacji replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$ . Badania te były finansowane w ramach grantów Ministerstwa Nauki i Informatyzacji (projekty nr 3 P04A 029 22 oraz 3 P04A 049 24)

## STERSZCZENIE

**B**akteriofag  $\lambda$  jest modelem w badaniach z dziedziny biologii molekularnej od ponad pięćdziesięciu lat. Mimo tego, ostatnie lata przyniosły znowu (podobnie jak poprzednie okresy) wiele nowych wyników doświadczeń, które nie tylko rozszerzyły naszą wiedzę na temat molekularnych mechanizmów funkcjonowania tego wirusa lecz także rzuciły nowe światło na zagadnienia ogólnych prawidłowości w regulacji przepływu i przekazywania informacji genetycznej. W tym artykule przedstawiamy osiągnięcia z ostatniego okresu dotyczące głównie prac nad mechanizmami regulacji replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$ . Opisane tutaj w skrócie badania doprowadziły między innymi do poznania składu dziedzicznego kompleksu replikacyjnego  $\lambda$  oraz biologicznej roli szybkiej degradacji białka  $\lambda$ O pozostającego poza tym kompleksem, zaproponowania regulacji zmiany typu replikacji DNA bakteriofaga z wczesnej (model  $\theta$ ) na późną (model  $\sigma$ ), wyjaśnienia mechanizmu aktywacji transkrypcji przez replikacyjne białko DnaA i wykazania aktywności stymulatora transkrypcji przez inne białko regulujące replikację DNA – SeqA. Wyniki te mogą mieć istotne znaczenie w lepszym zrozumieniu regulacji replikacji DNA nie tylko bakteriofaga  $\lambda$  lecz także innych organizmów.

## BAKTERIOFAG $\lambda$ JAKO CIĄGLE WAŻNY MODEL BADAWCZY

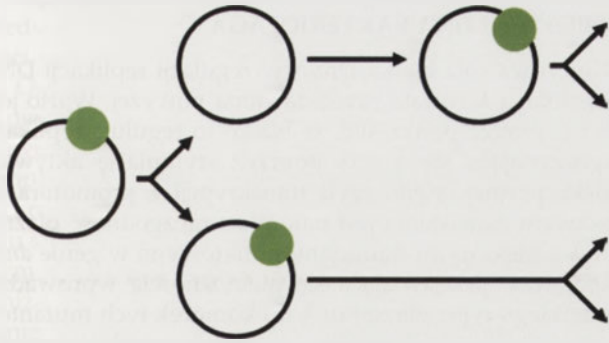
Bakteriofag  $\lambda$ , po raz pierwszy opisany ponad 50 lat temu, odegrał kluczową rolę w rozwoju biologii molekularnej. Badania nad tym wirusem dostarczyły podstawowych wiadomości o regulacji i przebiegu takich procesów jak na przykład inicjacja transkrypcji, antyterminacja transkrypcji, inicjacja replikacji DNA, funkcjonowanie białek szoku termicznego, ogólna i miejscowo-specyficzna rekombinacja DNA, tworzenie się wielobiałkowych i nukleoproteinowych kompleksów czy kontrola rozwoju na etapie wyboru alternatywnych dróg rozwojowych [1]. Mimo obecnego stanu zaawansowania badań genetycznych i biochemicznych nad znacznie bardziej skomplikowanymi organizmami, włącznie z człowiekiem, bakteriofag  $\lambda$  – być może dla niektórych niespodziewanie – nadal odgrywa niezwykle ważną rolę w poznawaniu szczegółów podstawowych procesów biologicznych zachodzących na poziomie molekularnym. Przykłady popierające to twierdzenie można znaleźć w artykułach przeglądowych opublikowanych w ostatnich latach [1-9]. Szczególnie praca autorstwa Friedman'a i Court'a [1] pokazuje dobitnie, że badania prowadzone w oparciu o bakteriofaga  $\lambda$  mogą w dalszym ciągu przynieść rezultaty o ogólnobiologicznym znaczeniu i zadziwić możliwościami jakie daje ten wirus w poznawaniu molekularnych mechanizmów zjawisk biologicznych. Znamienny jest także tytuł tego artykułu, w wolnym tłumaczeniu brzmiący: „Bakteriofag  $\lambda$ : żyje, ma się dobrze i robi swoje”. Podobny wydźwięk mają również dwie inne niedawno opublikowane prace podkreślające znaczenie badań nad bakteriofagiem  $\lambda$  we współczesnej biochemii i biologii molekularnej [8,9].

W 1999 r. opublikowaliśmy w *Postęпах Biochemii* artykuł dotyczący regulacji replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$  i plazmidów od niego pochodzących [10]. W niniejszej pracy chcielibyśmy przestawić postęp jaki dokonał się od tamtego czasu w zrozumieniu procesów, dzięki którym możliwa jest kontrola replikacji materiału genetycznego tego wirusa.

## KOMPLEKS REPLIKACYJNY BAKTERIOFAGA $\lambda$

Bakteriofag  $\lambda$  koduje dwa białka replikacyjne, O i P, niezbędne do specyficznej inicjacji replikacji z rejonu *ori* $\lambda$ . Pozostałe białka replikacyjne wykorzystywane w tym procesie są kodowane przez genom gospodarza – *Escherichia coli* [6, 7, 10]. Wcześniej proponowane hipotezy zakładały, że po utworzeniu kompleksu replikacyjnego w rejonie *ori* $\lambda$  i rozpoczęciu replikacji, struktura ta ulega rozpadowi i do rozpoczęcia każdej nowej rundy replikacyjnej niezbędne jest złożenie takiego kompleksu od nowa. Jednakże kolejne lata badań doprowadziły do





**Rysunek 1.** Schemat replikacji DNA  $\lambda$  zachodzącej według modelu  $\theta$ . Kompleks replikacyjny (zielone kółko) zawierający białka O, P, DnaB i DnaK jest dziedziczony po każdej rundzie replikacji DNA bakteriofaga lub plazmidu  $\lambda$  przez jedną z dwóch potomnych cząsteczek DNA (duże kółka). Na drugiej kopii, utworzony musi być nowy kompleks. Do inicjacji replikacji niezbędna jest dodatkowo aktywność białek DnaI i GrpE oraz proces aktywacji transkrypcyjnej *ori $\lambda$* . Dokładniejsze objaśnienia w tekście.

stwierdzenia, że raz utworzony kompleks replikacyjny  $\lambda$ , zawierający białko O chronione przed proteolizą przez inne elementy tego kompleksu, po rozpoczęciu nowej rundy replikacyjnej nie rozpada się lecz jako stabilna struktura jest dziedziczony przez jedną z dwóch potomnych kopii DNA [2, 3, 5, 6, 10]. Na drugiej kopii replikonu kompleks replikacyjny musi faktycznie powstać od nowa, ale samo jego utworzenie nie jest sygnałem do rozpoczęcia replikacji, jak to wcześniej sugerowano. Obecnie wydaje się, że sygnałem takim może być aktywacja transkrypcyjna *ori $\lambda$* , czyli transkrypcja przechodząca w rejonie *origin* (Rys. 1) [3, 5]. Nieznany jest jeszcze dokładny mechanizm w jaki transkrypcja może aktywować inicjację replikacji, ale wydaje się iż najważniejsze w tym procesie mogą być zmiany topologii DNA jakie zachodzą podczas transkrypcji, obserwowane w doświadczeniach *in vitro* [11, 12]. W szczególności kluczowe mogą być te zmiany, które występują w przypadku istnienia białka specyficznie związanego z DNA (jak na przykład białka O faga  $\lambda$  [11] lub kompleksu replikacyjnego) w transkrybowanym rejonie.

Pomimo jednoznacznego stwierdzenia dziedziczenia stabilnego kompleksu replikacyjnego  $\lambda$ , do niedawna nieznany był jego skład białkowy. Badania przeprowadzone techniką sieciowania molekularnego białko-DNA *in vivo*, immunoprecypitacji a następnie identyfikacji rejonu DNA związanego z danym białkiem przy pomocy PCR wykazały, że kompleks taki zawiera białka O i P faga  $\lambda$  oraz białka komórkowe: DnaB i DnaK [13]. O ile obecność w stabilnym kompleksie replikacyjnym białka O i P oraz helikazy DnaB nie jest zaskoczeniem, to stwierdzenie w tej strukturze białka szoku termicznego (białka opiekuńczego) DnaK było raczej niespodziewane. Wyniki te rzucają zatem nowe światło na udział białek opiekuńczych w procesie replikacji DNA. Jest to tym bardziej istotne, że zjawisko dziedziczenia kompleksu replikacyjnego, po raz pierwszy wykazane na przykładzie plazmidów pochodzących od bakteriofaga  $\lambda$ , zostało następnie wykryte w przypadku innych replikonów, zarówno prokariotycznych [14] jak i eukariotycznych [3].

Kompleks replikacyjny  $\lambda$  może być dziedziczony przez jedną z dwóch potomnych cząsteczek DNA przez wiele generacji komórkowych, jest zatem strukturą bardzo stabilną.

Jednakże niektóre warunki stresowe, jak na przykład nagły wzrost temperatury, powodują jego dysocjację od DNA i degradację przynajmniej niektórych jego elementów [3, 10]. Inne warunki stresowe, jak na przykład naświetlanie promieniami UV, nie powodują co prawda rozpadu kompleksu replikacyjnego  $\lambda$  ale uniemożliwiają utworzenie stabilnego kompleksu, przy czym replikacja DNA bakteriofaga  $\lambda$  może w dalszym ciągu zachodzić [15]. Zatem możliwe jest utworzenie dwóch rodzajów kompleksów replikacyjnych  $\lambda$ , stabilnego i niestabilnego, w zależności od warunków środowiskowych. Do tej pory nieznany jest ani skład ani mechanizm funkcjonowania kompleksu niestabilnego.

Pomimo iż białko  $\lambda$ O jest stabilizowane w kompleksie replikacyjnym, jego okres półtrwania jest wyjątkowo krótki (około 60-90 sekund), gdy występuje ono w stanie wolnym (nie związanym z DNA i innymi białkami) w komórce [2, 4, 10]. Szybka degradacja białka O jest wynikiem działania proteazy ClpP/ClpX. Pojawiło się zatem pytanie jaka jest fizjologiczna rola tej szybkiej proteolizy białka replikacyjnego skoro jego stabilna frakcja odpowiada za regulację replikacji DNA? Badania przeprowadzone z wykorzystaniem mutantów w genach *clpP* i *clpX* wykazały, że założenie iż ilość białka O nie ma istotnego znaczenia regulacyjnego gdyż występuje jego stabilna frakcja może być prawdziwe w przypadku bakterii hodowanych w bogatych pożywkach, ale poziom białka O dostępnego do tworzenia nowych kompleksów replikacyjnych jest głównym czynnikiem limitującym replikację plazmidów  $\lambda$  w wolno rosnących hodowlach komórek *E. coli* [16]. Można zatem zaproponować, że rolą szybkiej degradacji niezwiązanej formy białka O jest obniżenie efektywności replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$  w wolno rosnących komórkach gospodarza. W takich warunkach preferowany jest cykl lizogeniczny tego faga, zatem replikacja DNA powinna być negatywnie regulowana [7]. Faktycznie, okazało się iż w wolno rosnących hodowlach komórek *E. coli* cykl lizogeniczny bakteriofaga  $\lambda$  jest zaburzony w przypadku występowania mutacji w genie *clpP* lub *clpX* [17].

## WCZESNA I PÓŻNA REPLIKACJA DNA BAKTERIOFAGA $\lambda$

We wczesnej fazie rozwoju litycznego replikacja DNA bakteriofaga  $\lambda$  rozpoczyna się w miejscu *ori $\lambda$*  i przebiega według modelu  $\theta$  („z kółka w kółko”), w którym potomne nici DNA syntetyzowane są z reguły w obydwu kierunkach od miejsca *origin* [4, 6, 7, 10]. Po kilku (zwykle pięciu lub sześciu) rundach replikacji wczesnej (około 15 minut po infekcji w optymalnych warunkach wzrostu komórki gospodarza) następuje przejście do replikacji według modelu  $\sigma$  („toczącego się koła”) [4,6,7,10]. W jej wyniku powstają konkatameryczne struktury DNA złożone z wielu jednostkowych genomów  $\lambda$ , które następnie mogą być pakowane do potomnych, wcześniej uformowanych główek fagowych.

Roger McMacken wraz ze swoją grupą badawczą zaproponował model przejścia od replikacji  $\theta$  do replikacji  $\sigma$ , który jak dotąd, choć nie udowodniony bezpośrednio, jest powszechnie uznawany [7,10]. Model ten zakłada, że replikacja  $\sigma$  jest poprzedzana jedną rundą jednokierunkowej replikacji według modelu  $\theta$  zainicjowanej w miejscu *ori $\lambda$* . Po takiej rundzie następowaloby odsunięcie końca 5' synte-

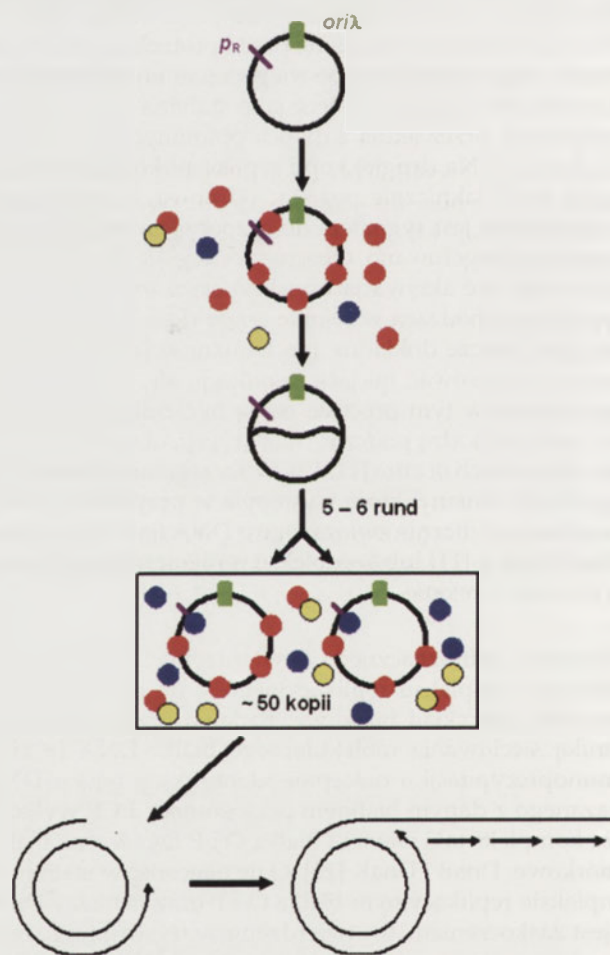


tyzowanej nici prowadzącej (ciągłej) przez nowo tworzony koniec 3' teźże nici. Kluczowe pytanie, na które powinna być znaleziona odpowiedź w celu zrozumienia regulacji zmiany typu replikacji DNA podczas rozwoju wirusa dotyczyło mechanizmu zapoczątkowania jednokierunkowej replikacji DNA  $\lambda$  według modelu  $\theta$ .

Sugestie co do białek, mogących brać udział w regulacji zmiany typu replikacji podczas rozwoju bakteriofaga  $\lambda$ , wypływały z badań genetycznych [18, 19] i wskazywały na potencjalne zaangażowanie białek  $\lambda P$  i DnaA w tym procesie. Dopiero jednak szczegółowe doświadczenia z zastosowaniem technik przesunięcia gęstościowego DNA, dwukierunkowej elektroforezy agarozowej DNA i mikroskopii elektronowej pozwoliły na zaproponowanie szczegółowej hipotezy [20]. Według tej hipotezy, procesy przegrupowania kompleksu  $ori\lambda$ - $\lambda O$ - $\lambda P$ -DnaB przy udziale białek szoku termicznego, DnaK, DnaJ i GrpE oraz umieszczenia helikazy DnaB (uwolnionej od blokującego jej aktywność białka P) w odpowiednich miejscach i w orientacji pozwalającej następnie na replikację w dwóch kierunkach są powiązane z aktywacją transkrypcyjną  $ori\lambda$ , zachodzącą podczas transkrypcji inicjowanej z promotora  $p_R$ . W związku z tym, mniej efektywna transkrypcja z promotora  $p_R$  może powodować obniżenie poziomu aktywacji transkrypcyjnej  $ori\lambda$ . To z kolei powoduje zainstalowanie tylko jednego kompleksu helikazy DnaB, a co za tym idzie prowadzi do zainicjowania replikacji jednokierunkowej, przechodzącej następnie w replikację typu  $\theta$ . Kluczową rolę w tym modelu odgrywa bakteryjne białko DnaA, które pozytywnie reguluje transkrypcję z promotora  $p_R$ . Zatem aktywność białka DnaA jest niezbędna do częstego inicjowania dwukierunkowej replikacji typu  $\theta$  z  $ori\lambda$  w komórkach *E. coli*. Omawiana hipoteza zakłada, iż po kilku rundach replikacji według modelu dwukierunkowej  $\theta$  w komórce pojawia się wiele kopii genomu  $\lambda$  (około 50 kopii po 5-6 rundach replikacyjnych) co w powiązaniu z występowaniem dużej ilości miejsc wiążących DnaA w obrębie DNA  $\lambda$  powoduje wymiarczkowanie białka DnaA w komórce. Taka sytuacja może prowadzić do mało wydajnej aktywacji transkrypcyjnej  $ori\lambda$ , która z kolei może wystarczać na zainicjowanie tylko jednokierunkowej replikacji typu  $\theta$ , która następnie przechodzi w replikację typu  $\sigma$  [20]. Ostatnie badania wskazują, że inne białka też są zaangażowane w tę regulację. Mianowicie, białko P prawdopodobnie oddziałuje z DnaA [21] i hamuje jego aktywność [22]. Ponieważ P jest białkiem stabilnym w komórce *E. coli*, akumuluje się ono podczas rozwoju litycznego, mogąc efektywnie hamować funkcje DnaA, a przez to aktywację transkrypcyjną  $ori\lambda$  w późniejszej fazie infekcji. W podobny sposób akumuluje się w zakażonej komórce białko Cro, kodowane przez bakteriofaga  $\lambda$ , które w wysokich stężeniach staje się represorem promotora  $p_R$ . Wstępne wyniki badań wskazują, że faktycznie Cro może brać udział w procesie regulacji kierunkowości replikacji DNA  $\lambda$ , podobnie jak białko SeqA, nowo odkryty regulator transkrypcji [S. Barańska, M. Narajczyk, A. Węgrzyn, G. Węgrzyn, dane niepublikowane]. Aktualny model regulacji zmiany typu replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$  podczas jego cyklu rozwojowego w komórce *E. coli* przedstawia Rys. 2.

## ROLA BIAŁKA DnaA W REGULACJI TRANSKRYPCJI I REPLIKACJI DNA BAKTERIOFAGA $\lambda$

Kluczowa rola białka DnaA w regulacji replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$  została przedstawiona powyżej. Warto jednak raz jeszcze podkreślić, że białko to reguluje replikację rozpoczynającą się z  $ori\lambda$  poprzez stymulację aktywacji transkrypcyjnej *origin*, czyli transkrypcji z promotora  $p_R$ . Ciekawym zjawiskiem jest natomiast niezgodność plazmidów  $\lambda$  z niektórymi mutacjami punktowymi w genie *dnaA* gospodarza, przejawiająca się niemożnością wprowadzenia dzikiego typu plazmidu  $\lambda$  do komórek tych mutantów (*dnaA46*, *dnaA204* i *dnaA508*), co z kolei może być zniwelowane przez mutację typu  $\pi$  w genie P na plazmidzie  $\lambda$ . Wymienione wyżej mutacje w genie *dnaA* powodują fenotyp temperaturo-wrażliwości bakterii, ale niezgodność z plazmidem  $\lambda$  występuje również w temperaturze permissywnej (30°C). W tych warunkach można co prawda obserwować



**Rysunek 2.** Hipotetyczny mechanizm zmiany typu replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$  z modelu  $\theta$  na model  $\sigma$ . W krótkim czasie po infekcji białko DnaA znajduje się w komórce w wystarczającej ilości do związania się z rejonem promotora  $p_R$  (na jednej lub kilku kopiach genomu bakteriofaga) i jego stymulacji, co skutkuje efektywną aktywacją transkrypcyjną  $ori\lambda$  i dwukierunkową replikacją typu  $\theta$ . W tym czasie, białka Cro i P występują w stosunkowo małych ilościach. Po kilku rundach replikacji, białko DnaA zostaje wymiarczkowane przez dużą liczbę sekwencji je wiążących, położonych w obrębie genomu bakteriofaga. Ponadto rosnąca ilość białka P powoduje inaktywację DnaA a rosnąca ilość białka Cro powoduje represję promotora  $p_R$ . W związku z tym aktywacja transkrypcyjna  $ori\lambda$  jest nieefektywna co powoduje rozpoczęcie jednokierunkowej replikacji typu  $\theta$ , przechodzącej po jednej rundzie w replikację typu  $\sigma$ . Białko SeqA (nie pokazane na schemacie) ma jedynie modyfikujący wpływ na tę regulację w trakcie rozwoju bakteriofaga. Szczegółowy opis tej hipotezy zawarty jest w tekście. Objaśnienia symboli: czarne duże kółko - genom bakteriofaga  $\lambda$ , zielony prostokąt -  $ori\lambda$ , fio-



obniżenie aktywności promotora  $p_R$ , ale jest to obniżenie zaledwie kilkukrotne przy jednoczesnej całkowitej niemożności uzyskania komórek transformowanych plazmidem  $\lambda$  [6]. Ostatnio zaproponowany został podwójny mechanizm tej niezgodności. Okazało się bowiem, że produkty zmutowanych alleli *dnaA* mogą być mniej aktywne w tworzeniu kompleksów replikacyjnych w *oriC* (miejsca startu replikacji chromosomalnego DNA bakterii) przypuszczalnie w wyniku słabszego oddziaływania z helikazą DnaB. W związku z tym w obecności dzikiego typu białka P, które dodatkowo obniża aktywność DnaA [21, 22], przegrywa ono zdecydowanie konkurencję o helikazę DnaB z tym białkiem fagowym [23]. Niemożność replikacji DNA powoduje, iż nawet jeśli plazmid  $\lambda$  mógłby replikować się w komórkach niosących mutację w genie *dnaA*, to komórki takie nie byłyby w stanie przeżyć i utworzyć kolonii bakteryjnej. Mutacja typu *n* w genie *P* powoduje zmniejszenie powinowactwa jego produktu do DnaB [24], a zatem umożliwia skuteczniejsze konkurowanie o helikazę przez częściowo defektywne cząsteczki białka DnaA [23].

Niezwykle istotne wydawało się dokładne poznanie mechanizmu stymulacji aktywności promotora  $p_R$  przez białko DnaA, tym bardziej, że białko to wiąże się do rejonu DNA położonego za promotorem (ang. *downstream*) [25]. W rejonie tym występują dwa miejsca słabo wiążące DnaA (w okolicach pozycji +18 i +200 w stosunku do miejsca startu transkrypcji z  $p_R$ ) i oba są absolutnie konieczne do tego wiązania - modyfikacja któregokolwiek z nich powoduje całkowitą utratę zdolności DnaA do oddziaływania z tym rejonem DNA [26].

Szczegółowa analiza biochemiczna wykazała, że DnaA jest czynnikiem stymulującym dwa etapy inicjacji transkrypcji z promotora  $p_R$ : wiązanie się polimerazy RNA do promotora i opuszczanie promotora [27]. Wydaje się prawdopodobne, że w rejonie promotora  $p_R$  białko DnaA tworzy skomplikowane przestrzenne struktury nukleoproteinowe, wprowadzające zmiany w topologii DNA i mogące ułatwiać rozpoczęcie transkrypcji.

Ciekawą obserwacją było stwierdzenie, że replikacja plazmidów  $\lambda$  jest zahamowana w mutancie *cgtA*, kodującym małe białko wiążące GTP [28]. Ten proces jest również zależny od białka DnaA, gdyż okazało się, że jego poziom jest istotnie obniżony w mutancie *cgtA* zaś nadprodukcja DnaA częściowo znosi wpływ tej mutacji na replikację bakteriofaga  $\lambda$  [28].

## BIĄTKO SeqA - CZYNNIK REPLIKACYJNY REGULUJĄCY TRANSKRYPCJĘ GENÓW BAKTERIOFAGA $\lambda$

Omawiane w poprzednim rozdziale białko DnaA jest inicjatorem replikacji DNA chromosomu bakteryjnego, jednak kontroluje replikację DNA  $\lambda$  poprzez regulację transkrypcji. Kolejnym białkiem replikacyjnym, które w komórkach *E. coli* wykazuje równocześnie aktywność regulatora inicjacji transkrypcji jest produkt genu *seqA*. Po raz pierwszy wykazano funkcję tego białka jako czynnika transkrypcyjnego badając aktywność promotora  $p_R$  bakteriofaga  $\lambda$  [29]. Okazało się, że promotor ten jest stymulowany przez białko SeqA zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Co ciekawe, podobnie jak w przypad-

ku białka DnaA, miejsca wiązania SeqA (sekwencje GATC) niezbędne do stymulacji transkrypcji rozpoczynającej się z promotora  $p_R$  położone są za miejscem inicjacji syntezy RNA (pozycje około +80 i +100) [29,30]. Dalsze badania wykazały, że SeqA może również aktywować inne promotory, na przykład dwa promotory bakteriofaga  $\lambda$  stymulowane przez białko cII:  $p_1$  i  $p_{oQ}$ . [31]. Stymulacja tych promotorów zachodziła *in vivo* i *in vitro*, jednak w systemie *in vitro* tylko w obecności białka cII i tylko wtedy gdy białko SeqA było preinkubowane z matrycą DNA przed dodaniem białka cII [31]. Stąd wniosek, że SeqA może stymulować aktywność promotorów  $p_1$  i  $p_{oQ}$  poprzez ułatwianie działania cII jako specyficznego aktywatora (na przykład ułatwiając wiązanie się cII do DNA w okolicach promotora).

Podczas inicjacji replikacji chromosomu bakteryjnego białko DnaA i SeqA działają antagonistycznie, odpowiednio jako stymulator i inhibitor tego procesu. Wzajemne funkcjonalne oddziaływania pomiędzy tymi białkami zaobserwowano również w rejonie promotora  $p_R$  [32]. Oba białka łączą się w rejonach położonych za miejscem startu transkrypcji. Nie udało się jednak wykazać ich współdziałania w stymulacji aktywności tego promotora, a wręcz przeciwnie, w doświadczeniach transkrypcji *in vitro* okazało się, że zwiększona ilość jednego z tych białek hamuje stymulacyjne działanie drugiego [32]. Sugeruje to raczej współzawodnictwo DnaA i SeqA o wiązanie się w rejonie promotora  $p_R$ . Fizjologiczne znaczenie tego procesu zostało wykazane na przykładzie replikacji plazmidów pochodzących od bakteriofaga  $\lambda$  w komórkach *E. coli* niosących różne allele genów *dnaA* i *seqA*, gdzie obserwowano supresję efektów mutacji w genie *dnaA* przez mutację w genie *seqA* [32].

Wzajemne zależności pomiędzy DnaA i SeqA były obserwowane także w innych doświadczeniach. Dla przykładu, produkt zmutowanego allelu *dnaA204*, bardzo niestabilny w komórkach *E. coli*, wykazuje znacznie podwyższony czas półtrwania gdy bakterie są jednocześnie pozbawione genu *seqA* [33]. Podwójne mutanty (w genach *dnaA* i *seqA*) wykazują ponadto inne ciekawe fenotypy, jak na przykład poważne zmiany właściwości błon komórkowych [34]. Mechanizm powstawania tych zmian nie jest jeszcze wyjaśniony, ale można przypuszczać, że zjawisko to wynika albo ze zmienionej transkrypcji wielu genów (w wyniku zaburzeń jej regulacji przy braku aktywności DnaA i SeqA), których produkty są zaangażowane w tworzenie prawidłowej struktury błony, lub też z właściwości samych białek DnaA i SeqA, gdyż oba wykazują powinowactwo do błon biologicznych. Pierwsza z tych hipotez wydaje się mniej prawdopodobna gdyż badania z wykorzystaniem mikromacierzy DNA nie wykazały istotnych różnic w poziomach mRNA genów ważnych z punktu widzenia struktury błony komórkowej w bakteriach pozbawionych genu *seqA* w porównaniu ze szczepami dzikiego typu [35].

## REPLIKACJA PLAZMIDÓW POCHODZĄCYCH OD BAKTERIOFAGA $\lambda$

Plazmidy  $\lambda$  - czyli replikony pochodzące z genomu bakteriofaga  $\lambda$  i zawierające wszystkie geny i sekwencje sygnałowe niezbędne do replikacji w komórkach *E. coli* - są od dawna wygodnymi modelami używanymi w badaniach



nad replikacją pozachromosomowych elementów genetycznych. Wiadomo było, że wśród wielu rodzajów naturalnych plazmidów replikujących się według modelu  $\theta$  jedne replikują się jednokierunkowo, a inne dwukierunkowo. Jednakże badania nad replikacją plazmidów  $\lambda$  wykazały, że w populacji jednego rodzaju plazmidu w komórkach *E. coli* mogą występować zarówno cząsteczki replikujące się jednokierunkowo, jak i cząsteczki replikujące się dwukierunkowo [36]. Ten sam cykl doświadczeń wykazał, że kierunkowość replikacji plazmidów  $\lambda$  nie zależy od tego, czy proces ten jest przeprowadzany przez dziedziczony czy nowo utworzony kompleks replikacyjny [36].

Doświadczenia przeprowadzone przed ponad trzydziestu laty sugerowały, że promotor  $p_{O'}$  położony pomiędzy genami *cII* i *O*, może mieć znaczenie w replikacji DNA  $\lambda$  [37]. Przypuszczano wówczas, że produkt transkrypcji z tego promotora, *oop* RNA, stanowi primer dla syntezy DNA. Późniejsze badania, wskazujące na aktywność tego transkryptu jako antysensownego RNA w stosunku do mRNA genu *cII*, spowodowały, że hipotezy o roli  $p_{O'}$  nie brano pod uwagę przez długi czas. Jednakże rezultaty niedawno opublikowanych doświadczeń wskazują, że rejon tego promotora jest ważny w regulacji replikacji plazmidów  $\lambda$ . Stwierdzono bowiem wyraźne obniżenie efektywności replikacji tych plazmidów w przypadku mutantów niosących punktową mutację w rejonie -10 promotora  $p_{O'}$ , która ponad stukrotnie obniża efektywność wiązania się polimerazy RNA do tego promotora [38]. Zrozumienie mechanizmu regulacji replikacji plazmidów  $\lambda$ , w którym wykorzystywany jest promotor  $p_{O'}$  wymaga jednak dalszych badań.

Oprócz doświadczeń zmierzających do zrozumienia regulacji inicjacji replikacji z *ori $\lambda$* , plazmidy  $\lambda$  były ostatnio wykorzystywane jako narzędzia w badaniach nad replikacją innych plazmidów. Konstrukcja plazmidu  $\lambda$  o precyzyjnie regulowanej liczbie kopii (dzięki wymianie promotora  $p_R$  na umożliwiający precyzyjną kontrolę efektywności inicjacji transkrypcji promotor  $p_{tet}$ ) umożliwiła pozytywną weryfikację wcześniej zaproponowanej tzw. „hipotezy katastrofy dimerów”, według której utworzenie dimerów i multimerów plazmidowych prowadzi do szybkiej utraty plazmidu z linii komórkowej w warunkach braku silnej presji selekcyjnej [39]. Zmodyfikowany plazmid  $\lambda$  z promotorem  $p_{tet}$  zamiast  $p_R$  może być ponadto wygodnym wektorem do klonowania genów, gdyż umożliwia precyzyjną regulację liczby kopii (w zakresie od 1 do około 100 na komórkę) sklonowanego fragmentu DNA [40]. Wydaje się, że takie wektory mogą być szczególnie użyteczne w przypadku klonowania i nadekspresji genów, których produkty są toksyczne dla komórek *E. coli*. Plazmid niosący taki gen może być utrzymywany w niskiej liczbie kopii zabezpieczając w ten sposób komórkę przez negatywnymi skutkami wymykającej się spod kontroli jego ekspresji, natomiast w momencie rozpoczęcia nadprodukcji, liczba kopii klonowanego genu może być podwyższona wielokrotnie [40]. Wreszcie wykorzystanie zjawiska dziedziczenia kompleksu replikacyjnego pozwoliło na zasugerowanie, że toksyna Kid, produkt genu znajdującego się na naturalnym plazmidzie R1, może działać przed składaniem kompleksu replikacyjnego ale nie po jego utworzeniu [41].

## MODULACJA REPLIKACJI DNA PRZEZ CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE

Prace prowadzone w ostatnim okresie wykazały, że obok procesów kluczowych dla kontroli inicjacji replikacji DNA z *ori $\lambda$* , opisanych powyżej, replikacja ta może być dodatkowo modulowana przez fagowe i komórkowe czynniki transkrypcyjne, a ponadto produkty ekspresji genów fagowych wpływają na replikację chromosomu komórki gospodarza. Dla przykładu, białko *cII*, aktywator transkrypcji z promotorów niezbędnych w cyklu lizogenicznym bakteriofaga, jest silnie toksyczne dla komórek *E. coli*. Ostatnio wykazano, że białko to hamuje proces replikacji DNA, prawdopodobnie w wyniku oddziaływania na aktywność helikazy DnaB [42]. Ekspresja genu *cII* podlega z kolei wielostopniowej regulacji [7]. Jego transkrypcja rozpoczyna się z promotora  $p_{R'}$ , zatem wszystkie czynniki kontrolujące aktywność tego promotora mają wpływ na poziom mRNA genu *cII*. Jako że białko *cII* wydaje się być najistotniejszym regulatorem decydującym o rozpoczęciu przez bakteriofaga  $\lambda$  cyklu litycznego bądź lizogenicznego w zależności od warunków środowiskowych [7], szczególnie ważne wydają się w tym przypadku być czynniki działające w komórce *E. coli* w odpowiedzi na zmiany warunków zewnętrznych. Jednym z nich jest specyficzny nukleotyd, czterofosforan guanozyny (ppGpp), syntetyzowany w dużych ilościach w komórce w odpowiedzi na brak aminokwasów. ppGpp w znaczący sposób moduluje transkrypcję zarówno z promotora  $p_{R'}$ , jak też z promotorów aktywowanych przez białko *cII*, regulując w ten sposób rozwój bakteriofaga  $\lambda$  [43]. Interesującym może być fakt, że stymulacja aktywności promotora  $p_{O'}$  bakteriofaga  $\lambda$  była pierwszym opisanym przypadkiem bezpośredniej pozytywnej regulacji transkrypcji przez ppGpp w oczyszczonym układzie *in vitro* [44]. Z kolei badania nad mechanizmem hamowania aktywności promotora  $p_R$  przez ppGpp wykazały, iż nukleotyd ten moduluje kilka (a nie jeden, jak poprzednio sądzono) etapów inicjacji transkrypcji, mianowicie wiązanie polimerazy RNA do promotora, tworzenie kompleksu otwartego i jego stabilizację oraz opuszczanie promotora [45].

Jak wspomniano wcześniej, poziom białka *cII* w zakażonej bakteriofagiem  $\lambda$  komórce powinien być regulowany w odpowiedzi na warunki środowiskowe. Negatywnym regulatorem translacji mRNA genu *cII* jest antysensowny transkrypt, *oop* RNA. Transkrypt ten ulega poliadenylacji przez produkt genu *pcnB*, co prowadzi do zwiększonego tempa jego degradacji [46, 47]. Wykazano, że wydajność ekspresji genu *pcnB* (kodującego poli(A) polimerazę I), a co za tym idzie wydajność poliadenylacji RNA, w komórkach *E. coli* jest odwrotnie proporcjonalna do tempa wzrostu hodowli bakteryjnej [48]. W związku z tym, białko *cII* jest wydajniej syntetyzowane w wolno rosnących komórkach. Niespodziewanie okazało się jednak, że aby białko to mogło być w pełni funkcjonalne, potrzebna jest dodatkowa aktywność innego białka kodowanego przez genom bakteriofaga  $\lambda$ , *cIII*, które znane było do niedawna tylko jako inhibitor proteazy HflB (inaczej zwanej FtsH), odpowiedzialnej m.in. za degradację *cII* [49]. Wyniki badań genetycznych sugerują, że *cIII* może być białkiem opiekuńczym, specyficznym dla białka *cII* [49].



Mimo, że – jak wynika z powyższego opisu – białko cII spełnia kluczową funkcję w regulacji rozwoju bakteriofaga  $\lambda$ , mechanizm jego oddziaływania z DNA i polimerazą RNA podczas aktywacji transkrypcji jest stosunkowo słabo poznany. Dopiero niedawno opublikowane prace wskazały, że cII może oddziaływać z podjednostką  $\alpha$  polimerazy RNA oraz pozwoliły na określenie orientacji podjednostki  $\alpha$  oddziałującej z białkiem cII [50, 51]. Wydaje się, że niedawne rozwiązanie struktury krystalicznej białka cII [52, 53] powinno przyspieszyć prace nad mechanizmem działania tego czynnika regulującego zarówno transkrypcję jak i replikację DNA.

## PODSUMOWANIE

Przedstawione w tym artykule wyniki badań z ostatnich kilku lat wskazują, że regulacja replikacji DNA jest znacznie bardziej skomplikowana niż wydawało się to jeszcze niedawno, gdy tworzono pierwsze modele molekularnej kontroli tego kluczowego dla rozwoju każdego organizmu procesu. Stosunkowo proste replikony, takie jak genom bakteriofaga  $\lambda$  i plazmidy od niego pochodzące, stanowią zatem wciąż bardzo wygodne i wydajne modele badawcze, pozwalające stosunkowo szybko uzyskiwać informacje z jednej strony bardzo szczegółowe, a z drugiej o dużym poziomie ogólności. Wydaje się, że przełomem mogącym doprowadzić do wyjaśnienia molekularnego mechanizmu kontroli inicjacji replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$  mogłoby być szczegółowe zrozumienie roli transkrypcji w regulacji tego procesu. Interesujące mogą być także badania nad ewolucją genomu fagów lambdoidalnych. Wydaje się na przykład, że konserwowane ewolucyjnie nie są poszczególne geny z rejonu replikacyjnego bakteriofaga  $\lambda$  ale rejon 5' genu *O* oraz moduł złożony z rejonu 3' tego genu i całego genu *P* [54]. Nie ulega zatem wątpliwości, że badania nad biologią molekularną bakteriofaga  $\lambda$  mogą przynieść jeszcze wiele bardzo ważnych i ciekawych odkryć.

## PIŚMIENNICTWO

- Friedman DI, Court DL (2001) Bacteriophage lambda: alive and well and still doing its thing. *Curr Opin Microbiol* 4: 201-207
- Węgrzyn G (1999) Replication of plasmids during bacterial response to amino acid starvation. *Plasmid* 41: 1-16
- Węgrzyn A, Węgrzyn G (2001) Inheritance of the replication complex: a unique or common phenomenon in the control of DNA replication? *Arch Microbiol* 175: 86-93
- Węgrzyn G, Węgrzyn A, Barańska S, Czyż A (2001) Regulation of bacteriophage lambda development. *Recent Res Dev Virol* 3: 375-386
- Węgrzyn G, Węgrzyn A (2002) Stress responses and replication of plasmids in bacterial cells. *Microb Cell Factor* 1: 2
- Węgrzyn G, Węgrzyn A (2002) Regulation of bacteriophage  $\lambda$  DNA replication. *Curr Topics Virol* 2: 187-194
- Węgrzyn G, Węgrzyn A (2005) Genetic switches during bacteriophage lambda development. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 79: 1-48
- Ptashne M (2004) Genetic switch: phage  $\lambda$  revised. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Dodd IB, Shearwin KE, Egan JB (2005) Revisited gene regulation in bacteriophage  $\lambda$ . *Curr Opin Genet Dev* 15: 145-152
- Węgrzyn A, Węgrzyn G (1999) Regulacja replikacji DNA bakteriofaga  $\lambda$  i plazmidów  $\lambda$ . *Postępy Biochem* 45: 5-11
- Leng F, McMacken R (2002) Potent stimulation of transcription-coupled DNA supercoiling by sequence-specific DNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9139-9144
- Leng F, Amado L, McMacken R (2004) Coupling DNA supercoiling to transcription in defined protein system. *J Biol Chem* 279: 47564-47571
- Potrykus K, Barańska S, Węgrzyn A, Węgrzyn G (2002) Composition of the  $\lambda$  plasmid heritable replication complex. *Biochem J* 364: 857-862
- Potrykus K, Wróbel B, Węgrzyn A, Węgrzyn G (2000) Replication of *oriJ*-based plasmid DNA during the stringent and relaxed responses of *Escherichia coli*. *Plasmid* 44: 111-126
- Węgrzyn A, Węgrzyn G (2000) Formation and stability of bacteriophage  $\lambda$  replication complexes in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 41: 157-160
- Węgrzyn A, Czyż A, Gabig M, Węgrzyn G (2000) ClpP/ClpX-mediated degradation of the bacteriophage  $\lambda$  O protein and regulation of  $\lambda$  phage and  $\lambda$  plasmid replication. *Arch Microbiol* 174: 89-96
- Czyż A, Zielke R, Węgrzyn G (2001) Rapid degradation of bacteriophage  $\lambda$  O protein by ClpP/ClpX protease influences the lysis-versus-lysogenization decision of the phage under certain growth conditions of the host cells. *Arch Virol* 146: 1487-1498
- Konopa G, Barańska B, Węgrzyn A, Węgrzyn G (2000) Bacteriophage and host mutants causing the rolling-circle  $\lambda$  DNA replication early after infection. *FEBS Lett* 472: 217-220
- Glinkowska M, Węgrzyn A, Węgrzyn G (1999) Replication of bacteriophage  $\lambda$  in the *Escherichia coli dnaA Δrac* hosts. *Genetics*, 151: 1633-1635
- Barańska S, Gabig M, Węgrzyn A, Konopa G, Herman-Antosiewicz A, Hernandez P, Schwartzman JB, Helinski DR, Węgrzyn G (2001) Regulation of the switch from early to late bacteriophage  $\lambda$  DNA replication mode. *Microbiology* 147: 535-547
- Datta I, Bamik-Maiti S, Adhijori L, San S, Das N, Mandal NC (2005) The mutation that makes *Escherichia coli* resistant to  $\lambda P$  gene-mediated host lethality is located within the DNA initiator gene *dnaA* of the bacterium. *J Biochem Mol Biol* 38: 89-96
- Datta I, San S, Sil AK, Mandal NC (2005) The bacteriophage lambda DNA replication protein P inhibits the *oriC* DNA- and ATP-binding functions of the DNA replication initiator protein DnaA of *Escherichia coli*. *J Biochem Biol Mol* 38: 97-103
- Glinkowska M, Konopa G, Węgrzyn A, Herman-Antosiewicz A, Weigel C, Seitz H, Messer W, Węgrzyn G (2001) The double mechanism of incompatibility between  $\lambda$  plasmids and *Escherichia coli dnaA(ts)* host cells. *Microbiology* 147: 1923-1928
- Konieczny I, Marszałek J (1995) The requirement for molecular chaperones in  $\lambda$  DNA replication is reduced by the mutation  $\pi$  in  $\lambda P$  gene, which weakens the interaction between  $\lambda P$  protein and DnaB helicase. *J Biol Chem* 270: 9792-9799
- Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn A, Błaszczak A, Taylor K, Węgrzyn G (1998) DnaA-stimulated transcriptional activation of *ori $\lambda$* : *Escherichia coli* RNA polymerase  $\beta$  subunit as a transcriptional activator contact site. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4241-4246
- Konopa G, Szalewska-Pałasz A, Schmidt A, Śrutkowska S, Messer W, Węgrzyn G (1999) The presence of two DnaA-binding sequences is required for efficient interaction of the *Escherichia coli* DnaA protein with each particular weak DnaA box region. *FEMS Microbiol Lett* 174: 25-31
- Glinkowska M, Majka J, Messer W, Węgrzyn G (2003) The mechanism of regulation of bacteriophage  $\lambda$   $p_R$  promoter activity by *Escherichia coli* DnaA protein. *J Biol Chem* 278: 22250-22256
- Ulanowska K, Sikora A, Węgrzyn G, Czyż A (2003) Role of the *cgtA* gene function in DNA replication of extrachromosomal elements in *Escherichia coli*. *Plasmid* 50: 45-52.
- Słomińska M, Węgrzyn A, Konopa G, Skarstad K, Węgrzyn G (2001) SeqA, the *Escherichia coli* origin sequestration protein, is also a specific transcription factor. *Mol Microbiol* 40: 1371-1380



30. Strzelczyk B, Słomińska-Wojewódzka M, Węgrzyn G, Węgrzyn A (2003) Non-random distribution of GATC sequences in regions of promoters stimulated by the SeqA protein of *Escherichia coli*. *Acta Biochim Pol* 50: 941-945
31. Słomińska M, Konopa G, Ostrowska J, Kędzierska B, Węgrzyn G, Węgrzyn A (2003) SeqA-mediated stimulation of a promoter activity by facilitating functions of a transcription activator. *Mol Microbiol* 47: 1669-1679
32. Słomińska M, Konopa G, Barańska S, Węgrzyn G, Węgrzyn A (2003) Interplay between DnaA and SeqA proteins during regulation of bacteriophage  $\lambda$   $p_R$  promoter activity. *J Mol Biol* 329: 59-68
33. Słomińska M, Wahl A, Węgrzyn G, Skarstad K (2003) The degradation of mutant initiator protein DnaA204 by proteases ClpP, ClpQ and Lon is prevented when DNA is SeqA-free. *Biochem J* 370: 867-871
34. Węgrzyn A, Wróbel B, Węgrzyn G (1999) Altered biological properties of cell membranes in *Escherichia coli* *dnaA* and *seqA* mutants. *Mol Gen Genet* 261: 762-769
35. Lobner-Olsen A, Marinus MG, Hansen FG (2003) Role of SeqA and Dam in *Escherichia coli* gene expression: a global/microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4672-4677
36. Barańska S, Konopa G, Węgrzyn G (2002) Directionality of  $\lambda$  plasmid DNA replication carried out by the heritable replication complex. *Nucleic Acids Res* 30: 1176-1181
37. Hayes S, Szybalski W (1975) Role of *oop* RNA primer in initiation of coliphage lambda DNA replication, W: Goulin M, Hanawalt P (red.) DNA synthesis and its regulation, Benjamin, Menlo Park, CA, str. 486-512.
38. Potrykus K, Perzyło E, Węgrzyn G (2002)  $p_{O'}$  a promoter for *oop* RNA synthesis, has a role in replication of plasmids derived from bacteriophage  $\lambda$ . *Plasmid* 47: 210-215
39. Herman-Antosiewicz A, Węgrzyn G (1999) Regulation of copy number and stability of phage  $\lambda$  derived pTCM1 plasmid in the light of the dimer/multimer catastrophe hypothesis. *FEMS Microbiol Lett* 176: 489-493
40. Herman-Antosiewicz A, Obuchowski M, Węgrzyn G (2001) A plasmid cloning vector with precisely regulatable copy number in *Escherichia coli*. *Mol Biotechnol* 17: 193-199
41. Potrykus K, Santos S, Lemonnier M, Diaz-Orejas R, Węgrzyn G (2002) Differential effects of Kid toxin on two modes of replication of lambdaoid plasmids suggest that this toxin acts before, but not after, the assembly of the replication complex. *Microbiology* 148: 2489-2495
42. Kędzierska B, Glinkowska M, Iwanicki A, Obuchowski M, Sojka P, Thomas MS, Węgrzyn G (2003) Toxicity of the bacteriophage  $\lambda$  *cII* gene product to *Escherichia coli* arises from inhibition of host cell DNA replication. *Virology* 313: 622-628.
43. Słomińska M, Neubauer P, Węgrzyn G (1999) Regulation of bacteriophage  $\lambda$  development by guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate. *Virology* 262: 431-441
44. Potrykus K, Węgrzyn G, Hernandez VJ (2004) Direct stimulation of the  $\lambda$   $p_{aQ}$  promoter by the transcription effector guanosine-3',5'-(bis)pyrophosphate in a defined *in vitro* system. *J Biol Chem* 279: 19860-19866
45. Potrykus K, Węgrzyn G, Hernandez VJ (2002) Multiple mechanisms of transcription inhibition by ppGpp at the lambda  $P_R$  promoter. *J Biol Chem* 277: 43785-43791
46. Wróbel B, Herman-Antosiewicz A, Szalewska-Palasz A, Węgrzyn G (1998) Polyadenylation of *oop* RNA in the regulation of bacteriophage  $\lambda$  development. *Gene* 212: 57-65
47. Szalewska-Palasz A, Wróbel B, Węgrzyn G (1998) Rapid degradation of polyadenylated *oop* RNA. *FEBS Lett* 432: 70-72
48. Jasiński J, Węgrzyn G (2003) Growth-rate-dependent RNA polyadenylation in *Escherichia coli*. *EMBO Rep* 4: 172-177
49. Latała B, Obuchowski M, Węgrzyn G (2001) Bacteriophage  $\lambda$  *cIII* gene product has an additional function apart from inhibition of *cII* degradation. *Virus Genes* 22: 127-132
50. Kędzierska B, Lee DJ, Węgrzyn G, Busby SJW, Thomas MS (2004) Role of the RNA polymerase  $\alpha$  subunits in CII-dependent activation of the bacteriophage  $\lambda$   $p_E$  promoter: identification of important residues and positioning of the  $\alpha$  C-terminal domains. *Nucleic Acids Res* 32: 834-841
51. Marr MT, Roberts JW, Brown SE, Klee M, Gussin GN (2004) Interactions among CII protein, RNA polymerase and the  $\lambda$   $p_{RE}$  promoter: contacts between RNA polymerase and the -35 region of  $p_{RE}$  are identical in the presence and absence of CII protein. *Nucleic Acids Res* 32: 1083-1090
52. Datta AB, Panjekar S, Weiss MS, Chakrabarty P, Parrack P (2005) Structure of  $\lambda$  *cII*: implications for recognition of direct repeat DNA by an unusual tetrameric organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11242-11247
53. Jain D, Kim Y, Maxwell KL, Beasley S, Zhang R, Gussin GN, Edwards AM, Darst SA (2005) Crystal structure of bacteriophage  $\lambda$  *cII* and its DNA complex. *Mol Cell* 19: 259-269
54. Wróbel B, Węgrzyn G (2002) Evolution of lambdaoid replication modules. *Virus Genes* 24: 163-171

## Bacteriophage $\lambda$ DNA replication - new discoveries made using an old experimental model

Grzegorz Węgrzyn<sup>1,2,3</sup>, Alicja Węgrzyn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, University of Gdańsk, 24 Kładki St., 80-822 Gdańsk, Poland

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Biology (affiliated with the University of Gdańsk), Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, 24 Kładki St., 80-822 Gdańsk, Poland

<sup>3</sup>e-mail: węgrzyn@biotech.univ.gda.pl

**Key words:** DNA replication, transcription factors, bacteriophage  $\lambda$ , regulation of viral development, DnaA protein, SeqA protein

### ABSTRACT

Bacteriophage  $\lambda$  is a model in molecular biology studies since over fifty years. Nevertheless, studies of recent years (similarly to previous time periods) resulted in many new experimental results which not only expanded our knowledge on molecular mechanisms of functions of this virus, but also shed new light on general rules of the transduction and transfer of genetic information. In this review, we present recent achievements of studies on mechanisms of regulation of bacteriophage  $\lambda$  DNA replication. Between others, these studies led to determination of the composition of  $\lambda$  inherited replication complex, indication of the biological role of rapid degradation of free  $\lambda$ O protein, description of the proposal of regulation of the switch from early ( $\theta$ ) to late ( $\sigma$ )  $\lambda$  DNA replication mode, elucidation of the mechanism of transcription regulation by a replication protein DnaA and demonstration of the activity of transcription stimulator by another replication regulator - the SeqA protein. These results may be important to better understand regulation of DNA replication of not only bacteriophage  $\lambda$  but also other organisms.



# Udział techniki warunkowej inaktywacji genów opartej na systemie Cre-loxP w postępie wiedzy na temat roli receptorów Notch

## STRESZCZENIE

**B**iałka Notch tworzą rodzinę receptorów błonowych, które odpowiadają za konserwatywny ewolucyjnie mechanizm wykorzystywany przez organizmy bezkręgowce i kręgowce do kontrolowania przeznaczenia różnicujących się komórek. Przekaz sygnałów przy udziale receptora Notch odbywa się na drodze bezpośrednich oddziaływań komórkowych. Po związaniu ligandu receptor Notch ulega proteolitycznej obróbce, prowadzącej do uwolnienia jego domeny cytoplazmatycznej (ICD), która po przemieszczeniu do jądra komórkowego aktywuje ekspresję docelowej grupy genów. Zakres procesów rozwojowych regulowanych przez receptory Notch jest bardzo szeroki a mutacje w genach białek Notch prowadzą zawsze do anomalii rozwojowych organizmu. U ssaków receptory Notch zaangażowane są między innymi w proces różnicowania i regulację funkcji komórek krwiotwórczych. Istotny postęp wiedzy na temat fizjologicznej roli białek Notch w rozwoju limfocytów stał się możliwy dzięki badaniom na transgenicznym zwierzętach, których geny kodujące receptory Notch zostały warunkowo unieczynnione za pomocą techniki inaktywacji genów opartej na systemie Cre-loxP. Dzięki takiemu podejściu pokonano barierę śmiertelności embrionów niosących nieaktywne geny białek Notch.

## WPROWADZENIE

Rozwój wielokomórkowego organizmu, wyposażenie go w różnorodne tkanki i nadanie mu określonego kształtu, wymaga precyzyjnego sterowania losem indywidualnych komórek na każdym z etapów tego procesu. Molekularne podłoże przekazu informacji rozwojowej nie zostało jeszcze w pełni poznane, a cząsteczki pełniące rolę „kierunkowskazów” na drodze różnicowania komórkowego stanowią wciąż żywy przedmiot zainteresowania wielu ośrodków badawczych. Szczególną „karierę” zrobił w tej dziedzinie receptor Notch.

Receptor Notch odpowiada za konserwatywny ewolucyjnie mechanizm wykorzystywany przez organizmy bezkręgowce i kręgowce do kontrolowania przeznaczenia bipotencjalnych komórek prekursorowych stojących przed wyborem jednego z możliwych szlaków dalszego różnicowania. Przekaz sygnałów przy udziale receptora Notch odbywa się na drodze bezpośrednich oddziaływań komórkowych. W kombinacji z innymi czynnikami sygnały te wpływają na wdrażanie programów różnicowania, proliferacji lub apoptozy. Po związaniu liganda receptor Notch ulega proteolitycznej obróbce prowadzącej do uwolnienia jego domeny cytoplazmatycznej (ICD), która poprzez oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi aktywuje ekspresję docelowej grupy genów. Potwierdzeniem roli odcinanego fragmentu receptora jako aktywnej cząsteczki sygnałowej było uzyskanie efektu permanentnego pobudzenia Notch w komórkach wykazujących nadekspresję domeny ICD. Zakres procesów rozwojowych regulowanych przez receptor Notch jest bardzo szeroki. We wszystkich testowanych modelach zwierzęcych, w tym także u człowieka, mutacje w genie tego białka prowadzą zawsze do anomalii rozwojowych [1]. U muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), gdzie odkryto receptor Notch, praktycznie każda tkanka ma w historii swojego rozwoju epizod, w którym receptor ten odgrywa kluczową rolę. Białko Notch odpowiada tam m.in. za prawidłowy przebieg neurogenezy, rozwój oczu oraz skrzydeł [2]. U ssaków stwierdzono zaangażowanie receptora Notch w procesy neurogenezy, somitogenezy oraz angiogenezy [1]. Niemniej jednak, dogłębne poznanie jego funkcji napotyka w tej grupie na znacznie więcej trudności. Po pierwsze, ssaki dysponują aż czterema homologicznymi wariantami receptora Notch (Notch1, Notch2, Notch3, Notch4), które w pewnych procesach mogą funkcjonować zamiennie, a w innych być niezastąpionymi [3]. Co ważniejsze, śmiertelność zarodków z mutacją w obrębie genów *Notch1* i *Notch2* (*Notch1*<sup>-/-</sup>, *Notch2*<sup>-/-</sup>) [4, 5] przez długi czas stanowiła barierę utrudniającą badanie funkcji tych receptorów u osobników dorosłych. Konsekwencją tego była możliwość studiowania praktycznie tylko mutacji somatycznych naturalnie pojawiających się w genach tych receptorów, bądź też efektów wymuszonej aktywacji szlaku sygnałowego, którą udało się uzyskać w przypadku receptora Notch1 poprzez

Katarzyna Sitnik<sup>1</sup>

Joanna Cichy<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, studentka

<sup>2</sup>Zakład Immunologii, Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

<sup>3</sup>Zakład Immunologii, Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; e-mail: CICHY@mol.uj.edu.pl, tel. (012) 664 61 35

Artykuł otrzymano 7 lipca 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 1 sierpnia 2005 r.

**Słowa kluczowe:** Notch, warunkowa inaktywacja genów, system Cre-loxP

**Wykaz skrótów:** ADAM (ang. *A disintegrin and metalloprotease*) – metaloproteinazy z rodziny ADAM; Cre – rekombinaza Cre; CSL (ang. *CFB-1, Suppressor of hairless, Lag*) – białko regulowane przez receptor Notch; DSL (ang. *Delta, Serrate and Lag*) – domena DSL; EGF (ang. *epidermal growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu; Hes (ang. *Hairy enhancer of split*) – rodzina czynników transkrypcyjnych; Notch-ICD (ang. *Notch intracellular domain*) – wewnątrzkomórkowa domena receptora Notch; MINT (ang. *Msx-2 interacting nuclear target protein*) – białko modyfikujące szlak sygnałowy receptora Notch; Nrarp (ang. *Notch regulated ankyrin repeat protein*) – białko modyfikujące szlak sygnałowy receptora Notch; RBP-J (ang. *recombination binding protein-1*) – białko regulowane przez receptor Notch

**Podziękowania:** Składamy podziękowania doc. dr hab. Joannie Berecie z Zakładu Biochemii Komórki Wydziału Biotechnologii UJ za cenne wskazówki dotyczące niniejszej pracy. Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki



wprowadzenie do komórek wektora zapewniającego ekspresję jego cytoplazmatycznej domeny (Notch1-ICD) [1]. Badania te sugerowały, iż białka Notch mogą być zaangażowane w proces różnicowania i regulację funkcji komórek krwiotwórczych, w tym limfocytów T i B [6,7]. Chociaż niezrządkiem bardzo efektywne, doświadczenia te nie stwarzały jednak podstaw do pełnego scharakteryzowania funkcji omawianych receptorów w procesach toczących się *in vivo*. Rozwiązanie problemu przyniosły techniki warunkowej inaktywacji genów oparte na systemie miejscowo specyficznej rekombinacji Cre-loxP z faga P1 [8, 9], dzięki którym stało się możliwe wyłączenie określonego genu w konkretnych typach komórek lub na pożądanym etapie rozwoju organizmu. Informacje, które udało się uzyskać dzięki takiemu podejściu przyczyniły się do znacznego pogłębienia wiedzy na temat fizjologicznej roli poszczególnych homologów receptora Notch. Ukazanie postępu, jaki dokonał się w tej dziedzinie w kontekście badań, w których wykorzystano techniki warunkowej inaktywacji genów u myszy stanowi cel niniejszego opracowania.

## STRUKTURA RECEPTORA NOTCH I JEGO LIGANDÓW

Historia receptora Notch rozpoczęła się w 1917 roku, kiedy Thomas Hunt Morgan opisał mutanty muszki owocowej, które na krawędziach skrzydeł miały charakterystyczne szczyrby (ang. *notches*). Okazało się, że ten szczególnie fenotyp był rezultatem częściowej utraty funkcji przez białko, które nazwano Notch [1]. Przez 20 lat receptor Notch pozostawał w cieniu, nie wzbudzając większego zainteresowania badaczy. Rozgłos przyniosły mu dopiero rezultaty klasycznych badań genetycznych przeprowadzonych przez Poulsona w 1937 roku. Dotyczyły one letalnych mutacji prowadzących do wykształcenia tzw. neurogennego fenotypu, który charakteryzowało nadmierne różnicowanie się komórek grzebienia nerwowego w neurony kosztem komórek glejowych. Okazało się wtedy, że receptor Notch jest niezbędny do wystąpienia zjawiska tzw. inhibicji lateralnej, pod kontrolą którego różnicują się neurony. Zjawisko to polega na tym, że rozwijający się neuron wysyła do otaczających go komórek sygnały hamujące ich różnicowanie się w tym samym kierunku. Przekaz informacji odbywa się poprzez bezpośredni kontakt komórka - komórka, w czasie którego dochodzi do interakcji pomiędzy obecnym na komórce odbierającym sygnał receptorem Notch a ligandem zlokalizowanym w błonie komórkowej neuronu [10]. Odkrycie zaangażowania białka Notch w neurogenezę, stwierdzone później także u myszy [3], zainicjowało dalsze badania, których rezultatem było uzyskanie przez omawiany receptor statusu uniwersalnego mechanizmu sterującego przeznaczeniem różnicujących się komórek. Obecnie wiadomo, że białka Notch tworzą konserwatywną ewolucyjnie rodzinę receptorów błonowych spotykanych powszechnie u bezkręgowców oraz kręgowców [3]. Ligandy receptorów z rodziny Notch również są zachowanymi ewolucyjnie integralnymi białkami błony. U muszki owocowej, gdzie receptor Notch kodowany jest przez pojedynczy gen, istnieją dwa ligandy (Serrate, Delta) zdolne do jego aktywacji. Ssaki dysponują aż czterema genami kodującymi omawiany receptor (*Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Notch4*) oraz pięcioma ligandami. Dwa z nich są homologami Serrate (Jagged1, Jagged2), a pozostałe trzy spokrewnione są z Delta (Delta1, Delta3, Del-

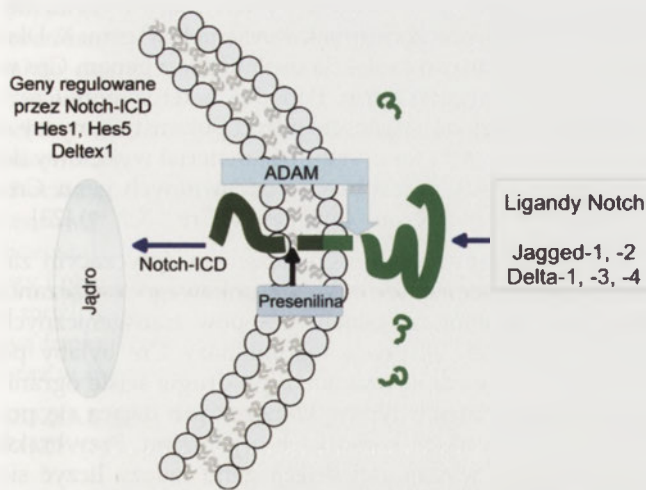
ta4). Ekspresja receptorów Notch i ich ligandów zachodzi w wielu typach komórek, przy czym w obrębie różnych tkanek dystrybucja poszczególnych białek jest odmienna [3]. Najobficiej wyposażone w receptory Notch są te obszary, w których waga się dalsze losy różnicujących się komórek. Należy tutaj wymienić komórki krwiotwórcze [11], tkankę neuroepitelialną [2], naskórek, zwłaszcza w obszarze mieszków włosowych [11] oraz inne tkanki nabłonkowe, w tym nabłonek jelita [11].

Receptor Notch syntetyzowany jest w formie pojedynczego prekursorowego łańcucha polipeptydowego. Podczas transportu do błony komórkowej, w aparacie Golgiego oraz endosomach, podlega on konstytutywnej obróbce proteolitycznej przez enzym z rodziny furyn. Odcięty przez furynę N-końcowy fragment domeny zewnątrzkomórkowej receptora (~200 kDa) pozostaje połączony z osadzoną w błonie resztą cząsteczki. Gotowy do związania liganda heterodimer eksponowany jest na powierzchni komórki. Na tym etapie receptor Notch jest integralnym białkiem błony komórkowej, którego łańcuch polipeptydowy przechodzi przez dwuwarstwę lipidową jednokrotnie. Receptor Notch składa się z trzech zasadniczych domen strukturalnych - zewnątrzkomórkowej, transbłonowej oraz cytoplazmatycznej [3]. Domena zewnątrzkomórkowa zawiera: (i) wielokrotnie powtarzający się motyw czynnika wzrostu nabłonka (EGF), który bierze udział w wiązaniu liganda; liczba powtórzeń EGF różni się u poszczególnych białek z rodziny Notch (Notch u *D. melanogaster* oraz Notch1 i Notch2 - 36, Notch3 - 34, Notch4 - 29), (ii) trzy powtórzenia bogate w cysteinę, które zabezpieczają przed niespecyficzną aktywacją ścieżki sygnałowej. W cytoplazmatycznej części receptora możemy wyróżnić: domenę RAM (ang. *RBPjk-Associated Molecule domain*), sześć powtórzeń ankirynowych, dwa sygnały lokalizacji jądrowej, domenę transaktywującą (Notch3 i Notch4 nie posiadają tej domeny) oraz sekwencję PEST (jej obecność przyspiesza degradację białka w proteasomach skracając tym samym okres jego funkcjonowania w komórce). Jak już wcześniej wspomniano, ligandy receptorów Notch są transbłonowymi białkami zgrupowanymi w dwóch rodzinach - Serrate oraz Delta. Wspólną cechą strukturalną wszystkich ligandów jest niezbędna do interakcji z receptorem N-końcowa domena DSL (ang. *Delta, Serrate and Lag*) oraz występowanie powtórzeń motywu EGF. Dodatkowym elementem budowy charakterystycznym dla rodziny Serrate (Serrate, Jagged1, Jagged2) jest zlokalizowana tuż przy błonie komórkowej domena bogata w cysteinę [3].

## DROGA AKTYWACJI RECEPTORA NOTCH

Po związaniu ligandu receptor Notch podlega sekwencji dwóch cięć proteolitycznych. W pierwszej kolejności dochodzi do „złuszczenia” (ang. *shedding*) zewnątrzkomórkowej domeny receptora, potem zaś do środowiska wewnątrzkomórkowego uwalniana jest jego domena cytoplazmatyczna. Pierwszego cięcia dokonują w obrębie domeny zewnątrzkomórkowej prawdopodobnie metaloproteiny z rodziny ADAM (ang. *a disintegrin and metalloprotease*) (Rys. 1). Odcięty fragment receptora pozostaje związany z ligandem i w kompleksie z nim może ulegać endocytozie przez komórkę będącą donorem liganda. Skrócony receptor Notch podlega w obrębie domeny transbłonowej drugiemu cięciu, które przeprowadza obecna w błonie komórkowej prese-





**Rysunek 1.** Schemat przekazu sygnału przez receptor Notch. W wyniku związania liganda, receptor Notch jest ścinany z powierzchni komórek najprawdopodobniej przez proteinę z rodziny ADAM. W konsekwencji dochodzi do kolejnego trawienia receptora Notch przez proteiny aspartylowe – preseniliny i uwolnienia wewnątrzkomórkowego fragmentu Notch-ICD. Uwolniony Notch-ICD wędruje do jądra komórkowego, gdzie pośredniczy w regulacji genów *Hes1*, *Hes5* i *Deltex1*.

nilina [10]. Enzym ten uwalnia cytoplazmatyczną domenę receptora (zwana dalej ICD), która po przemieszczeniu do jądra wiąże się z czynnikiem transkrypcyjnym CSL/RBP-J (CFB-1 u człowieka, *suppressor of hairless* u *D. melanogaster*, *Lag* u *C. elegans*, **RBP-J** u myszy). Efektem tego oddziaływania jest zmiana właściwości CSL z represora na aktywator transkrypcji [3]. Docelowa grupa genów regulowanych przez receptor Notch nie została jeszcze w pełni poznana. Do tej pory zaliczono do niej: geny czynników transkrypcyjnych z rodziny *Hes* (ang. *Hairy enhancer of split*) – *Hes1* i *Hes5* [12], *Cdkn1a* [13], *Nrarp* [14], *Deltex1* [15] oraz *Ptcr* (pre-T- $\alpha$ ) [16].

#### MODULACJA ŚCIEŻKI SYGNAŁOWEJ ZALEŻNEJ OD RECEPTORA NOTCH

Regulacja szlaku sygnałowego zależnego od receptora Notch odbywa się na kilku poziomach – zewnątrzkomórkowym, cytoplazmatycznym oraz jądrowym, a zaangażowane w nią czynniki mogą albo wyciszać, albo wzmacniać przekaz sygnału.

#### POZIOM ZEWNĄTRZKOMÓRKOWY – REGULACJA PRZEZ O-GLIKOZYLACJĘ

Reszty seryny i treoniny w obrębie motywów EGF domeny zewnątrzkomórkowej receptora Notch mogą podlegać fukozytacji przez rezydującą w aparacie Golgiego O-fukozylotransferazę. Stwierdzono, że obecność reszt fukozy potrzebna jest do efektywnego wiązania ligandów przez wspomniany receptor [17]. Możliwa jest jeszcze dalsza modyfikacja reszt fukozy, polegająca na przyłączeniu N-acetyloglukozaminy przez glikozylotransferazy zwane białkami *Fringe*. Dodatkowa glikozylacja powoduje, że tylko ligandy z rodziny *Delta* mogą zaktywować receptor Notch [18].

#### REGULACJA NA POZIOMIE CYTOPLAZMATYCZNYM

Do cytoplazmatycznych modulatorów funkcji receptora Notch należą białka *Deltex1* oraz *Numb*. U *D. melanogaster* nadekspresja *Deltex1* prowadzi do takiego samego fenotypu, jaki obserwuje się w przypadku ciągłego pobudzenia

receptora Notch. Wnioskuje się zatem, że czynnik ten pełni rolę pozytywnego regulatora szlaku sygnałowego receptora Notch [19]. Nieco bardziej problematyczne wydaje się określenie funkcji homologicznego odpowiednika *Deltex1* w komórkach ssaków. Wyniki niektórych badań przemawiają bowiem za efektem hamującym, podczas gdy inne sugerują, że *Deltex1* stymuluje działanie receptora Notch [1]. Czynnik *Numb* hamuje funkcje receptora Notch, najprawdopodobniej poprzez blokowanie przemieszczania się do jądra komórkowego cytoplazmatycznej domeny ICD [20].

#### REGULACJA NA POZIOMIE JĄDROWYM

Do tej pory zidentyfikowano dwa działające na terenie jądra komórkowego białka modyfikujące szlak sygnałowy receptora Notch: *Nrarp* (ang. *Notch regulated ankyrin repeat protein*) oraz *MINT* (ang. *Msx2-interacting nuclear target protein*). Swoje hamujące wpływy wywierają one poprzez zaburzanie interakcji domeny ICD z czynnikiem transkrypcyjnym CSL/RBP-J. Białko *Nrarp*, dzięki posiadaniu dwóm motywom ankirynowym, zdolne jest do interakcji zarówno z ICD jak i z CSL/RBP-J [21]. Hamujący wpływ czynnika *MINT* myszy (jego homolog u człowieka nazywa się *SHARP*) wynika z tego, iż konkuruje on z ICD o wiązanie z CSL/RBP-J [22].

#### SYSTEM CRE-LOXP I JEGO ZASTOSOWANIE W TECHNICIE WYŁĄCZANIA GENÓW (ANG. GENE TARGETING)

Określenie fenotypów zmutowanych osobników ma podstawowe znaczenie dla zrozumienia fizjologicznych funkcji genów. U ssaków podejście to było początkowo ograniczone do badania rzadkich mutacji spontanicznych. Dopiero technika wyłączenia genów i umiejętność jej zastosowania do modyfikacji genetycznych w komórkach linii zarodkowej myszy przyniosły ogromny postęp w tej dziedzinie. Zasadniczo metoda ta polega na dokonaniu modyfikacji (inaktywacji, mutacji punktowej itp.) pożądanego genu w genomie komórek macierzystych zarodka. Wykorzystuje się tutaj zjawisko rekombinacji homologicznej pomiędzy wybranym odcinkiem genomowego DNA a wprowadzanym do komórki wektorem zawierającym nieaktywną, zmutowaną wersję owego fragmentu, oraz „gen markerowy” pozwalający na selekcję mutantów (najczęściej gen oporności na neomycynę). Komórki macierzyste, w których nastąpiła wymiana odpowiednich fragmentów, wprowadzane są następnie do znajdującego się w stadium blastocysty zarodka mysiego, po czym chimeryczne embriony umieszcza się w macicy zastępczych matek. Ze względu na totipotencjalność embrionalnych komórek macierzystych istnieje szansa, że podczas rozwoju organizmu chimerycznego wezmą one udział w tworzeniu linii płciowej, co pozwoli na przeniesienie mutacji do komórek rozrodczych. Potomstwo takich właśnie chimerycznych myszy będzie posiadało mutację w każdej komórce swego organizmu [23]. Ogromny postęp, jaki dokonał się w dziedzinie unieczynniania genów u ssaków nie byłby możliwy, gdyby nie zaczęto korzystać z systemu miejscowo specyficznej rekombinacji *Cre-loxP* opisanej w 1981 roku przez Sternberga i Hamiltona [24]. Pochodząca z faga P1 rekombinaza *Cre* rozpoznaje i następnie dokonuje rekombinacji pomiędzy specyficznymi 34 nukleotydowymi sekwencjami zwanymi *loxP*. W przypadku, gdy orienta-

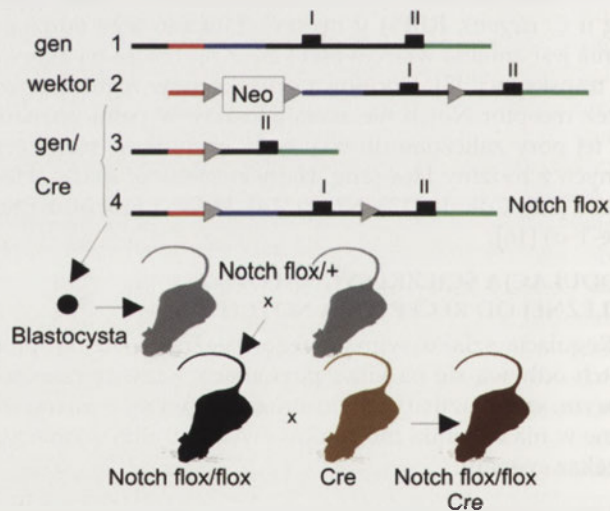


cja sekwencji loxP jest taka sama, efektem działania enzymu jest usunięcie znajdującego się pomiędzy nimi odcinka DNA i pozostawienie w tym miejscu pojedynczego miejsca loxP. Antyrównoległe ułożenie sekwencji loxP prowadzi natomiast do odwrócenia ograniczonego nimi fragmentu. Okazuje się, że rekombinaza Cre może z powodzeniem działać w komórkach ssaków, co pokazano w doświadczeniach na modelu mysim [25,26]. Zastosowanie systemu Cre-loxP do techniki wyłączania genów u ssaków umożliwiło dokonywanie delecji dowolnego odcinka DNA, jeśli tylko znajdował się on pomiędzy sekwencjami loxP. Najważniejszą konsekwencją takiego wykorzystania rekombinazy Cre była możliwość uzyskiwania organizmów z warunkowo wyłączonymi genami (ang. *conditional knockouts*), u których inaktywacja danego genu ma miejsce tylko w wybranych typach komórek bądź jest indukowana na dowolnym etapie rozwoju organizmu [23]. Skąd bierze się przewaga warunkowego wyłączania genów nad klasycznym podejściem, w którym mutacja obecna jest we wszystkich komórkach organizmu od stadium zarodkowego? Należy pamiętać, że geny działają zwykle na kilku etapach ontogenezy oraz w różnych typach komórek, a ich mutacje często prowadzą do śmierci już w stadium zarodka. Jeżeli badany gen pełni kluczową rolę w kilku następujących po sobie procesach to podejście klasyczne pozwala uzyskać informacje tylko o pierwszym z nich. Ponadto trudno jest tutaj jednoznacznie stwierdzić, jakie komórki są odpowiedzialne za obserwowany fenotyp. Technika warunkowej inaktywacji genów zapoczątkowała drogę prowadzącą do pokonania tych ograniczeń.

Zasadniczo do przeprowadzenia warunkowej delecji pożądanego genu konieczne jest stworzenie transgenicznym osobników, które w swoich komórkach zawierają jednocześnie: (i) gen rekombinazy Cre pod kontrolą tkankowo specyficznego promotora bądź promotora regulowanego przez zewnątrzkomórkowe induktory, (ii) gen przeznaczony do inaktywacji otoczony sekwencjami loxP. Strategia tworzenia osobników z genem unieczynnionym warunkowo obejmuje szereg etapów. Pierwszy wykorzystuje bazujące na rekombinacji homologicznej techniki klasyczne i polega na otoczeniu sekwencjami loxP wybranego genu (zwykle jednego lub kilku egzonów) w genomie embrjonalnych komórek macierzystych myszy (Rys. 2). Stosowany do tego celu wektor zawiera dwa podstawowe elementy takie jak: interesujący nas gen oraz kasetę oporności na neomycynę. Każdy z nich ograniczony jest sekwencjami loxP. Z komórek wyselekcjonowanych w oparciu o cechę oporności na antybiotyk usuwa się gen markerowy przez zapewnienie tymczasowej ekspresji rekombinazy Cre (transfekcja plazmidem zawierającym gen kodujący rekombinazę Cre). Po tym zabiegu komórki wprowadza się do mysiej blastocysty w celu uzyskania szczepu, który będzie produkować komórki płciowe z otoczonym loxP genem w jednym z loci. Potomstwo takich osobników krzyżuje się z transgenicznymi myszami posiadającymi gen rekombinazy Cre pod kontrolą tkankowo specyficznego promotora bądź promotora regulowanego przez zewnątrzkomórkowe induktory. Osobniki z pokolenia F1 (o genotypie  $Cre^{+/-} X^{lox/+}$ ) krzyżuje się między sobą dla uzyskania myszy, u których na obu chromosomach znajduje się ograniczony loxP gen X ( $Cre^{+/-} X^{lox/lox}$ ), i które stanowią ostateczny cel niniejszej procedury. Poziom rekombinazy, jaki w warunkach indukcji zapewnia

pojedyncza kopia genu Cre jest wystarczająco wysoki, aby doszło do delecji otoczonego sekwencjami loxP genu X. Dlatego nie jest konieczna selekcja osobników z genem Cre w układzie homozygotycznym. Ponadto, heterozygoty  $Cre^{+/-}$  występują z większą częstością wśród potomstwa myszy o genotypie  $Cre^{+/-} X^{lox/+}$  oraz stanowią materiał wyjściowy do otrzymania myszy kontrolnych pozbawionych genu Cre, ale posiadających otoczony loxP gen X ( $Cre^{-/-} X^{lox/lox}$ ) [23].

Obecnie podstawowym ograniczeniem dotyczącym zakresu wykorzystania techniki warunkowego wyłączania genów jest dostępność takich szczepów transgenicznym myszy, u których ekspresja rekombinazy Cre byłaby po pierwsze odpowiednio wysoka, a po drugie ściśle ograniczona do pożądanego typu komórek lub dająca się pobudzić we wszystkich komórkach organizmu. Przy braku stuprocentowej wydajności delecji genu należy liczyć się z możliwością powstania fałszywego fenotypu na skutek konkurencyjnego wyeliminowania komórek zmutowanych przez pozostające w organizmie komórki typu dzikiego. Obecnie najmniej problematyczna wydaje się być inaktywacja genów w limfocytach. Dysponujemy tutaj odpowiednimi szczepami myszy, które pozwalają wyłączać geny preferencyjnie w komórkach T, gdy gen rekombinazy Cre znajduje się pod kontrolą promotora lck [23] oraz w komórkach B, gdy ekspresja rekombinazy zależy od promotora genu ko-



**Rysunek 2.** Schemat inaktywacji genu przy użyciu systemu Cre-loxP. Do genu przeznaczanego do inaktywacji (1) wprowadzono miejsca loxP przy użyciu zadanego wektora (2) (dwa pierwsze egzony – I i II – przedstawiają wypełnione prostokąty, kolory wprowadzono dla lepszego zobrazowania mechanizmu inaktywacji). Wektor zawierał sekwencję homologiczną do inaktywowanego genu otoczoną sekwencjami loxP (trójkąty) oraz kasetę oporności na neomycynę (Neo), w celu selekcji klonów komórek, w których doszło do homologicznej rekombinacji. Kasetę oporności na neomycynę także została otoczona miejscami loxP. Następnie, kłony komórek niewrażliwych na neomycynę transfekowano przejściowo za pomocą cDNA dla rekombinazy Cre, w celu wycięcia kasety Neo. W wyniku działania rekombinazy Cre doszło do powstania trzech różnych produktów rekombinacji, w tym dwóch pozbawionych kasety Neo (zaznaczone na rysunku jako 3 i 4). Klony komórek zawierające gen otoczony przez miejsca loxP (produkt 4 – *Notch flox*) wprowadzono do mysiej blastocysty w celu uzyskania osobników z oflankowanym genem *Notch* w jednym z loci (*Notch flox/+*). Osobniki te skrzyżowano ze sobą w celu otrzymania myszy posiadających gen *Notch* otoczony miejscami loxP w obydwu loci (*Notch flox/flox*). Tak uzyskane myszy, skrzyżowano następnie z myszami transgenicznymi posiadającymi gen rekombinazy Cre pod kontrolą indukowanego promotora. W wyniku tej krzyżówki otrzymano myszy o fenotypie *Notch flox/+ Cre+/-*, które po ponownym skrzyżowaniu między sobą doprowadzą do otrzymania zarówno myszy *Notch flox/flox Cre-*, jak również *Notch flox/flox Cre+*. Po indukcji promotora *Cre* u myszy *Notch flox/flox Cre+* dojdzie do delecji genu *Notch*, podczas gdy myszy *Notch flox/flox Cre-* będą stanowiły kontrolę negatywną.



dującego receptor CD19 [27]. Dzięki stymulowanemu przez interferon  $\alpha$  lub interferon  $\beta$  promotorowi Mx możliwe jest także dokonanie delecji w obu liniach limfocytów jednocześnie z wydajnością około 98%. Nie jest to jednak metoda selektywna. Przy stosowaniu tego rozwiązania do indukcji rekombinazy Cre dochodzi bowiem w wielu narządach, chociaż z różną wydajnością. Najwyższą, bo niemal stuprocentową skuteczność delecji obserwuje się w wątrobie. W pozostałych miejscach stopień inaktywacji genu jest mniejszy i przyjmuje różne wartości [28]. Należy zatem liczyć się z możliwością, iż obserwowany fenotyp stanowi wypadkową funkcji pełnionych przez wyłączony gen w limfocytach oraz w innych tkankach.

## UDZIAŁ RECEPTORA NOTCH1 W ROZWOJU LIMFOCYTÓW T

Receptor Notch1 pełni kluczową rolę w rozwoju limfocytów T. Limfocyty T i B powstają ze wspólnej komórki macierzystej, która w pewnym momencie musi „podjąć decyzję” o swoim dalszym losie i rozpocząć różnicowanie w kierunku jednego typu limfocytów. Większość limfocytów T powstaje w grasicy z komórek macierzystych, które wemigrowały ze szpiku. Pozostające w szpiku komórki prekursorowe dają początek populacji limfocytów B. Receptor Notch1 determinuje, czy z komórek prekursorowych powstaną limfocyty T czy B [11]. Należy podkreślić, iż zależne od Notch1 przekształcanie się komórek prekursorowych w kierunku limfocytów T jest jednym z najbardziej spektakularnych i najlepiej udokumentowanych przykładów wpływu pojedynczego białka na rozwój limfocytów. Jeżeli w komórkach krwiotwórczych dokona się warunkowej inaktywacji genu *Notch1*, to takie komórki przekształcą się w grasicy w limfocyty B, zamiast w limfocyty T [11]. Jeśli natomiast w komórkach szpiku kostnego nastąpi wymuszona aktywacja receptora Notch1, to dojdzie do nagromadzenia się w szpiku limfocytów T na koszt limfocytów B [29].

Pierwsze doniesienia sugerujące zaangażowanie receptorów Notch w rozwój limfocytów pochodzą z początku lat 90-tych z badań Ellisen i wsp. Wykazały one związek pomiędzy trwałą aktywacją receptora Notch1, wynikającą z translokacji chromosomowej, a rozwojem ostrej białaczki limfoblastycznej [30]. Odkrycie to wywołało falę kolejnych doświadczeń, w których naśladowano efekt konstytutywnej aktywacji receptora Notch1 w komórkach transfekowanych wektorem zapewniającym ekspresję cytoplazmatycznej domeny (ICD) tegoż receptora. Zaobserwowano wtedy, że wywołanie takiego efektu w niedojrzałych limfocytach T prowadzi do zmian we wzajemnych proporcjach ilościowych pomiędzy subpopulacjami limfocytów T [6, 7]. Gdy transfekowane w podobny sposób komórki krwiotwórcze przeszczepiono myszom pozbawionym własnych komórek szpikowych na skutek napromieniowania stwierdzono, że po zasiedleniu szpiku kostnego nie różnicują się one w limfocyty B, lecz w limfocyty T [11].

Ponieważ myszy pozbawione funkcjonalnego receptora Notch1 giną w stadium zarodkowym [4], dopiero warunkowa inaktywacja genu receptora Notch1 dokonana przez grupę Agueta pozwoliła uzyskać pełen wgląd w fizjologiczną rolę tego białka w komórkach linii limfocytarnej.

Skonstruowany szczep myszy posiadał znajdujący się pod kontrolą promotora Mx gen rekombinazy Cre oraz ograniczony sekwencjami loxP egzon kodujący peptyd sygnałowy białka Notch1. Myszy, u których zaraz po urodzeniu wyłączono gen *Notch1* przez podawanie interferonu  $\alpha$  posiadały wyraźny defekt w rozwoju limfocytów T. W grasicy tych zwierząt nie powstawały limfocyty T, lecz zamiast nich akumulowały się komórki o fenotypie limfocytów B. W porównaniu z kontrolą, u myszy pozbawionych genu *Notch1* liczba obecnych w grasicy komórek B zwiększyła się ponad 200 razy. Inaktywacja *Notch1* nie spowodowała natomiast żadnych zaburzeń w rozwoju granulocytów, erytrocytów, komórek NK oraz szpikowych limfocytów B [11]. Dotychczas nie stwierdzono, aby którykolwiek z pozostałych homologów receptora Notch1 wpływał w znaczący sposób na podjęcie decyzji o różnicowaniu się wspólnego prekursora limfocytów. Zgodnie z powyższym, warunkowa inaktywacja genu *Notch2* nie ma żadnego wpływu na rozwój limfocytów T [31]. Podobne rezultaty uzyskano badając komórki progenitorowe pozbawione receptora Notch3 [3].

W szpiku stwierdza się powszechne występowanie receptorów Notch oraz ich ligandów, zarówno na komórkach krwiotwórczych jak i komórkach stromy [3]. Skoro aktywacja receptora Notch1 prowadzi do zapoczątkowania linii limfocytów T, jak zatem wytłumaczyć zdolność pozostających w szpiku komórek prekursorowych do różnicowania się w limfocyty B? Badania Souabni i wsp. wskazują, że czynnik Pax5, którego ekspresja jest niezbędna do indukcji rozwoju limfocytów B hamuje transkrypcję genu *Notch1*. Wymuszona ekspresja Pax5 w komórkach szpiku kostnego powoduje zwiększenie ilości powstających limfocytów B kosztem limfocytów T [32]. Efekt wczesnego zablokowania rozwoju komórek T na korzyść różnicowania się limfocytów B, uzyskano także w przypadku warunkowej inaktywacji genu czynnika RBP-J u myszy [33]. Zaburzenie w rozwoju limfocytów T, jakie obserwuje się u osobników pozbawionych funkcjonalnego RBP-J jest identyczne, jak w przypadku inaktywacji genu *Notch1*. Sygnał, jaki receptor Notch1 przekazuje prekursorom limfocytów za pośrednictwem czynnika RBP-J odgrywa zatem kluczową rolę w zapoczątkowaniu linii limfocytów T [33]. Konstytutywna ekspresja genów *Hes-1* oraz *Hes-5* w komórkach krwiotwórczych uniemożliwia ich rozwój w kierunku limfocytów B na terenie szpiku kostnego [34]. W związku z powyższym, czynniki *Hes-1* i *Hes-5* uważa się za elementy wewnątrzkomórkowego aparatu, który wykonuje istotne dla różnicowania się prekursorów limfocytów instrukcje przekazywane poprzez receptor Notch1.

Wyniki przedstawionych badań pozwalają wnioskować, iż obecność receptora Notch1 na komórkach prekursorowych jest niezbędna do podjęcia przez nie różnicowania w kierunku limfocytów T. Brak sygnału przekazywanego przez ten receptor powoduje, że z komórek prekursorowych powstają w grasicy limfocyty B [11].

## ROLA RECEPTORA NOTCH2 W ROZWOJU KOMÓREK B

Spektakularne odkrycia dotyczące roli receptora Notch1 w powstawaniu limfocytów T zachęciły do poszukiwań mających na celu poznanie funkcji jego pozostałych homologów. Przypuszczenie o zaangażowaniu któregoś z



nich w późniejszych etapach rozwoju limfocytów B wynikało z obserwacji, iż w śledzeniu myszy z unieczynnionym genem czynnika RBP-J dochodzi do zaniku pewnej subpopulacji komórek B zwanych limfocytami strefy brzeżnej [33]. Wkrótce okazało się, że kluczową rolę w powstawaniu wspomnianej grupy komórek B pełni receptor Notch2. Myszy, z wyłączonym warunkowo genem tego receptora posiadały identyczne zaburzenie dotyczące komórek B strefy brzeżnej [31]. Wyniki te świadczą o tym, że aktywacja Notch2 jest warunkiem koniecznym do uruchomienia programu komórkowego, którego celem jest utworzenie tej subpopulacji limfocytów. Jest również prawdopodobne, że aktywacja Notch2 będzie odgrywała rolę w różnicowaniu limfocytów B w odpowiedzi na antygen, ponieważ spośród wszystkich białek rodziny Notch to właśnie Notch2 wykazuje najwyższy poziom ekspresji w obwodowych limfocytach B [31].

## POSZUKIWANIA FIZJOLOGICZNYCH LIGANDÓW RECEPTORÓW NOTCH1 ORAZ NOTCH2

W przeciwieństwie do stosunkowo rozległej wiedzy na temat roli receptorów Notch1 i Notch2 w procesie limfopoetyki znacznie mniej jasna pozostaje kwestia, które ligandy odpowiadają za ich aktywację w warunkach *in vivo*. Komórki stromalne należące do wyprowadzonej ze szpiku kostnego linii OP-9, które nie posiadają naturalnej zdolności do pobudzania komórek krwiotwórczych do różnicowania się w limfocyty T zyskują ją w warunkach wymuszonej ekspresji liganda Delta1. Stymulację różnicowania limfocytów T zaobserwowano zarówno w odniesieniu do mysich, jak i komórek krwiotwórczych człowieka hodowanych w obecności zmienionych w powyższy sposób komórek OP-9 [3]. Jednakże wypływające z powyższych doświadczeń przypuszczenia, że ligand Delta1 może także odgrywać kluczową rolę w powstawaniu komórek T *in vivo* nie potwierdziły się w badaniach Hozumi i wsp., w których dokonano warunkowej inaktywacji genu *Delta1* u myszy [35]. Zatem ligand ten albo w ogóle nie jest zaangażowany w kluczową dla powstania komórek T aktywację receptora Notch1, albo jego funkcja może być zastąpiona przez inne ligandy.

Wysoki poziom ekspresji w grasicy wykazuje także ligand Delta4 [35]. Jego zdolność do pobudzania rozwoju komórek T została potwierdzona w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Myszy, u których dochodzi do nadekspresji genu *Delta4* w komórkach krwiotwórczych mają taki sam fenotyp, jak w przypadku konstytutywnej aktywacji receptora Notch1 [35]. Pytanie czy ligand Delta4 jest rzeczywiście niezbędny do pobudzenia receptora Notch1 na komórkach prekursorowych czy może jego rola ogranicza się jedynie do kompensowania braku Delta1 pozostaje nadal bez jednoznacznej odpowiedzi. Udział Delta3 w omawianym procesie wydaje się mało prawdopodobny, po pierwsze ze względu na niski stopień homologii do blisko ze sobą spokrewnionych Delta1 i Delta4, a po drugie, z powodu śladowego poziomu ekspresji genu *Delta3* na terenie grasicy [35]. Z przeprowadzonych do tej pory badań wynika, że białka z rodziny Jagged nie uczestniczą w aktywacji receptora Notch1 na komórkach prekursorowych limfocytów [35].

Ligand Delta1 jest natomiast absolutnie niezbędny do zależnej od receptora Notch2 indukcji rozwoju populacji

limfocytów B strefy brzeżnej śledziona. Dowodzą tego badania na myszach z wyłączonym genem *Delta1*, u których stwierdzono całkowity brak wspomnianej populacji dojrziałych komórek B [35]. Obserwowany defekt w różnicowaniu się limfocytów B był identyczny jak w przypadku myszy z unieczynnionym genem *Notch2* [31] oraz *Rbp-j* [33]. W śledzeniu ekspresja liganda Delta1 dotyczy głównie limfocytów B oraz komórek dendrytycznych. Uważa się, że za pobudzenie receptora Notch2 na prekursorach limfocytów B strefy brzeżnej odpowiadają oddziaływania z ligandem Delta1 obecnym na komórkach dendrytycznych śledziona [35].

## PODSUMOWANIE

Receptory Notch stanowią bardzo ważne narzędzie kontroli różnicowania komórkowego na wielu etapach rozwoju limfocytów. Znaczna część wiedzy, jaką na ten temat obecnie dysponujemy pochodzi z badań na zwierzętach transgenicznym zawierających geny zmienione w sposób warunkowy, dzięki którym pokonano barierę śmiertelności embrionów niosących unieczynnione geny białek Notch, ich ligandów oraz czynników zaangażowanych w dalszy przekaz informacji do wnętrza komórki. Udział receptora Notch1 w ukierunkowaniu wspólnej komórki prekursorowej limfocytów do linii komórek T był pierwszą udokumentowaną w ten sposób fizjologiczną funkcją białka Notch w rozwoju limfocytów. Inaktywacja genów *Rbp-j*, *Notch2* oraz *Delta1* potwierdziła wcześniejsze wnioski co do zaangażowania białka Notch1 w powstawanie limfocytów T i jednocześnie wniosła nową informację o kluczowym udziale receptora Notch2 i liganda Delta1 w rozwoju limfocytów B strefy brzeżnej śledziona. Należy zaznaczyć, iż zakres regulowanych przez receptory Notch etapów rozwoju limfocytów znacznie wykracza poza zakres przedstawiony w niniejszej pracy. Jednocześnie nasza wiedza wciąż jest niekompletna i wymaga uzupełnień, szczególnie w kwestiach dotyczących fizjologicznych funkcji różnych ligandów białek Notch, udziału regulatorów przekazu sygnału, a także zależności pomiędzy związanym z aktywacją receptora Notch szlakiem przekazu sygnału a innymi szlakami przekazu informacji w komórce. Wyjaśnienie tych problemów niesie szczególną wartość poznawczą, zwłaszcza w obliczu rosnącej ilości dowodów wskazujących, iż wadliwe działanie receptorów Notch stanowić może przyczynę rozwoju białaczek u człowieka.

## PIŚMIENNICTWO

1. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake JR (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770-776
2. Atravanis-Tsakonas S (1995) Notch signaling. *Science* 268: 225-232
3. Radtke F, Wilson A, Mancini SJC, MacDonald HR (2004) Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5: 247-253
4. Swiatek PJ, Lindsell CE, del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T (1994) Notch 1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev* 8: 707-719
5. Hamada Y, Kadokawa Y, Okabe M, Ikawa M, Coleman JR, Tsujimoto Y (1999) Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development* 126: 3415-3424
6. Robey E, Chng D, Itano K, Cado D, Alexander H, Lans D, Weinmaster G, Salmon P (1996) An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell* 87: 483-492



7. Washburn T, Schweighoffer E, Gridley T, Chang D, Fowlkes BJ, Cado D, Robey E (1997) Notch activity influences the  $\alpha\beta$  versus  $\gamma\delta$  T cell lineage decision. *Cell* 83: 411-422
8. Sauer B, Henderson N (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5166-5170
9. MacDonald HR, Wilson A, Radtke F (2001) Notch1 and T cell development: insights from conditional knockout mice. *TRENDS in Immunology* 22: 155-160
10. Blobel CP, Schlondorff J (1999) Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Science* 112: 3603-3617
11. Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meervijk J, MacDonald HR, Aguet M (1999) Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch 1. *Immunity* 10: 547-558
12. Davis RL, Turner DL (2001) Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20: 8342-8357
13. Rangarajan A (2001) Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J* 20: 3427-3436
14. Krebs LT, Deftos ML, Bevan MJ, Gridley T (2001) The Nrarp gene encodes an ankyrin-repeat protein THAT is transcriptionally regulated by the notch signaling pathway. *Dev Biol* 238: 110-119
15. Deftos LM, Huang E, Ojala EW, Forbush KA, Bevan MJ (2000) Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP lymphocytes. *Immunity* 13: 73-84
16. Reizis B, Leder P (2002) Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian notch signaling pathway. *Genes Dev* 16: 295-300
17. Okajima T, Xu A, Irvine KD (2002) Regulation of notch signaling by O-linked fucose. *J Biol Chem* 278: 42340-42345
18. Haltiwanger RS, Stanley P (2002) Modulation of receptor signaling by glycosylation: fringe is an O-fucose- $\beta$ 1,3-N-acetylglucosaminyl-transferase. *Biochem Biophys Acta* 1537: 328-335
19. Matsuno K, Diederich RJ, Go M J, Blaumueller C M, Atravanis-Tsakonas S (1995) Deltex acts as a positive regulator of Notch signalling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* 121: 2633-2644
20. Frise E, Knoblich JA, Younger-Shepherd S, Jan LY, Jan YN (1996) The *Drosophila* Numb protein inhibits signaling of the Notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11925-11932
21. Yun TJ, Bevan MJ (2003) Notch-regulated ankyrin-repeat protein inhibits Notch1 signaling: multiple Notch1 signaling pathways involved in T cell development. *J Immunol* 170: 5834-5841
22. Kuroda K, Han H, Tani S, Tanigaki K, Tun T, Furukawa T, Taniguchi Y, Kurooka H, Hamada Y, Toyokuni S (2003) Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity* 18: 301-312
23. Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UAK, Muller W, Roes J, Schwenk F (1996) Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98: 600-603
24. Sternberg N, Hamilton D (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150: 467-486
25. Orban PC, Chui D, Marth DJ (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6861-6865
26. Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Lee E J, Manning R W, Yu S H, Mulder K L, Westphal H (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6232-6236
27. Rajewsky K, Rickert R C, Roes J (1997) B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Research* 25: 1317-1318
28. Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science* 269: 1427-1429
29. Pui JC, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell F G, Bakkour S, Lee JY, Kadesch T, Hardy RR, Aster JC (1999) Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11: 229-308
30. Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J (1991) TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66: 649-661
31. Saito T, Chiba S, Ichikawa M, Kunisato A, Asai T, Schimizu K, Yamaguchi T, Yamamoto T, Seo S, Kumano K (2003) Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18: 675-785
32. Souabni A, Cobaleda C, Schebesta M, Busslinger M (2002) Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity* 17: 781-793
33. Han H, Tanigaki K, Yamamoto N, Kuroda K, Yoshimoto M, Nakahata T, Ikuta K, Honio T (2002) Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol* 14: 637-645
34. Kawamata S, Du C, Li K, Lavau C (2002) Overexpression of Notch target genes Hes in vivo induces lymphoid and myeloid alterations. *Oncogene* 21: 3955-3863
35. Hozumi K, Negishi N, Suzuki D, Abe N, Sotomaru Y, Tamaoki N, Mailhos C, Ish-Horowicz D, Habu S, Owen M J (2004) Delta-like 1 is necessary for generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat Immunol* 5: 638-644

## Role of Cre-loxP-mediated conditional gene targeting in understanding the function of Notch receptors

Katarzyna Sitnik<sup>1</sup>, Joanna Cichy<sup>2</sup>✉

<sup>1</sup>Faculty of Biotechnology, student of biotechnology at Jagiellonian University

<sup>2</sup>Department of Immunology, Faculty of Biotechnology, Jagiellonian University, 7 Gronostajowa St., 30-387 Kraków, Poland

✉ e-mail: CICHY@mol.uj.edu.pl

**Key words:** Notch, cre-loxP conditional gene targeting

### ABSTRACT

The Notch family of cell surface receptors and their ligands constitute an evolutionarily conserved signaling pathway that is used by invertebrates and vertebrates to regulate a broad spectrum of cell specification events through local cell interactions. After ligand binding Notch receptor undergoes proteolytic processing ultimately liberating the cytoplasmic domain of the Notch receptor which translocates to the nucleus and activates target genes. In all animal models tested, mutations in *Notch* genes invariably resulted in developmental abnormalities. In mammals, Notch signaling controls key stages of lymphocyte differentiation as well as activation and several abnormalities in Notch pathway have been suggested to cause human leukemias. Cre-loxP mediated conditional gene targeting significantly contributed to our current understanding of the physiological roles of different Notch family members in hematopoietic compartment. This technique helped to overcome embryonic lethality of Notch mutants providing the opportunity to inactivate specific *Notch* gene in adulthood.



# Rola czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B w przewlekłych wirusowych zapaleniach wątroby typu B i C

Iwona Mozer-Lisewska<sup>1</sup>

Mariusz Kaczmarek<sup>2</sup>

Jan Żeromski<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej III Katedry Pediatrii Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego, Poznań

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego, Poznań

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej Akademii Medycznej, ul. Rokietnicka 5D, 60-806 Poznań; e-mail: jzeromski@amp.edu.pl, tel. (061) 854-7172, faks: (061) 854-7173

Artykuł otrzymano 24 sierpnia 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 2 listopada 2005 r.

**Słowa kluczowe:** czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B, wirusowe zapalenia wątroby, białka wirusowe

**Wykaz skrótów:** AP1 (ang. *activating factor 1*) – czynnik aktywujący 1; ER (ang. *endoplasmic reticulum*) – siateczka śródplazmatyczna; FADD – białko adaptorowe zawierające domenę śmierci związaną z białkiem Fas; HBV- wirus zapalenia wątroby typu B; HCV – wirus zapalenia wątroby typu C; IFN – interferon; IKK (ang. *I kappa kinase*) – kinaza I $\kappa$ B; IL – interleukina; iNOS- indukowalna syntaza tlenku azotu; JAK – kinaza Janus; MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*) – kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny; NFAT (ang. *nuclear factor of activated T cells*) – czynnik jądrowy aktywowanych limfocytów T; NF- $\kappa$ B (ang. *nuclear factor  $\kappa$ B*) – czynnik jądrowy  $\kappa$ B; NS – białko niestrukturalne; RHD (ang. *Rel homology domain*) – domena homologii z Rel; ROS – reaktywne formy tlenu; STAT (ang. *signal transducer and activator of transcription*) – przenośnik sygnału i aktywator transkrypcji; TFII – czynnik transkrypcyjny polimerazy II; TIC – kompleks inicjacji transkrypcji; TNF (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworów; TRAF2 (ang. *TNF receptor activating factor*) – czynnik aktywujący receptor TNF

Podziękowanie: Realizacja pracy była możliwa dzięki uzyskaniu grantu nr 2PO5A 06927 (przez I.M.-L.) z Ministerstwa Nauki i Informatyzacji

## STRESZCZENIE

Przedstawiono podstawowe dane dotyczące struktury i funkcji NF- $\kappa$ B, oraz skrótoowo innych wybranych czynników transkrypcyjnych (NFAT, AP1, STAT), istotnych dla prawidłowego przebiegu wielu zjawisk związanych z odpornością organizmu. W przewlekłym zapaleniu wątroby typu C aktywacja NF- $\kappa$ B jest w znacznym stopniu modulowana przez białka wirusa, takie jak białko rdzeniowe i niestrukturalne, a w szczególności NS5A i NS3. W zapaleniu typu B głównym czynnikiem wpływającym na funkcję NF- $\kappa$ B jest białko HBx. Skutki działania białek wirusowych na NF- $\kappa$ B w przebiegu zapalenia wątroby są złożone. Wpływają na utrzymywanie się stanu zapalnego w wątrobie, hamują apoptozę hepatocytów, a także różnicowanie komórek prezentujących antygen (szczególnie komórek dendrytycznych), co jest niekorzystne dla powstawania swoistej odpowiedzi immunologicznej przeciwko peptydom wirusowym. Wydaje się, że zarówno wirusy typu C jak i B posiadły zdolność sterowania funkcją NF- $\kappa$ B w sposób korzystny dla patogenu.

## WPROWADZENIE

Czynniki transkrypcyjne stanowią dużą grupę białek syntetyzowanych w cytoplazmie a działających w jądrze komórkowym. Mają one zdolność wiązania się z sekwencjami promotorowymi genów i w ten sposób mogą warunkować inicjację i przebieg transkrypcji. Ich zadaniem jest ukierunkowanie polimerazy RNA do miejsca startu transkrypcji. Tworzy się tzw. kompleks inicjacji transkrypcji (ang. *transcription initiation complex-TIC*) obejmujący polimerazę RNA II oraz grupę czynników transkrypcyjnych określaną jako TFII (ang. *transcription factor*). TIC wiąże się z DNA w okolicy promotora najczęściej w obrębie sekwencji zwanej kasetą TATA. Kasetta ta, zawierająca około 25 nukleotydów warunkuje właściwą inicjację transkrypcji przez polimerazę RNA. Na zwiększenie stabilności oraz selektywności wiązania TIC z DNA, a także na ogólny wzrost wydajności transkrypcji wpływają dodatkowe czynniki transkrypcyjne jak NF- $\kappa$ B, wykazujące zdolność wiązania się do innych miejsc matrycy, lecz nieobecne w podstawowym składzie kompleksu inicjacji transkrypcji [1]. Czynniki NF- $\kappa$ B, STAT, NFAT oraz AP-1 są szczególnie ważne dla regulacji wielu procesów zachodzących w komórkach układu odpornościowego. NF- $\kappa$ B będzie szerzej omówiony w dalszej części, natomiast poniżej zostaną krótko omówione pozostałe czynniki.

NFAT (ang. *nuclear factor of activated T cells*) należy do rodziny czynników warunkujących transkrypcję genów w różnych komórkach między innymi mio-cytach czy neuronach, jednak po raz pierwszy został opisany w limfocytach T ulegających aktywacji. Uczestniczy w aktywacji głównie genów kodujących cytokiny jak IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  i inne. W formie fosforylowanej pozostaje nieczynny w cytoplazmie. Aktywacja NFAT jest spowodowana defosforylacją przez fosfatę serynową – kalcyneurynę, aktywowaną przez kompleks Ca<sup>2+</sup>/kalmodulina. NFAT współdziała z czynnikiem AP-1. Oba czynniki są pośrednio aktywowane przez czynnik martwicy nowotworów (TNF), a także przez wiele innych makromolekuł [2].

AP-1 jest heterodimerem kodowanym przez protoonkogeny *jun* i *fos*. Ulega aktywacji przez izoformę kinazy białkowej C (PKC $\theta$ ) obecną w różnych komórkach układu krwiotwórczego a zwłaszcza w limfocytach T. Współdziała zarówno z czynnikami rodziny NFAT jak i NF- $\kappa$ B [3]. Natomiast system JAK/STAT jest jednym z głównych szlaków przekazywania sygnałów do wnętrza komórki powstałych w wyniku aktywacji receptorów cytokinowych. Kinazy Janus fosforylują białka STAT (ang. *signal transducer and activator of transcription*), które następnie wnikają do jądra komórkowego, inicjując transkrypcję odpowiedniego genu docelowego, np. cytokin. Znanych jest około 8 białek z rodziny STAT, z których część występuje w postaci izoform jak np. STAT-5A i STAT-5B [4]. Czas indukcji ekspresji genów przez wyżej wymienione czynniki transkrypcyj-



ne jest krótki i wynosi od 15 do 30 minut, natomiast sama ekspresja aktywowanych genów jest ograniczona czasowo i w przypadku STAT wiązanie z DNA jądra znika w ciągu kilku godzin [5].

## CZYNNIK NF- $\kappa$ B - BUDOWA I FUNKCJA

Ogólna charakterystyka tego czynnika, jak również jego znaczenie w procesach zapalnych i nowotworach były już kilkakrotnie opisywane w polskim piśmiennictwie naukowym [6,7,8]. Dlatego przedstawiamy tutaj jedynie podstawowe dane odsyłając czytelnika do podanej literatury.

Białka należące do rodziny czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B można podzielić na dwie grupy. Pierwsza obejmuje trzy podjednostki - RelA (p65), RelB i c-Rel syntetyzowane w formie dojrzałej. Ich N-końcowy fragment, tzw. rejon homologii z białkami RHD (ang. *Rel homology domain*), mający około 300 aminokwasów, warunkuje połączenie z białkiem inhibitorowym I $\kappa$ B, dimeryzację, wnikanie do jądra komórkowego, wiązanie z DNA i aktywację transkrypcji. Natomiast do drugiej grupy należą białka NF- $\kappa$ B1 (p105) i NF- $\kappa$ B2 (p100). Mają one charakter prekursorowy i wymagają degradacji proteolitycznej zależnej od ubikwitylacji. Prowadzi to do powstania podjednostek p50 (z p105) i p52 (z p100), które nie są zdolne do aktywacji transkrypcji. Powstanie heterodimerów pomiędzy podjednostkami pierwszej i drugiej grupy, takich jak p65/p50 zapewnia zdolność do aktywacji transkrypcji dzięki posiadaniu przez p65 domeny RHD. Powstałe kompleksy NF- $\kappa$ B w komórkach niestymulowanych pozostają nieaktywne w cytoplazmie, gdyż są połączone z jednym z 8 białek inhibitorowych jak np. I $\kappa$ B $\alpha$  czy I $\kappa$ B $\beta$ , z których każde posiada 2 istotne domeny czynnościowe: N-końcową, od której zależy proteoliza I $\kappa$ B i domenę rdzeniową zawierającą tzw. powtórzenia ankiry-nowe umożliwiające interakcje z białkami Rel.

W wyniku stymulacji komórki dochodzi do uruchomienia szlaków sygnalizacji w cytoplazmie prowadzących do aktywacji kompleksu IKK zawierającego 3 podjednostki [IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  i IKK $\gamma$  (NEMO)], której wynikiem jest uczynnienie kinazy IKK zdolnej do fosforylacji białek inhibitorowych I $\kappa$ B. Następstwem fosforylacji jest poliubikwitylacja tych białek i degradacja przez proteasom 26S. Uwalnia to czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B, co umożliwia jego wniknięcie do jądra, wiązanie z DNA i aktywację transkrypcji [9,10]. Istnieje co najmniej 8-10 receptorów /cząsteczek powierzchniowych w błonie komórkowej mających zdolność stymulacji kompleksu IKK a tym samym aktywacji NF- $\kappa$ B. Są to receptory cytokin jak TNF- $\alpha$ , IL-1R, receptory Toll-podobne, integryny CD11/CD18, receptory antygenów limfocytów T (TCR) i B (BCR) i inne [9,10,11,12].

Uwolnione białka NF- $\kappa$ B wnikają do jądra komórkowego przez pory jądrowe wykorzystując specyficzne receptory (importyny) rozpoznające tzw. jądrowe sygnały translokacyjne (NLS - ang. *nuclear localization signal*), będące odpowiednimi sekwencjami aminokwasów [11]. Aktywacja NF- $\kappa$ B jest krótka, trwa kilka do kilkunastu minut, ale zarówno czas trwania jak i jej intensywność zależy w dużej mierze od udziału różnych koaktywatorów. Ich Liczba jest znaczna i nie będą one tutaj bliżej omawiane. Warto tu jedynie wspo-

nić, że niektóre z nich mają charakter acetylaz, tj. enzymów katalizujących reakcję acetylacji. Acetylacja powoduje zmiany oddziaływań elektrostatycznych, przez co osłabia wiązania występujące pomiędzy cząsteczkami jak np. między p65 i białkiem inhibitorowym, a także między DNA a histonami, co ułatwia proces aktywacji szeregu genów docelowych ulegających transkrypcji [13]. Wykazano między innymi, że acetylacja poprzedza transkrypcję genu *I $\kappa$ B $\alpha$* , kodującego białko I $\kappa$ B $\alpha$ . Cząsteczka tego białka transportuje z powrotem do cytoplazmy czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B po jego usunięciu z połączenia z DNA, gdzie będzie oczekiwał na ponowną aktywację. Liczba transkrybowanych genów w wyniku wiązania NF- $\kappa$ B, może wynosić ponad 100, ale zależy ona od rodzaju podjednostek NF- $\kappa$ B, rodzaju komórki, koaktywatorów itp. [12].

Nadmierna aktywacja NF- $\kappa$ B odgrywa istotną rolę w patogenezie wielu przewlekłych chorób zapalnych jak astma, reumatoidalne zapalenie stawów (rzs), wrzodziejące zapalenie jelita grubego choroba Leśniowskiego-Crohna i inne [14,15,16]. W astmie manifestuje się to naciekami zapalnymi w płucach i dysregulacją szeregu cytokin i chemokin [17]. W reumatoidalnym zapaleniu stawów wzmoczona ekspresja cytokin pozapalnych, związana z NF- $\kappa$ B, wpływa na rozrost błony maziowej i powstanie przewlekłego stanu zapalnego zajętego stawu [18].

Oprócz negatywnej roli w procesach zapalnych NF- $\kappa$ B ma również prawdopodobnie ważne znaczenie w modulacji genów kontrolujących rozwój i wzrost komórek zarówno normalnych jak i nowotworowych. W odniesieniu do wątroby wykazano, że modyfikowane genetycznie myszy, pozbawione ekspresji genów kodujących poszczególne podjednostki NF- $\kappa$ B wykazywały upośledzenie rozwoju tego narządu ze skutkiem letalnym. Niewydolna aktywacja NF- $\kappa$ B i związana z tym śmiertelność badanych myszy w okresie zarodkowym z wykładnikami zwyrodnienia wątroby spowodowana była niedoborem IKK $\beta$  [19]. Niedobór NF- $\kappa$ B powoduje także upośledzenie regeneracji wątroby [20]. Czynnikiem indukującym regenerację po częściowej hepatektomii wydaje się być TNF, który aktywuje zarówno AP-1 jak i NF- $\kappa$ B [21]. W raku wątrobowo-komórkowym dochodzi wcześniej do aktywacji NF- $\kappa$ B, a także innych czynników transkrypcyjnych jak AP-1 i STAT, co prawdopodobnie wiąże się z nabyciem fenotypu komórki transformowanej [22].

## CZYNNIK NF- $\kappa$ B W ZAPALENIACH WĄTROBY TYPU C

W oddziaływaniach wirus - komórka gospodarza kluczową rolę odgrywają białka wirusa C (HCV). Do najważniejszych należą tu białko rdzeniowe (ang. *core protein*) i białka niestrukturalne NS5A i NS3. Białko rdzeniowe będące nukleokapsydem wirusa, ma zdolność wpływania na różne zjawiska wewnątrzkomórkowe, ale do szczególnie istotnych należy stymulacja NF- $\kappa$ B. Sposób aktywacji NF- $\kappa$ B przez białko rdzeniowe HCV nie jest do końca jasny. Jedną z możliwości jest działanie na IKK $\beta$ . Wykazano bowiem, że kwas acetylosalicylowy będący swoistym inhibitorem IKK $\beta$ , hamuje aktywację NF- $\kappa$ B przez białko rdzeniowe [23]. Z drugiej strony wiadomo, że białko rdzeniowe może wiązać się z receptorami cytokin, takich jak np.



z receptorem limfotoksyny  $\beta$  z rodziny receptorów TNF [24]. Uruchamia to szlak aktywacji typowy dla cytokin. Modulacja aktywacji NF- $\kappa$ B przez białko rdzeniowe może być także częściowo spowodowana przez gromadzenie się w jądrze komórkowym białek p50 lub p65 przez zakażone komórki. Prowadzi to do utrzymywania się przewlekłego stanu aktywacji komórek zakażonych HCV [24]. Aktywacja czynnika NF- $\kappa$ B przez białko rdzeniowe hamuje apoptozę zakażonych hepatocytów i tym samym zwiększa przeżywalność wirusów [25]. Białko rdzeniowe może jednak także hamować aktywację NF- $\kappa$ B, jak to wykazali Joo i wsp. [26] na ustalonych liniach komórkowych makrofagów. Ponadto białko rdzeniowe może różnić się w działaniu na NF- $\kappa$ B w zależności od genotypu wirusa. Wykazano np., że białko pochodzące od wirusa o genotypie 1a hamuje aktywację NF- $\kappa$ B w przeciwieństwie do białka wirusa o genotypie 1b. Powstałe mutacje w genotypie 1a mogą znosić efekt hamujący tego białka [27].

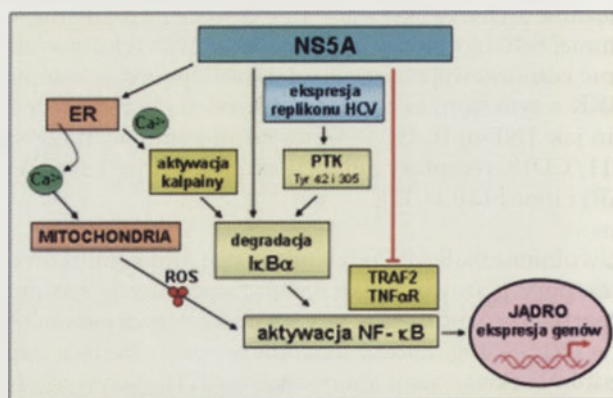
Porównanie zdolności do modulowania wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału przez 7 różnych białek wirusa C i 4 wirusa B wykazało, że białko rdzeniowe wirusa C ma najsilniejszy wpływ na transdukcję sygnału aktywacji czynników transkrypcyjnych, zwłaszcza NF- $\kappa$ B, AP-1 i przewyższało pod tym względem nawet białko X wirusa B [28]. Oprócz typowych genów ulegających aktywacji i transkrypcji pod wpływem NF- $\kappa$ B jak geny kodujące cytokiny, cząsteczki adhezyjne, antygeny MHC i inne, białko rdzeniowe wirusa C powoduje transaktywację promotora genu dla indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS), przez co prawdopodobnie nasila się odczyn zapalny w wątrobie [29].

Białka niestrukturalne wirusa C są drugim znanym czynnikiem indukującym aktywację NF- $\kappa$ B. Ich działanie uważa się za słabsze w porównaniu z białkiem rdzeniowym. Oba białka, tzn. NS3 i NS5A indukują via NF- $\kappa$ B cytokiny, zarówno prozapalne jak i hamujące zapalenie jak np. IL-10. Wykazano, że białko rdzeniowe, a także niestrukturalne NS3 aktywują monocyty i hamują różnicowanie komórek dendrytycznych. Powoduje to zaburzenia prezentacji peptydów wirusowych limfocytom, co hamuje powstawanie swoistej odpowiedzi odpornościowej. Towarzyszy temu wzrost IL-10 i spadek IL-12 wydzielanych przez komórki dendrytyczne [30].

Mechanizm działania białka NS3 nie jest bliżej znany, natomiast stosunkowo więcej wiadomo o białku NS5A. Wykazano między innymi, że na drodze stresu oksydacyjnego może aktywować receptor typu I dla TNF (TNFR1). Stres oksydacyjny w komórce jest w tym wypadku spowodowany zaburzeniem przez NS5A stężenia wewnątrzkomórkowego jonów wapnia. Sygnał  $Ca^{2+}$  indukuje wzrost rodniaków tlenowych w mitochondriach, prowadząc do translokacji NF- $\kappa$ B, a także STAT-3 do jądra komórkowego [31]. W dalszych badaniach wykazano, że białko NS5A może hamować aktywację NF- $\kappa$ B pobudzonego przez TNF- $\alpha$ . Cytokina ta działa na komórki przez receptory TNFR1 i TNFR2. Ten pierwszy, łącząc się z kilkoma białkami jak FADD (ang. *Fas associated death domain*), TRAF2 (ang. *TNF receptor activating factor*) i białkiem reagującym z receptorem (ang. *receptor-interacting protein*) tworzą kompleks sygnałowy TNFR aktywujący czynnik NF- $\kappa$ B. Okazało się, że NS5A hamuje TRAF-2 zno-

sząc w ten sposób aktywację NF- $\kappa$ B [32]. O znaczeniu działania białka NS5A na zakażoną wirusem C komórkę świadczą wyniki badań Girarda i wsp. [33]. Autorzy ci wykazali przy pomocy techniki mikromacierzy DNA, że białko to wpływa na 103 geny powodując pobudzenie 43 i hamowanie 60 genów. Co ciekawe, wszystkie pobudzone geny zawierały w swoich regionach promotorowych miejsca wiązania dla NF- $\kappa$ B. Wykazano także, że NS5A ma zdolność wpływania na szlaki przekazywania sygnału w siateczce śródplazmatycznej. NS5A wiąże się z siateczką śródplazmatyczną i powoduje odpowiedź zwaną „stresem retikulum”. Prowadzi to do uwalniania jonów  $Ca^{2+}$ , które z kolei są pobierane przez mitochondria. Zmienia to ich potencjał błonowy i wywołuje stres oksydacyjny manifestujący się wzrostem i wydzielaniem reaktywnych form tlenu. Prowadzi to do aktywacji czynników STAT-3 i NF- $\kappa$ B. Ten szlak metaboliczny hamują inhibitory pobierania  $Ca^{2+}$  przez mitochondria, takie jak np. czerwień rutenowa [34], co potwierdza rolę jonów wapnia w tym procesie. Inaktywacja I $\kappa$ B $\alpha$ , warunkująca pobudzenie NF- $\kappa$ B w normalnych stanach fizjologicznych komórki, odbywa się przez fosforylację seryny obecnej w pozycji 32 i 36. W przypadku aktywacji NF- $\kappa$ B przez NS5A fosforylacji ulegają reszty tyrozyny obecne w pozycjach 42 i 305 łańcucha aminokwasowego białka I $\kappa$ B $\alpha$ . Zjawisko to tłumaczy wpływ inhibitorów białkowej kinazy tyrozynowej na aktywację NF- $\kappa$ B [35]. Dane te wskazują na złożony charakter działania białka NS5A wirusa C na NF- $\kappa$ B, obejmując zarówno aktywację jak i inaktywację różnych wewnątrzkomórkowych szlaków mających pośredni jak i bezpośredni wpływ na ten czynnik transkrypcyjny (Rys. 1).

Istnieją również nieliczne dane dotyczące związków między aktywacją NF- $\kappa$ B a włóknieniem wątroby w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu C. Boya i wsp [36] wykazali, że poziom transkrypcji mRNA białka RelA, głównego składnika czynnego NF- $\kappa$ B, jest istotnie obniżony w materiale tkankowym uzyskanym z biopsji wątroby o nasilonym włóknieniu tego narządu w porównaniu z próbkami pochodzącymi z biopsji wątroby o włóknieniu powolnym, a także z wątrobą niezmienną chorobowo. Podobną odwrotną korelację zaobserwowano w odniesieniu do apoptozy komórek wątrobowych. Badacze wyciągnęli z tego wniosku, że normalna lub wzmożona ekspresja białka RelA może chronić wątrobę przed włóknieniem, a więc także



Rysunek 1. Różne szlaki działania białka NS5A wirusa C w zakażonym hepatocycie. Objaśnienia skrótów: ER – siateczka śródplazmatyczna; I $\kappa$ B $\beta$  – inhibitor; PTK – białkowa kinaza tyrozynowa; ROS – reaktywne formy tlenu; TNF $\alpha$ R (ang. *TNF receptor*) – receptor TNF $\alpha$ ; TRAF2 (ang. *TNF receptor activating factor*) – czynnik aktywujący receptor TNF.



przed marskością i degradacją hepatocytów. Ostatnio wykazano u myszy, że białko p50 powodowało ograniczenie fibrogenезy w wątrobie [37].

#### CZYNNIK NF- $\kappa$ B W ZAPALENIACH WĄTROBY TYPU B

Głównym czynnikiem aktywującym NF- $\kappa$ B w zapaleniu wątroby wywołanym przez wirus B (HBV) jest białko HBx. Jest to mały polipeptyd o masie cząsteczkowej 16,5 kDa, składający się z 154 aminokwasów, kodowany przez gen X wirusa B będący jednym z czterech genów jego genomu (C, P, S i X). Ma on działanie regulacyjne w replikacji wirusa i odgrywa ważną rolę w patogenezie zapalenia wątroby, a także w powstawaniu raka wątrobowokomórkowego. HBx reaguje bezpośrednio z I $\kappa$ B $\alpha$  w pozycjach 249-253 łańcucha aminokwasowego dzięki ich reaktywności z tym białkiem. Pozycje te są krytyczne dla interakcji z podjednostkami p50 i p65 czynnika NF- $\kappa$ B i znajdują się w pobliżu sekwencji eksportu jądrowego. Umożliwia to HBx translokację do jądra komórkowego [38,41].

Działanie HBx w odniesieniu do NF- $\kappa$ B jest dwojakie. Z jednej strony czynnik ten indukuje tworzenie aktywnych transkrypcyjnie białek z rodziny Rel, jak p50, p52, RelA i c Rel. Z drugiej strony powoduje fosforylację inhibitora I $\kappa$ B $\alpha$ , a także obniżenie ekspresji mRNA drugiego inhibitora znanego jako p105, a także białka p50. Prowadzi do uwalniania białka RelA, oddzielonego przez inhibitor p105 i jednoczesnej akumulacji jądrowej kompleksów NF- $\kappa$ B-DNA. Oba działania dotyczące inhibitorów prowadzą do aktywacji NF- $\kappa$ B [39]. HBx wiąże się z zewnętrzną błoną mitochondriów, co prowadzi do spadku potencjału elektrostatycznego błon mitochondrialnych i wzrostu reaktywnych form tlenu. Aktywacja czynników transkrypcyjnych jak NF- $\kappa$ B, ale także STAT-3 wydaje się być skutkiem działania reaktywnych form tlenu. Przemawia za tym hamowanie tej aktywacji przez antyoksydanty jak N-acetylo-L-cysteina [40,41]. Ze względu na fakt, że reaktywne formy tlenu mogą nasilać replikację wirusów [41] wydaje się interesujące, czy podanie antyoksydantów nie miałoby korzystnego wpływu na przebieg zapalenia wątroby, zarówno typu B, jak i C, biorąc pod uwagę nie tylko wpływ antyreplicacyjny, ale także ograniczenie uszkodzenia tkanek zależnego od reaktywnych form tlenu i hamowanie aktywacji NF- $\kappa$ B.

Interesujące są oddziaływania pomiędzy białkiem HBx i NF- $\kappa$ B w odniesieniu do apoptozy komórek wątrobowych. HBx indukuje białka z rodziny protoonkogenów Myc, które mogą zwiększać wrażliwość zainfekowanej komórki na zabijanie przez TNF- $\alpha$ . Z drugiej strony, Rel A/NF- $\kappa$ B indukowany przez HBx powoduje supresję apoptozy zależnej od HBx. Natomiast inny kompleks C-Rel/NF- $\kappa$ B indukowany przez HBx może zarówno sprzyjać jak i hamować apoptotyczną śmierć komórek. W ogólnym rachunku białka z rodziny NF- $\kappa$ B raczej hamują apoptozę, pomimo faktu, że nadekspresja Myc ją nasila. Rola białka HBx jest więc tu dwuznaczna [42].

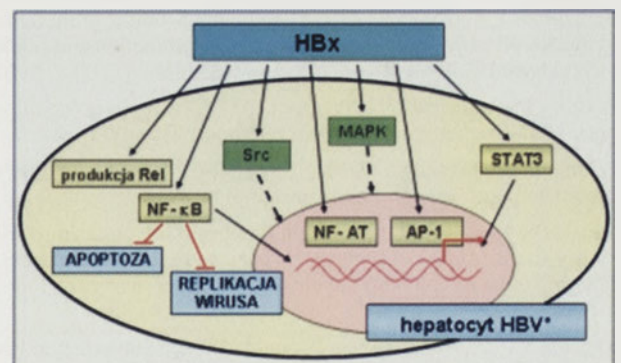
W odniesieniu do terapii zapalenia wątroby typu B, istnieją dane doświadczalne uzyskane na komórkach hepatoma HuH-7 człowieka, wskazujące na hamujące działanie interferonu- $\alpha$  na aktywację NF- $\kappa$ B indukowaną przez białko

HBx [43]. Ponadto aktywność NF- $\kappa$ B ulega supresji przez oddziaływanie z białkiem p202a indukowanym przez interferon- $\alpha$  w komórkach wątrobowych [44]. Powyższe dane wskazują na dodatkowe korzystne efekty działania tej cytokiny w omawianej chorobie.

Niejasna jest rola NF- $\kappa$ B w karcinogenezie związanej z białkiem HBx w następstwie zapalenia wątroby typu B. Wykazano jednak, że NF- $\kappa$ B występuje zarówno w cytoplazmie jak i w jądrach komórek raka wątrobowokomórkowego, czemu towarzyszy obecność białka HBx [45]. Wynika z tego, że czynnik NF- $\kappa$ B ulega nieprawidłowej aktywacji w komórkach raka, spowodowanej obecnością białka x. Manifestuje się to translokacją NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego, przez co może chronić komórki rakowe przed apoptozą. Złożone działanie białka HBx zachodzące na drodze aktywacji różnych szlaków transdukcji sygnału w zakażonej komórce wątroby ilustruje schematycznie rysunek 2. Wynika z niego, że białko HBx w zakażonym hepatocycie może aktywować w sposób bezpośredni nie tylko NF- $\kappa$ B ale także inne czynniki transkrypcyjne jak STAT3, NFAT i AP1 oraz w sposób pośredni Src i MAPK. Potwierdzają to dane z piśmiennictwa [41]. Lokalizacja cytoplazmatyczna białka HBx w hepatocytach ma związki z ekspresją genu indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS), podobnie jak to ma miejsce w zapaleniu typu C. Majano i wsp. [46] wykazali, że inaktywacja czynnościowa miejsca wiązania NF- $\kappa$ B z promotorem iNOS znacznie redukuje zależną od HBx aktywność transkrypcji tego genu.

Oprócz HBx, także białko rdzeniowe wirusa B (HBc) wydaje się działać jako aktywator transkrypcji promotora progenomowego wirusa. Okazało się, że białko HBc uzyskuje zdolność do tego działania poprzez domenę zawartą pomiędzy nukleotydami w pozycjach 1408 a 1417 łańcucha aminokwasowego, która umożliwiła wiązanie się z NF- $\kappa$ B. Związane z NF- $\kappa$ B białko HBc przyspieszało połączenie NF- $\kappa$ B z DNA zainfekowanej komórki [47]. Według cytowanych autorów jest to mechanizm, który może nasilać replikację wirusa w zakażonych hepatocytach.

Czynnikiem hamującym replikację wirusa B w ustroju bez efektu cytopatycznego jest TNF- $\alpha$ . Działanie to wymaga aktywacji NF- $\kappa$ B poprzez kompleks IKK $\alpha$ / $\beta$ , co prowadzi do uszkodzenia kapsydów wirusowych. Zahamowanie replikacji wirusa B można było także uzyskać bez udziału TNF- $\alpha$ , wyłącznie przez nadekspresję IKK $\alpha$ / $\beta$  i związaną z tym silną aktywację NF- $\kappa$ B. Natomiast hamowanie NF- $\kappa$ B



Rysunek 2. Rola i możliwości wpływu białka HBx na komórkę wątroby.



stymulowało replikację wirusa. Efekt ten wykazano na modelach zwierzęcych i jak dotąd nie wykazano podobnego mechanizmu w patologii człowieka [48].

Przedstawione dane wskazują, że aktywacja czynnika NF- $\kappa$ B odgrywa istotną rolę w patogenezie przewlekłych zapaleń wątroby zarówno typu C jak i B. Okazuje się, że białka obu wirusów mogą w znaczny sposób wpływać na jego funkcję, zwykle w sposób niekorzystny dla chorego. Można tu choćby wymienić działanie anty-apoptotyczne na komórki wątrobowe, które może sprzyjać onkogenezie.

## PIŚMIENNICTWO

1. Winter PC, Hickey GI, Fletcher HL (2004) *Genetyka*, PWN, Warszawa, str. 65-71
2. Macian F (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature Rev Immunol* 5: 472-484
3. Kozar K, Zagożdżon R (2002) Aktywacja limfocytów, W: Gołąb J, Jakóbsiak M, Lasek W (red) *Immunologia*, PWN, Warszawa, str. 175-197.
4. Liu KD, Gaffen SL, Goldsmith MA (1998) JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr Opin Immunol* 10: 271-278.
5. Gaffen SL, Lai SY, Xu W, Gouilloux F, Groner B, Goldsmith MA, Greene WC (1995) Signaling through the IL-2R $\beta$  chain activates a STAT-5 like DNA activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7192-7196
6. Deptała A, Nurzyńska Darzynkiewicz Z, Jędrzejczak WW (2002) Rola białek z rodziny Rel/NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B w patogenezie nowotworów. *Post Biol Kom* 29: 487-502
7. Żeromski J (2002) The role of NF-kappa B transcription factor in inflammatory processes. *Central Eur J Immunol* 27: 176-180
8. Ghosh S, May M, Kopp E (1998) NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of the immune response. *Annu Rev Immunol* 16: 225-260
9. Baldwin AS Jr (1996) The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: New discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14: 649-681
10. Doszczak MM, Kaszubowska L, Pierzchalski A, Bigda J (2002) Mechanizm aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B przez czynnik martwicy nowotworu (TNF). *Post Biochem* 48: 54-65
11. Gruber BM (2004) Czynniki transkrypcyjne NF $\kappa$ B – nowa perspektywa w leczeniu nowotworów. *Post Biochem* 50: 118-130
12. Czyż M (2005) Specyficzność i selektywność działania czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B. *Post Biochem* 51: 60-68
13. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996) The transcriptional co-activators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87: 953-959
14. Tak PP, Firestein GS (2000) NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107: 7-11
15. Makarov SS (2000) NF- $\kappa$ B as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. *Mol Med Today*, 6: 441-448
16. Yamamoto Y, Gaynor RB (2001) Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 107: 135-142
17. Bochner BS, Udem BJ, Lichtenstein LM (1994) Immunological aspects of allergic asthma. *Annu Rev Immunol* 12: 295-335
18. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 14: 397-440
19. Tanaka M, Fuentes ME, Yamaguchi K, Durnin MH, Dalrymple SA, Hardy KL, Goeddel DV (1999) Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF- $\kappa$ B activation in IKK- $\beta$ -deficient mice. *Immunity* 10: 421-429
20. Yamada Y, Kirilova I, Peschon JJ, Fausto N (1997) Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1441-1446
21. Fausto N, Laird AD, Webber EM (1995) Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J* 9: 1527-1536
22. Liu P, Kimmoun E, Legrand A, Sauvanet A, Degott C, Lardeux B, Bernuau D (2002) Activation of NF-kappa B, AP-1 and STAT transcription factors is a frequent and early event in human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 37: 63-71
23. Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, Otsuka M, Maeda S, Kato J, Omata M (2001) Hepatitis C virus core protein activates nuclear factor kappa B-dependent signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factor. *J Biol Chem* 276: 16399-16405
24. You LR, Chen CM, Lee YH (1999) Hepatitis C virus core protein enhances NF-kappaB signal pathway triggering by lymphotoxin-beta receptor ligand and tumor necrosis factor alpha. *J Virol* 73: 1672-1681
25. Tai D-I, Tsai S-L, Chen Y-M, Chuang Y-L, Peng Ch-Y, Sheen I-S, Yeh Ch-T, Chang KSS, Huang S-N, Kuo GC Liaw Y-F (2000) Activation of nuclear factor  $\kappa$ B in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 31: 656-664
26. Joo M, Hahn YS, Kwon M, Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW (2005) Hepatitis C virus core protein suppresses NF-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression by direct interaction with I kappaB kinase beta. *J Virol* 79: 7648-7657
27. Ray RB, Steele R, Basu A, Meyer K, Majumder M, Ghosh AK, Ray R (2002) Distinct functional role of hepatitis C virus core protein on NF-kappaB regulation is linked to genomic variation. *Virus Res* 87: 21-29
28. Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, L K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M (2000) Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 32: 405-412
29. De Lucas S, Bartolome J, Amaro MJ, Carreno V (2003) Hepatitis C virus core protein transactivates the inducible nitric oxide synthase promoter via NF-kappaB activation. *Antiviral Res* 60: 117-124
30. Dolganiuc A, Kodys K, Kopasz A, Marshall C, Do T, Romics L Jr, Mandrekar P, Zapp M, Szabo G (2003) Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J Immunol* 170: 5615-5624
31. Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A (2001) Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9599-9604
32. Park K-J, Choi S-H, Lee SY, Hwang SB, Lai MMC (2002) Nonstructural 5A protein of hepatitis C virus modulates tumor necrosis factor  $\alpha$ -stimulated nuclear factor  $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 277: 13122-13128
33. Girard S, Vossman E, Misesk DE, Podevin P, Hanash S, Brechot C, Beretta L (2004) Hepatitis C virus NS5A-regulated gene expression and signal revealed via microarray and comparative promoter analyses. *Hepatology* 40: 708-718
34. Waris G, Tardiff KD, Siddiqui A (2002) Endoplasmic reticulum (ER) stress: hepatitis C virus induces an ER-nucleus signal transduction pathway and activates NF- $\kappa$ B and STAT-3. *Biochem Pharmacol* 64: 1425-1430
35. Waris G, Livolsi A, Imbert V, Peyron JF, Siddiqui A (2003) Hepatitis C virus NS5A and subgenomic replicon activate NF-kappaB via tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  and its degradation by calpain protease. *J Biol Chem* 278: 40778-40787
36. Boya P, Larrea E, Sola I, Majano PL, Jimenez C, Civeira MP, Prieto D (2001) Nuclear factor-kappa B in the liver of patients with chronic hepatitis C: decreased RelA expression is associated with enhanced fibrosis progression *Hepatology*. 34: 1041-1048



37. Oakley F, Mann J, Nailard S, Smart DE, Mungalsingh N, Constantinou C, Ali S, Wilson SJ, Millward-Sadler H, Iredale JP, Mann DA (2005) Nuclear factor-kappaB1 (p50) limits the inflammatory and fibrogenic responses to chronic injury. *Am J Pathol* 166: 695-708
38. Weil R, Sirma H, Giannini C, Kremsdorf D, Bessia Ch, Dargemont C, Brechot Ch, Israel A (1999) Direct association and nuclear import of the hepatitis B virus X protein with NF- $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ . *Mol Cell Biol* 19: 6345-6354
39. Su F, Schneider RJ (1996) Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF-kappaB by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of *rel*-related proteins. *J Virol* 70: 4558-4566
40. Waris G, Huh KW, Siddiqui A (2001) Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF-kappa B via oxidative stress. *Mol Cell Biol* 21: 7721-7730
41. Waris G, Siddiqui A (2003) Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *J Biosci* 28: 311-321
42. Su F, Theodosios CN, Schneider RJ (2001) Role of NF-kappaB and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol* 75: 215-225
43. Ohata K, Ichikawa T, Nakao K, Shigeno M, Nishimura D, Ishikawa H, Hamasaki K, Eguchi K (2003) Interferon alpha inhibits the nuclear factor kappa B activation triggered by X gene product of hepatitis B virus in human hepatoma cells. *FEBS Lett* 553: 304-308
44. Ma X-Y, Wang H, Ding B, Zhong H, Gosh S, Lengyel P (2003) The interferon inducible p202a protein modulates NF $\kappa$ B activity by inhibiting the binding to DNA of p50/p65 heterodimers and p65 homodimers while enhancing the binding of p50 homodimers. *J Biol Chem* 278: 23008-23019
45. Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL (2001) Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 7: 340-344
46. Majano P, Lara-Pezzi E, Lopez-Cabrera M, Apolinario A, Moreno-Otero R, Garcia-Monzon C (2001) Hepatitis B virus X protein transactivates inducible nitric oxide synthase gene promoter through the proximal nuclear factor kappaB-binding site: evidence that cytoplasmic location of X protein is essential for gene transactivation. *Hepatology* 34: 1218-1224
47. Kwon JA, Rho HM (2002) Hepatitis B viral core protein activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter through the nuclear factor kappaB binding site. *Biochem Cell Biol* 80: 445-455
48. Biermer M, Puro R, Schneider RJ (2003) Tumor necrosis factor alpha inhibition of hepatitis B virus replication involves disruption of capsid integrity through activation of NF-kappaB. *J Virol* 77: 4033-4042

## The role of NF- $\kappa$ B transcription factor in chronic viral hepatitis C and B

Iwona Mozer-Lisewska<sup>1</sup>, Mariusz Kaczmarek<sup>2</sup>, Jan Żeromski<sup>2,✉</sup>

<sup>1</sup>Dept Infectious Diseases and Child Neurology of Chair of Pediatrics, Karol Marcinkowski University of Medical Sciences, 27/33 Szpitalna St., 60-572 Poznań, Poland

<sup>2</sup>Chair and Dept Clinical Immunology, Karol Marcinkowski University of Medical Sciences, 5D Rokietnicka St., 60-806 Poznań, Poland

✉e-mail: jzeromski@amp.edu.pl

**Key words:** transcription factors, NF- $\kappa$ B, viral hepatitis, viral proteins

### ABSTRACT

Essential data pertaining to the structure and function of selected transcription factors such as NFAT, AP-1 and NF-kappaB in particular, are presented in the relation to viral hepatitis C and B. In chronic hepatitis C the activation of NF-kappaB is markedly modulated by viral proteins such as core protein and nonstructural ones, particularly NS5A and NS3. In hepatitis B the major factor influencing NF-kappaB function appears to be HBx protein. Effects of viral proteins on NF-kappaB function in relation to the course of hepatitis are complex. They participate in the perpetuation of inflammatory state in the liver, inhibit apoptosis of hepatocytes, as well as the differentiation of antigen-presenting cells (dendritic ones). The latter effect has deleterious impact on the formation of specific immune response to viral peptides. It seems that both viruses, C and B acquired the ability to modify NF- $\kappa$ B function in advantage for the pathogens in question.



# Struktura i funkcja regionów niekodujących RNA wirusa zapalenia wątroby typu C

Mariola Dutkiewicz

Agata Świątkowska

Jerzy Ciesiołka

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

Artykuł otrzymano 24 maja 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 1 sierpnia 2005 r.

**Słowa kluczowe:** wirus zapalenia wątroby typu C, HCV, region niekodujący RNA, UTR, region X, IRES

**Wykaz skrótów:** HCV (ang. *hepatitis C virus*) – wirus zapalenia wątroby typu C; IRES (ang. *internal ribosome entry site*) – wewnętrzne miejsce oddziaływania z rybosomem; NMR (ang. *nuclear magnetic resonance*) – magnetyczny rezonans jądrowy; nt – reszty nukleotydowe; RdRp (ang. *RNA-dependent RNA polymerase*) – polimeraza RNA zależna od RNA; SL (ang. *stem-loop motif*) – motyw strukturalny typu spinki; UTR (ang. *untranslated region*) – region niekodujący

**Podziękowanie:** Artykuł powstał w trakcie realizacji projektów badawczych KBN nr 3 P04A 020 24 i nr 2 P04A 051 28

## STRESZCZENIE

Na końcach 5' i 3' genomowego RNA wirusa HCV znajdują się zachowane w ewolucji regiony nie ulegające translacji: 5'UTR i 3'UTR (ang. *5' and 3' untranslated regions*). Charakteryzują się one uporządkowaną strukturą przestrzenną i pełnią kluczowe funkcje w regulacji procesów życiowych wirusa. Region znajdujący się po stronie 5' sekwencji kodującej zawiera element IRES odpowiedzialny za inicjację translacji zachodzącą bez udziału kapu. Fragment sekwencji RNA obecny na końcu 3' genomu wirusa warunkuje proces replikacji i być może bierze również udział w regulacji translacji wirusowych białek. Podczas replikacji wirusa nić genomowa przepisywana jest na nić RNA polarności ujemnej, tzw. nić replikacyjną. Fragment jej sekwencji znajdujący się na końcu 3' odpowiedzialny jest za inicjację syntezy genomowych nici potomnych. W niniejszej pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat struktury i funkcji regionów niekodujących RNA wirusa zapalenia wątroby typu C: 5'UTR i 3'UTR oraz komplementarnych do nich fragmentów wirusowej nici replikacyjnej.

## WPROWADZENIE

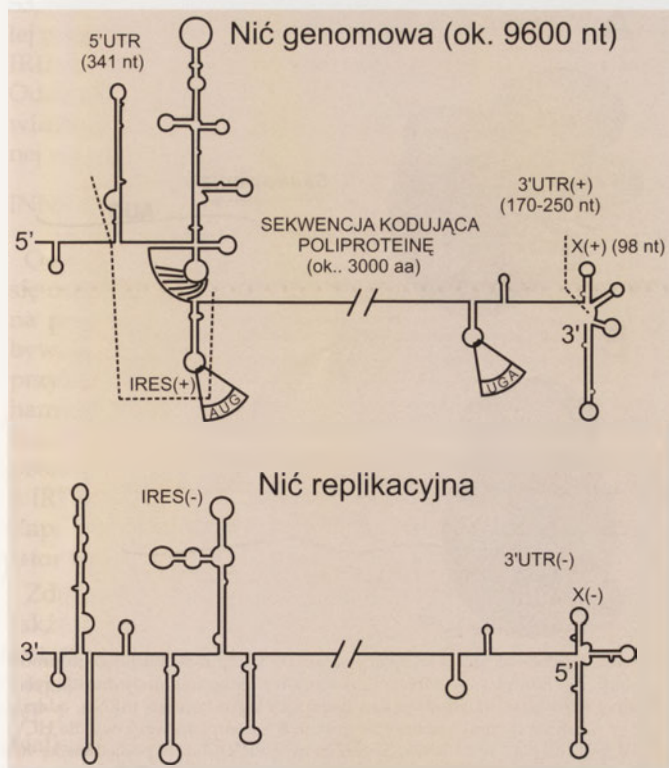
Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV, ang. *hepatitis C virus*) został zidentyfikowany w 1989 roku jako jeden z czynników wywołujących wirusowe zapalenie wątroby, obok takich wirusów jak znane wcześniej: HAV (ang. *hepatitis A virus*) i HBV (ang. *hepatitis B virus*) [1]. Obecnie szacuje się, że zakażonych jest nim ponad 170 milionów osób na świecie, co stanowi 3% światowej populacji. Zakażenie przebiega zazwyczaj bez wyraźnych objawów, a wywołany stan zapalny wątroby przechodzi najczęściej w postać chroniczną i trwa przez wiele lat, doprowadzając do marskości wątroby, jej skrajnej niewydolności, a nawet do rozwoju pierwotnego raka wątroby [2]. Choć wirus ulega replikacji głównie w hepatocytach, to zachodzi ona również w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz w mikrogleju centralnego układu nerwowego [3-5]. U osób ze współbieżną infekcją wirusem HIV (wirus upośledzenia odporności człowieka) i chorych na AIDS (zespół nabytego niedoboru odporności), obserwowano replikację HCV także w innych tkankach [5].

HCV jest małym, oplaszczonym wirusem o średnicy 40-60 nm, którego genom stanowi pojedyncza nić RNA polarności dodatniej, długości około 9600 zasad (Rys. 1) [4,6,7]. W procesie replikacji wirusa nić ta przepisywana jest na nić RNA polarności ujemnej, tzw. nić replikacyjną, która jest matrycą w reakcji syntezy genomowych nici potomnych. HCV należy do rodziny *Flaviviridae*, jako przedstawiciel rodzaju hepaciwirusów. Tak jak pozostali członkowie rodziny, genom HCV posiada jedną bardzo długą, ramkę odczytu. Koduje ona prekursorową poliproteinę, która następnie jest cięta w szeregu procesów na 10 bardziej lub mniej samodzielnych białek: C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A oraz NS5B [7,8]. Sekwencja kodująca genomu HCV oflankowana jest regionami nie ulegającymi translacji: 5'UTR i 3'UTR (ang. *5' and 3' untranslated regions*).

Fragmenty niekodujące sekwencji wirusów RNA pełnią kluczowe funkcje w regulacji ich procesów życiowych [9]. Oskrzydlają one regiony kodujące białka i decydują o ich ekspresji. Fragmenty RNA znajdujące się po stronie 5' sekwencji kodujących odpowiedzialne są najczęściej za kontrolę translacji. Regiony obecne na końcu 3' warunkują zazwyczaj procesy replikacji i/lub transkrypcji, nierzadko biorą również udział w regulacji translacji wirusowych białek. Ponadto, sterowanie takimi procesami, jak np. składanie wirionów i przechodzenie pomiędzy różnymi fazami rozwojowymi może odbywać się z udziałem niekodujących regionów RNA.

W niniejszej pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat struktury i funkcji regionów niekodujących wirusa zapalenia wątroby typu C: 5'UTR i 3'UTR oraz komplementarnych do nich fragmentów wirusowej nici replikacyjnej.





**Rysunek 1.** Schematyczne przedstawienie nici genomowej wirusa HCV oraz komplementarnej do niej nici replikacyjnej. Na rysunku uwzględniono ogólny zarys struktur drugorzędowych regionów niekodujących: 5'UTR i 3'UTR oraz komplementarnych fragmentów RNA: IRES(-) i 3'UTR(-). Struktury te przedstawione są szczegółowo na rysunkach 2 i 4-6.

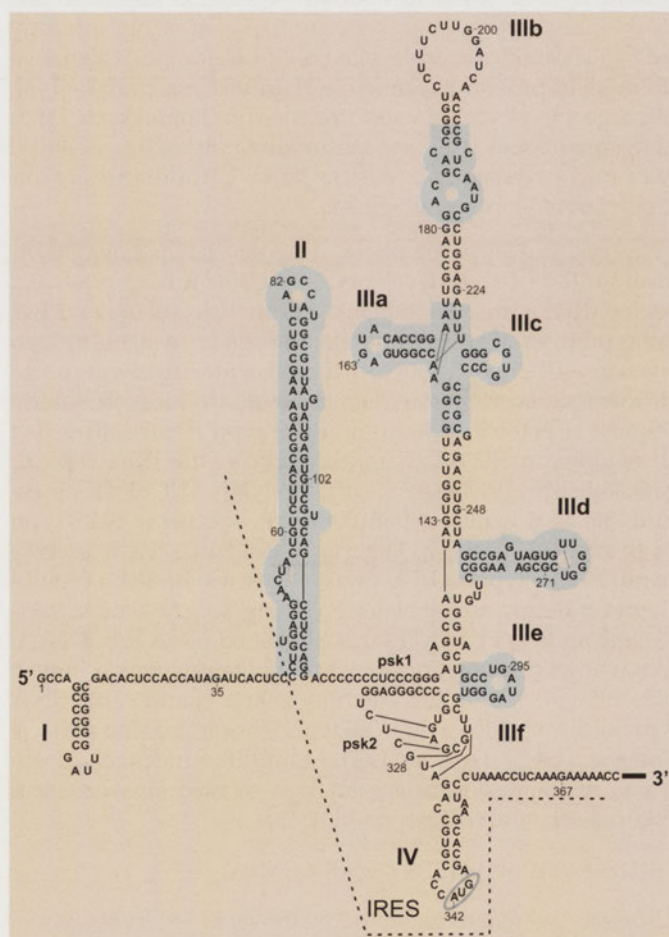
## STRUKTURA I FUNKCJA REGIONU NIEKODUJĄCEGO 5' (5'UTR)

### STRUKTURA REGIONU 5'UTR

5'UTR wirusa HCV ma długość 341 nukleotydów i jest wysoce konserwatywny (ponad 90% zachowawczości) w obrębie różnych genotypów wirusa [3,4,7]. Zachowawczość, ale jednocześnie pewien stopień zróżnicowania sekwencji tego regionu wykorzystuje się w procedurach genotypowania [4]. Większa część sekwencji 5'UTR wraz z pierwszymi nukleotydami kodującymi poliproteinę stanowi wewnętrzne miejsce oddziaływania z rybosomem, tzw. IRES (ang. *internal ribosomal entry site*), od którego rozpoczyna się translacja wirusowej poliproteiny nie wymagająca obecności struktury kap na końcu 5' cząsteczki RNA [3,4,10].

Region 5'UTR przyjmuje określoną strukturę drugo- i trzeciorzędową. W 1992 roku zaproponowano pierwszy model struktury drugorzędowej 5'UTR wirusa HCV. W kolejnych latach model ten ulegał wielokrotnym przekształceniom, które uwzględniały informacje pochodzące z badań termodynamicznych, filogenetycznych, z badań prowadzonych z wykorzystaniem mutagenyzy oraz sond strukturalnych takich jak nukleazy i chemiczne reagenty modyfikujące [3,10]. W ostatnich latach poczyniono szereg dodatkowych ustaleń na podstawie wyników badań krystalograficznych i techniką NMR [11,12]. Najnowszy model struktury regionu 5'UTR przedstawia Rysunek 2. Złożony jest on z czterech głównych domen strukturalnych, oznakowanych: I - IV, z oddziaływaniami dalekiego zasięgu RNA-RNA pomiędzy niektórymi z nich.

Region 5'UTR sfotografowano w mikroskopie elektronowym, także w kompleksie z podjednostką rybosomalną 40S [13,14]. Potwierdzono ogólną architekturę IRES, a także wskazano na przestrzenne ustawienie domen strukturalnych względem siebie. W kompleksie z podjednostką rybosomalną region ten przyjmuje kształt wydłużony. Okazuje się, że pętla apikalna IIIb nie bierze udziału w oddziaływaniach z rybosomem i „wystaje” poza kompleks. Poddomeny IIIa-IIIc oraz domena II skierowane są w przeciwnych kierunkach rozchodząc się z centralnego rdzenia cząsteczki, skupiającego także spinki IIIe i IIIf [13]. Podobną organizację przestrzenną zaobserwowano w przypadku izolowanego fragmentu IRES metodą niskokątowego rozpraszania promieni rentgenowskich [11]. Z kolei, za pomocą mikroskopii krio-elektronowej (cEM) uzyskano trójwymiarowy obraz kompleksów: IRES - podjednostka 40S oraz IRES pozbawiony domeny II - podjednostka 40S, obu z rozdzielczością 20 Å [13]. Porównanie uzyskanych obrazów wykazało, że obecność domeny II indukuje zmiany strukturalne w podjednostce rybosomalnej 40S. Region IRES wirusa HCV jest więc „dynamicznym manipulatorem” maszynerii translacyjnej gospodarza [7].



**Rysunek 2.** Model struktury drugorzędowej regionu 5'UTR nici genomowej wirusa HCV. Zaznaczono wewnętrzne miejsce oddziaływania z rybosomem, tzw. IRES, kodon START-AUG oraz motywy strukturalne scharakteryzowane z rozdzielczością atomową, metodą NMR lub krystalograficzną. Struktury poszczególnych motywów są zdeponowane w banku danych RNABase [12], dostępnym poprzez stronę internetową <http://www.rnabase.org>, pod następującymi kodami: domena II - RCSB01936-39, fragment poddomeny IIIb - RCSB015193, skrzyżowanie IIIabc - UR0018, poddomena IIIc - RCSB013189, poddomena IIId - RCSB011837 oraz RCSB011359, poddomena IIIe - RCSB011360.



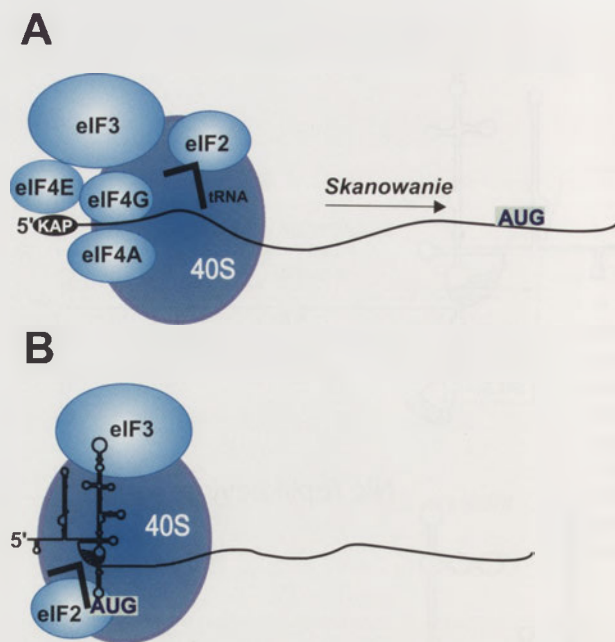
## FUNKCJA REGIONU IRES

Proces translacji zależny od obecności IRES wymaga oddziaływania tej struktury z kompleksem 43S, na który składa się podjednostka rybosomalna 40S, inicjujący czynnik translacyjny eIF3 oraz czynnik eIF2, zasocjowany z GTP oraz z tRNA inicjatorowym (Rys. 3) [3,10]. Po rozpoznaniu kodonu START następuje przyłączenie dużej podjednostki rybosomalnej oraz przejście do etapu elongacji. Natomiast w inicjacji translacji większości eukariotycznych mRNA uczestniczą także inne czynniki translacyjne tworzące kompleks ze strukturą kapu obecną na końcach 5' tych cząstecek. Kolejność asocjacji poszczególnych składników kompleksu inicjującego, właściwego dla wirusa HCV nie była do niedawna znana. W szczególności, nie było wiadomo czy wiązanie IRES do podjednostki rybosomalnej 40S poprzedza jej wiązanie z eIF3. Okazało się, że IRES wiąże się najpierw z podjednostką 40S, a następnie do nich przyłącza się eIF3 i stabilizuje utworzony kompleks [15,16]. Bezpośrednie oddziaływanie IRES wirusa HCV z rybosomem ma charakter unikalny, zostało ono opisane jeszcze tylko u jednego wirusa – CSFV (wirus klasycznego pomoru świń) i przypomina prokariotyczny model oddziaływania rybosomu z mRNA. Brak zjawiska skanowania RNA przez rybosom w poszukiwaniu kodonu START (lub ograniczone do bliskiego sąsiedztwa kodonu AUG) oraz ograniczony udział czynników translacyjnych, to kolejne podobieństwa do modelu prokariotycznego inicjacji procesu translacji [3]. Okazuje się, że efektywność translacji w komórkach zakażonych wirusem HCV jest stosunkowo niska, nawet 40000 razy mniej wydajna niż wirusa polio. Utrudnia to organizmowi obronę immunologiczną.

Na podstawie porównania długości łańcuchów RNA, struktur II- i III-rzędowych oraz sposobów funkcjonowania, region IRES wirusa HCV (a także pestiwirusów oraz wirusa GB typu B) zakwalifikowano do nowego typu struktur tego rodzaju – IRES typu III. Od IRES pikornawirusów, typu I i II, różni się bowiem wieloma cechami, do których należą: długość o połowę krótsza niż IRES typu II; struktura II- i III-rzędowa różna od charakterystycznej dla IRES typu II; brak konserwatywnej sekwencji 5'-YNNNAUG-3' (Y – pirymidyna, N- dowolny rybonukleotyd), obecnej w IRES typu I i II; znacznie mniejsza specyficzność tkankowa w porównaniu z IRES typu I i II; w przeciwieństwie do IRES typu I i II, niekonieczny udział białek PTB (ang. *polypyrimidine tract-binding protein*) i La (ATP-aza zależna od DNA lub RNA, o aktywności helikazy) oraz czynników inicjacyjnych innych niż eIF2 i eIF3; brak lub znikomy zakres skanowania RNA – różnica w stosunku do IRES typu I; dopuszczalne mutacje kodonu START (AUU, CUG), które tylko nieznacznie obniżają wydajność translacji HCV, a są niedopuszczalne u pikornawirusów (IRES typu I i II) [3].

## ODDZIAŁYWANIE IRES Z RYBOSOMEM

Miejsce wewnętrznego oddziaływania z rybosomem – IRES, obejmuje ok. 300 nt regionu niekodującego 5', co odpowiada jego domenom: II, III i IV (Rys. 2) [3,10,15,17]. Przyjmuje się, że również 12-30 pierwszych nukleotydów regionu kodującego wirusową poliproteinę wchodzi w zakres IRES. Sekwencja tego odcinka może być modyfikowana pod warunkiem, że wprowadzone zmiany nie wpłyną



**Rysunek 3.** Schemat przedstawiający składniki kompleksu inicjującego proces translacji. **A** – kompleks kanoniczny, w którym za wiązanie podjednostki rybosomalnej 40S odpowiedzialny jest kap znajdujący się na końcu 5' mRNA, oddziałujący z licznymi czynnikami translacyjnymi; **B** – kompleks właściwy dla HCV, w którym IRES obecny na końcu 5' genomowego RNA wiąże podjednostkę 40S oraz niektóre czynniki translacyjne.

na wzrost stabilności spinki w domenie IV i nie zakłócają dostępności kodonu START [3].

Na podstawie wyników mapowania enzymatycznego i chemicznego określono sposób oddziaływania regionu IRES z rybosomem oraz z czynnikiem eIF3 [17]. Wykazano, że domena II, od 49 nukleotydu, podobnie jak domena III, z wyjątkiem nukleotydów 192-199 oraz struktura pseudowęzła są zaangażowane w bezpośrednie wiązanie rybosomu. Skrzyżowanie IIIabcd umożliwia wiązanie podjednostki rybosomalnej 40S, przyjmując określoną aranżację przestrzenną w obecności jonów  $Mg^{2+}$  [11]. Czynniki eIF3 wiąże się natomiast do części domeny II, poddomeny IIIc oraz do skrzyżowania IIIabc [10,15,18].

Sądzi się, że poszczególne domeny regionu IRES pełnią funkcje analogiczne do określonych inicjatorowych czynników translacyjnych w procesie wiązania rybosomu do RNA i inicjacji translacji [7]. Prawdopodobnie z tego powodu, sekwencje pętli apikalnych IIIId i IIIe oraz trzonów poddomen IIIc i IIIe są w znacznym stopniu zachowawcze w obrębie pestiwirusów oraz różnych typów wirusa HCV i GBV-B [3]. Sugerowane wcześniej oddziaływanie pomiędzy sekwencją pętli apikalnej IIIb (12nt: CCUUUCUUGGAU), a komplementarną sekwencją rybosomalnego 18S RNA człowieka (nt: 461-471) nie zostało jak dotąd potwierdzone eksperymentalnie. Takiego oddziaływania nie można jednakże wykluczyć, biorąc pod uwagę uporządkowanie przestrzenne kompleksu IRES – podjednostka rybosomalna 40S [14]. Wskazują na to również wyniki uzyskane przez Otto i wsp. [19], którzy ustalili, że do prawidłowego związania się rybosomu do IRES wymagana jest zmiana konformacyjna podjednostki 40S oraz rozplecenie struktury drugorzędowej domeny IV regionu IRES, co wymaga współdziałania obydwu komponentów kompleksu [19]. Zidentyfikowano produkty zszywania IRES z białkami rybosomalnymi: S2,



S3, S10, S16/18, S15, S27 oraz kilkoma innymi białkami małej podjednostki [19]. Inni autorzy wykazali wiązanie się do IRES białek rybosomalnych o masie 25 kDa, S5 i S9 [20,21]. Oddziaływania te odgrywają prawdopodobnie rolę w prawidłowym umiejscowieniu małej podjednostki rybosomalnej względem RNA genomu HCV.

## INNE ODDZIAŁYWANIA

O oddziaływaniu IRES z określonymi białkami wnioskuje się często pośrednio, na podstawie obserwacji ich wpływu na proces translacji. Otrzymane w ten sposób informacje bywają jednak rozbieżne bądź trudne do interpretacji. Na przykład, wskazano zarówno na stymulującą [22] jak i na hamującą rolę [23] wirusowego białka NS5A w procesie translacji. Nie wiadomo jednak, czy białko to wiąże się bezpośrednio z 5'UTR. Wirusowym białkiem oddziałującym z IRES okazało się być natomiast białko rdzenia C [24,25]. Zaproponowano, że może ono służyć jako negatywny regulator translacji [24-26].

Zdolność specyficznego wiązania się z IRES wykazuje także kilka białek komórkowych, których część uznawana jest za niekanoniczne czynniki translacyjne [3,4]. Najważniejsze z nich to białko PTB, które zwane jest również hnRNP 1 (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1*), a także białko La. Obydwa białka pełnią ważną funkcję w inicjacji translacji pikornawirusów. Na podstawie badań metodą fotofosforylacji, określono trzy miejsca wiązania PTB do IRES wirusa HCV – trzy odcinki bogate w reszty pirymidynowe: 1-84, 126-134, 135-291 [4]. Wskazano także na preferencyjne wiązanie białka PTB w obrębie nukleotydów 120-130, pomiędzy domenami II i III, na podstawie wyników immunoprecypitacji. Okazuje się jednak, że wyeliminowanie tego białka z systemu translacyjnego *in vitro*, za pomocą specyficznych przeciwciał, hamuje funkcjonowanie IRES wirusa HCV w znacznie mniejszym stopniu niż IRES pikornawirusów (wirusa zapalenia opon mózgowych). Ponadto, ponowne dodanie do systemu czystego białka przywraca wydajną translację pikornawirusów, nie wpływa natomiast na zmianę poziomu translacji HCV. Doświadczenie to podważa proponowane wcześniej znaczenie białka PTB w regulacji translacji wirusa HCV oraz sugeruje istnienie innego, hipotetycznego białka usuniętego za pomocą przeciwciał w kompleksie z PTB, które może być odpowiedzialne za bardziej wydajną translację. Donoszono zarówno o braku jakiegokolwiek wpływu PTB na działanie IRES, jak i o tym, że białko to jest niezbędne do jego funkcjonowania [3].

Wpływ na proces translacji ma niewątpliwie białko La, które wiąże się do fragmentów RNA zawierających sekwencje AUG i do wielu rodzajów wirusowych 5'UTR np. wirusa polio, HIV i wirusa grypy [3]. W przypadku HCV, białko La wiąże się do domeny IV zawierającej kodon START. Wykazano, że dodanie tego białka do systemu translacji HCV *in vitro* wzmacnia ją nawet 60-krotnie [3,27,28]. Przypuszcza się, że dzieje się to na drodze rozplatania struktury spinkowej domeny IV. Określono dwa miejsca w obrębie białka La wiążące sekwencję GCAC znajdującą się w pobliżu kodonu START [28]. Najnowsze badania dotyczące udziału białka La w translacji wirusa HCV donoszą, że brak aktywnej formy tego białka obniża efektywność wiązania IRES do podjednostki rybosomalnej 40S [27].

Spośród innych białek oddziałujących specyficznym z IRES wskazano na kolejne białko jądrowe – hnRNP L, które wiąże się w pobliżu kodonu START (w obrębie nukleotydów: 342-402) i wzmacnia poziom translacji z subgenomowych konstruktów HCV [3,4]. Przedstawiono sugestię, że w mechanizmie tym może uczestniczyć białko PTB. Białka o masach cząsteczkowych 87 i 120 kDa oddziaływały z poddomenami: IIIa, IIIb i IIIc w regionie nukleotydów: 131-253, ale prawdopodobnie znaczenie dla translacji ma tylko p120 [3]. Oddziaływanie białka p120, a także p170, z poddomeną IIIb, wykazała inna grupa badawcza, sugerując równocześnie prawdopodobne funkcjonowanie tych białek jako podjednostek eIF3 [3,4]. Białka PCBP1 i PCBP2 (ang. *poly (C) - binding protein*) wymagają obecności całej sekwencji IRES do związania się w regionie nukleotydów: 315-323, choć niejasne jest znaczenie funkcjonalne tych oddziaływań [4]. Wykazano ponadto, że do IRES wirusa HCV wiąże się szereg białek, obecnych w lizacie z komórek Huh7: pięć białek rybosomalnych, dziewięć podjednostek eIF3, FHOS (homolog forminy ulegający nadekspresji w śledzionie), białko wiążące EWSR1 (ang. *ewing sarcoma breakpoint region 1*), MIP-T3 (białko oddziałujące z mikrotubulami), UNR (ang. *upstream of N-ras encoded protein*), białka wiążące UNR, PAI-1 (inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1) oraz białko oddziałujące z mRNA [29].

Wykazano również, że translację wirusa HCV hamuje witamina B12, przypuszczalnie poprzez oddziaływanie z kompleksem inicjacyjnym [24]. Innym inhibitorem okazała się cząsteczka IRNA z drożdży (drożdżowy RNA o długości 60 nt), prawdopodobnie na skutek konkurencyjnego wiązania białka La [30]. Interesujące, że w obrębie IRES, w pobliżu kodonu AUG znaleziono miejsce rozpoznawane i przecinane przez RNazę P w warunkach *in vitro* [31]. Zaproponowano strukturę drugorzędową rozpoznawanej domeny – dwie krótkie spinki połączone jednoniciowym łącznikiem [32]. Nie wiadomo jednak, jaka mogłaby być rola RNazy P w cyklu życiowym wirusa.

## STRUKTURA I FUNKCJA REGIONU TERMINALNEGO 3' NICI REPLIKACYJNEJ (IRES(-))

### STRUKTURA REGIONU IRES(-)

Strukturę drugorzędową IRES(-) zaproponowały niemal równocześnie dwie grupy badawcze, Smith'a i Schuster [33,34]. Przedstawione modele różniły się długością cząsteczek RNA. W pierwszym przypadku wynosiła ona 416 nukleotydów, a w drugim 356. Między innymi stąd pojawiły się pewne różnice w proponowanych strukturach. Są one zgodne co do aranżacji pierwszych 222 nukleotydów, licząc od końca 3' cząsteczki. Istotne rozbieżności dotyczą pozostałego odcinka RNA, który w przypadku dłuższej cząsteczki zakłada oddziaływanie z regionami nici replikacyjnej bardziej oddalonymi w kierunku 5'. W obydwu modelach podzielono strukturę IRES(-) na domeny, używając jednakże różnego nazewnictwa. W niniejszej pracy przyjęto nazewnictwo zaproponowane przez Smith'a i wsp. [33], wykorzystujące nazwy analogiczne do odpowiednich domen IRES(+) z dodatkiem apostrofu. Model według Smith'a (Rys. 4) składa się z siedmiu domen: I', IIz', IIy', IIIa', IIIb', IIIcdef' i IV'. Należy zauważyć, że domeny IRES(-) tylko częściowo odpowiadają poszczególnym domenom IRES(+)



(Rys. 1), gdyż obydwie komplementarne łańcuchy RNA przyjmują różne struktury drugorzędowe, a nie jak można by wstępnie oczekiwać, struktury „lustrzane”.

#### UDZIAŁ REGIONU IRES(-) W PROCESIE REPLIKACJI

Dotychczasowe badania wskazują, że białkiem zaangażowanym w proces replikacji HCV jest polimeraza RNA zależna od RNA (RdRp), którą jest białko NS5B kodowane przez wirusa [4,7,8]. W obrębie IRES(-) wykazano istnienie struktury promotorowej do syntezy nici plus wirusowego RNA przy udziale wirusowej polimerazy. Region IRES(-) okazał się bardzo wydajną matrycą dla tego enzymu [35-38].

Przeprowadzono szereg eksperymentów mających na celu umiejscowienie regionu promotorowego oraz określenie minimalnej długości cząsteczki matrycowej. Początkowo wykazano, że odcinek o długości 122 nt z końca 3' nie stanowi matrycy dla polimerazy NS5B, i że sekwencji promotorowej należy szukać pomiędzy nt: 122-239 [35]. Friebe i wsp. wykazali jednak, że do zadziałania wirusowej polimerazy wystarczy odcinek pierwszych 125 nt obejmujących domeny: I', IIz' i część IIy' [36] (Rys. 4). Również Kashiwagi i wsp. wskazują pozycje nt: 46-117 jako miejsce pozytywnej kontroli transkrypcji i prawdopodobne miejsce wiązania polimerazy, ale lepszą efektywność uzyskano dla cząsteczki nieco dłuższej, obejmującej nukleotydy 40-130 [38]. Jednakże do uzyskania maksymalnej efektywności procesu potrzebny jest region IRES(-) o pełnej długości [35,36]. Doświadczenie przeprowadzone *in vitro* z udziałem oczyszczonego enzymu, nici replikacyjnej HCV oraz szeregu oligomerów DNA typu antysens wykazało, że najsilniejsze hamowanie inicjacji syntezy RNA powodował oligomer hybrydujący do regionu 85-103, w domenie IIz'. Mogło to odbywać się na drodze bezpośredniego blokowania hipotetycznego miejsca

wiązania polimerazy, lub pośrednio, poprzez powodowanie reorganizacji struktury RNA domeny I' oraz IIz' i w ten sposób zakłócenie wiązania enzymu [39].

Doświadczenie z cząsteczkami chimerycznymi IRES wirusów HCV i CSFV wskazało kilka regionów IRES HCV zaangażowanych w proces replikacji [40]. Były to, przedstawione na Rysunku 2, absolutnie konieczna do replikacji domena II (nt: 44-118) oraz domena III (nt: 134-290), której brak prowadził do niemal całkowitego zatrzymania procesu, do poziomu kilku procent wydajności. Im mniejszy był zamieniany region domeny III, tym obserwowano mniejszą inhibicję procesu. Czy wynikało to z działania struktur w IRES w układzie *in cis*, czy też dotyczyło cząsteczki komplementarnej – IRES(-), nie rozstrzygnięto [40]. Jednak bardziej prawdopodobna wydaje się druga możliwość, czyli że usuwanie domeny IRES wpływało pośrednio na obniżenie efektywności replikacji, poprzez uzyskaną w pierwszym etapie procesu defektywną nic minus, z brakującymi fragmentami IRES(-) i tym samym upośledzenie lub uniemożliwienie etapu drugiego – syntezy genomów potomnych.

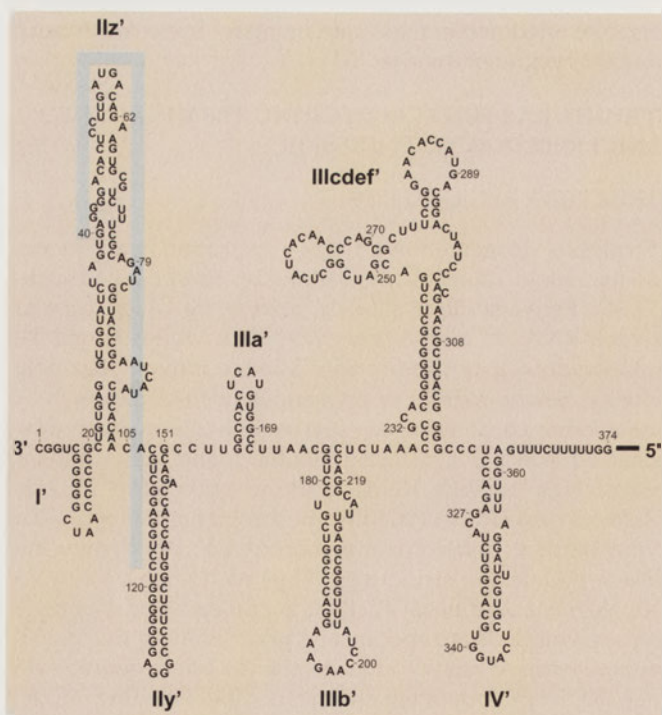
Skoro IRES(-) uczestniczy bezpośrednio w inicjacji replikacji, być może oddziałuje także z innymi niż polimeraza składnikami kompleksu replikacyjnego. Pozytywny wynik przyniosły badania na wiązanie wirusowej helikazy NS3 [41]. Ustalono, że miejsce oddziaływania NS3 z IRES(-) znajduje się w obrębie domeny I' i obejmuje jej dwuniciowy trzon. Spośród oddziaływań z innymi białkami, zidentyfikowano oddziaływanie IRES(-) (nt: 131-278) z białkiem komórkowym p45 o nieznanym jak dotąd funkcji [42] oraz z białkami: HuR (białko wiążące RNA człowieka) i hnRNPc (komórkowe białko uczestniczące w dojrzewaniu mRNA) [4].

#### STRUKTURA I FUNKCJA REGIONU NIEKODUJĄCEGO 3' (3'UTR)

##### STRUKTURA REGIONU 3'UTR

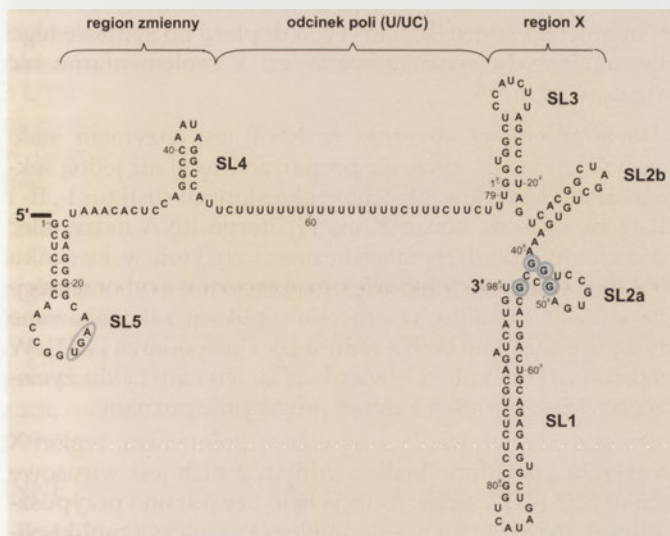
3'UTR wirusa HCV ma zmienną długość od 170 do 250 nukleotydów (Rys. 5). Wyróżnia się w nim trzy charakterystyczne odcinki: bezpośrednio za kodonem STOP występuje region zmienny o długości około 25-130 nukleotydów, cechujący się dużą heterogennością sekwencji w obrębie różnych genotypów, natomiast zachowawczy w obrębie tego samego genotypu wirusa. Dalej następuje odcinek polipirymidynowy o różnej długości, niezależnej od typu, ani nawet podtypu wirusa, liczący od około 30 do 130 nukleotydów. Na samym końcu genomu znajduje się region X, odkryty 6 lat po sklonowaniu wirusa, o długości 98 nukleotydów i niemal absolutnie zachowawczej sekwencji [4].

Wewnątrz regionu zmiennego można doszukać się dwóch motywów sekwencji, występujących we wszystkich typach wirusa. Są to: odcinek ACACUCC i dwunukleotyd UG znajdujący się na samym końcu regionu, bezpośrednio powyżej odcinka poli (U/UC) [4]. Odcinek polipirymidynowy można podzielić na część poli (UC), gdzie występują reszty cytydyny, pojedyncze, po dwie lub trzy następujące po sobie, poprzedzielane zmienną ilością reszt urydyny i część poli (U), która zwykle rozdziela część poli (UC) na dwa regiony o nierównej długości. Odcinek polipirymidynowy jest heterogenny nie tylko pod względem długości, ale i charakteru sekwencji. W genotypach 2a, 3a, 3b znajduje się w tym



**Rysunek 4.** Struktura drugorzędowa RNA IRES(-), fragmentu końcowego 3' nici replikacyjnej wirusa HCV. Szarą linią zaznaczono przypuszczalne miejsce wiązania wirusowej polimerazy RNA zależnej od RNA, białka NS5B (na podstawie [33,34,38]).





**Rysunek 5.** Schemat struktury drugorzędowej regionu 3'UTR nici genomowej wirusa HCV typu 1b. Wyróżniono region zmienny genotypowo, odcinek polipirymidynowy oraz region X(+). Na rysunku zaznaczono również kodon STOP genu poliproteiny (szara obwódka) oraz reszty guanozyny chronione przez związaną polimerazę NS5B w eksperymencie typu *footprinting* (szare kółka) (na podstawie [4,45,55]).

regionie kilka konserwatywnych reszt adenozyliny, których brak w genotypach 1b i 2b [4]. Rzadko obserwuje się także pojedyncze reszty guanozyny.

#### REGIONY X(+) I X(-)

Początkowo podejrzewano, że na końcu 3' genu HCV znajduje się sekwencja poli (U) lub poli (A). Istnienie regionu X odkryli dopiero w 1995 roku Tanaka i współpracownicy. Porównanie sekwencji tego odcinka RNA w różnych genotypach wirusa wykazało pojedyncze zmiany jedynie w sekwencji spinki SL1, potwierdzając wysoką, wynoszącą 96-100% konserwatywność regionu X [4].

Model struktury drugorzędowej regionu X otrzymany metodą przewidywania komputerowego został częściowo potwierdzony wynikami badań eksperymentalnych [4,43,44]. Wykazano obecność stabilnej struktury spinki SL1 na końcu 3' cząsteczki RNA (Rys. 5). Otrzymane wyniki nie pozwoliły jednakże na zaproponowanie jednoznacznej struktury 52-nukleotydowego odcinka z końca 5' regionu X. Sugerowano słabe uporządkowanie tego fragmentu struktury lub tworzenie więcej niż jednej formy konformacyjnej cząsteczki RNA [43,44]. Niedawno, na podstawie wyników modyfikacji chemicznej oraz metody cięć RNA indukowanych w obecności jonów  $Pb^{2+}$ , zaproponowano strukturę regionu X, składającą się z czterech motywów typu spinki: SL1, SL2a, SL2b i SL3. Ponadto zauważono, że spinki SL2a i SL2b mają potencjalną możliwość utworzenia struktury typu pseudowęzła [45]. Inny charakter oddziaływań trzeciorzędowych na końcu 3' genu HCV zaproponował Friebe i wsp. [46], oddziaływania typu „*kissing interactions*” pomiędzy odcinkiem sekwencji  $32^X$ -GCUGUGA- $38^X$  regionu X(+) oraz odcinkiem sekwencji kodującej NS5B: 9281-UCACAGC-9287. Jednakże wcześniejsze badania genomowego RNA oraz konstruktów zawierającego jedynie 5'UTR i 3'UTR nie wykazały oddziaływań regionu X z innymi regionami badanych

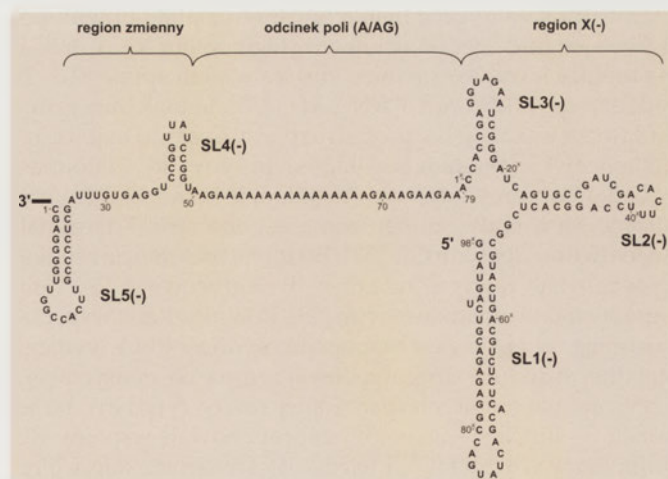
cząsteczek, co wskazuje na autonomiczność strukturalną tego regionu wirusowego RNA [43].

Pierwsze modele struktury drugorzędowej regionu X(-), fragmentu nici replikacyjnej HCV o sekwencji komplementarnej do X(+), zaproponowano wyłącznie na podstawie przewidywań komputerowych [47]. Niedawno opublikowano wyniki prac eksperymentalnych, analizujących strukturę X(-) w kontekście dłuższego fragmentu RNA, z wykorzystaniem metody ograniczonego trawienia specyficznymi nukleazami. Następnie, za pomocą programu *mfold*, wygenerowano model struktury drugorzędowej X(-), uwzględniający wybrane wyniki analizy eksperymentalnej [48]. Sugerowano również, że region X(-) oddziałuje z fragmentami sekwencji leżącymi dalej, w kierunku końca 3' cząsteczki, przez co jego struktura w kontekście dłuższego fragmentu nici replikacyjnej może przedstawiać się inaczej, niż w przypadku sekwencji izolowanej [48]. Ostatnio wykazano, że region X(-) związa się w postaci trzech motywów typu spinki: SL1(-), SL2(-) i SL3(-) zawierających niewielkie wybrzuszenia [45] (Rys. 6).

#### FUNKCJA REGIONU 3'UTR

##### INFEKCYJNOŚĆ WIRUSA

Wirus zapalenia wątroby typu C atakuje jedynie ludzi i szympansy, nie ma modelu eksperymentalnego wśród małych zwierząt. Z tego powodu przeprowadzono bardzo niewiele badań rozprzestrzeniania się wirusa w warunkach *in vivo*. Przeprowadzono eksperyment, podczas którego do wątroby szympansa wstrzykiwano w odstępach czasowych szereg wirusowych konstruktów zawierających delekcje w obrębie 3'UTR, a następnie zwierzę badano pod kątem obecności HCV w tkankach [49]. Wirusowe mutanty pozbawione całego regionu X bądź jego części (nt: 1-50 oraz 57-98) nie były zdolne do replikacji. Nie zaobserwowano również infekcyjności wirusa gdy użyto mutantu nie zawierającego odcinka poli (U/UC). Infekcyjny okazał się jedynie konstrukt pozbawiony 24 nukleotydów w obrębie regionu zmiennego wskazując, że region ten nie odgrywa tak istotnej roli w cyklu życiowym wirusa [49]. Podobny eksperyment został przeprowadzony przez Kolykhalova i



**Rysunek 6.** Model struktury drugorzędowej fragmentu końcowego 5' nici replikacyjnej wirusa HCV, tzw. 3'UTR(-). Wyróżniono region zmienny w obrębie różnych genotypów wirusa, odcinek polipurynowy oraz region X(-) (na podstawie [45]).



wsp. [50], a otrzymane wyniki były zgodne z wcześniejszymi obserwacjami Yanagi i wsp. [49].

## PROCES REPLIKACJI

Przedstawione w poprzednim rozdziale informacje dotyczące udziału poszczególnych części 3'UTR w cyklu życiowym wirusa znalazły potwierdzenie w wynikach badań otrzymanych z wykorzystaniem replikujących układów komórkowych Huh7 oraz HeLa [46,51-53]. Mianowicie, konstrukty pozbawione całego odcinka poli (U/UC), nie były zdolne do replikacji [51,52], minimalny odcinek polipirymidynowy wynosił 50-62 nt [51], a w innych badaniach zaledwie 26 nt [52]. Natomiast delecja regionu X lub jednej z jego części: SL1, SL2 lub SL3 prowadziła do całkowitego zaniku replikacji [51,52] i jedynie nieliczne mutacje punktowe w tym regionie były tolerowane [51,53]. Z kolei usunięcie regionu zmiennego z 3'UTR genomu wirusa tylko obniżało efektywność procesu nie prowadząc do jego zatrzymania [46,51,52]. Dodatkowo wykazano, że kluczową rolę w replikacji wirusa odgrywa region położony bezpośrednio powyżej kodonu STOP [46]. Modelowa cząsteczka RNA kodująca C-końcowy fragment poliproteiny (436 nt powyżej kodonu STOP) i zawierająca region zmienny 3'UTR była także wydajną matrycą dla rekombinanta wirusowej polimerazy NS5B w badaniach *in vitro*. Niespodziewanie okazało się, że *in vitro* region X i odcinek poli (U/UC) wiążą NS5B stosunkowo słabo [54]. Miejsce przyłączenia polimerazy w obrębie regionu X zmapowano wewnątrz sekwencji SL2 i w części spinki SL1 [55]. Są to chronione przed trawieniem RNazą T1 reszty guanozyn w pozycjach 41, 42, 50 i 53 (Rys. 5).

W badaniach prowadzonych w układach *in vitro* stwierdzono bezpośrednie oddziaływanie RNA X(+) z białkiem NS5B [4,35,37,55,56]. Chociaż specyficzność wirusowej polimerazy względem modelowej matrycy RNA jest niewysoka i obecność regionu X(+) nie zawsze jest konieczna do replikacji [4,35,37,57], to jednak w przypadku matryc zawierających genomowy lub subgenomowy RNA obecność regionu X jest niezbędna dla efektywności i specyficzności procesu. Wykazano, że brak tej sekwencji lub jej części, niemal całkowicie hamuje replikację, a w przypadku delekcji nukleotydów 31-40 obserwuje się powstawanie zbyt długiego produktu [35,55].

Centrum katalityczne białka NS5B oddziałuje prawdopodobnie jedynie z jednoniciowym fragmentem RNA. Inicjacja replikacji wydaje się mieć miejsce w pętli spinki SL1, 21 nukleotydów od końca 3' RNA X(+) [55]. Jednak inna grupa badawcza wskazuje, że proces rozpoczyna się od najbliższego końcowi 3', regionu bogatego w puryny [56]. Natomiast w badaniach prowadzonych w układzie komórkowym wykazano, że w reakcji preferowana jest obecność 3' terminalnego dwunukleotydu GU [53]. Podobne preferencje replikazy względem reszty U na końcu 3' matrycowego RNA obserwowano w układzie *in vitro* [58]. Również Kao i wsp. [57] postulują, że enzym do rozpoczęcia syntezy RNA wymaga stabilnej struktury drugorzędowej cząsteczki matrycowej i przynajmniej jednej niesparowanej reszty cytydyny na jej końcu 3'. Butcher i wsp. [59] zaproponowali wspólny dla polimerazy wirusa HCV i wirusa  $\phi 6$  scenariusz inicjacji replikacji, w której synteza nowej nici RNA rozpoczyna się od nukleotydu komplementarnego do przedostatniego z końca 3' nukleotydu cząsteczki matrycowej. W drugiej kolejności

dobudowywany jest nukleotyd komplementarny do reszty obecnej na końcu 3' matrycy, a dopiero po syntezie tego dwunukleotydu syntetyzowana jest komplementarna nic wirusowego RNA.

Wiele obserwacji sugeruje, że NS5B jest enzymem mało specyficznym tzn. może rozpoznawać więcej niż jedną sekwencję nukleotydów. Obecność określonych struktur I-, II- i III-rzędowych na końcu 3' matrycowego RNA może mieć za zadanie modulację specyficzności enzymu w kierunku lepszej wydajności i/lub większej precyzji w wyborze miejsca inicjacji. Ponadto, w procesie replikacji zaangażowane mogą być zarówno białka wirusa jak i gospodarza [4,41]. W podsumowaniu należy stwierdzić, że ten etap cyklu życiowego wirusa nie jest jak dotąd precyzyjnie poznany.

Oprócz oddziaływania z wirusową polimerazą, region X przyłącza także inne białka: jednym z nich jest wirusowe białko NS3 [41]. Pełniąc funkcję helikazy jest ono przypuszczalnie bardzo ważnym składnikiem kompleksu replikacyjnego, gdyż polimeraza NS5B ulega odłączeniu od matrycy, napotkawszy bardzo stabilne struktury drugorzędowe RNA [60]. Specyficzne oddziaływanie NS3 z 3'UTR wirusa HCV dotyczy prawdopodobnie większej części tego regionu, zawierającej sekwencję X oraz odcinek poli (U/UC), gdyż żaden z tych elementów z osobna nie wystarcza do utworzenia trwałego kompleksu z tym białkiem [41].

## PROCES TRANSLACJI

Jednym z najwcześniej poznanych białek komórkowych oddziałujących z 3'UTR HCV było białko PTB. Zaproponowane miejsce oddziaływania to 21 nukleotydów z końca 5' regionu X (SL3), zawierające część konsensusowej sekwencji rozpoznawanej przez to białko [44]. Podobne wyniki przedstawiają Tsuchihara i wsp. [61] sugerując, że regionem zaangażowanym w oddziaływanie z PTB jest 19 nukleotydów z końca 5' regionu X oraz 7 nukleotydów znajdujących się powyżej tej sekwencji. Metodą mutagenyzy wykazano, że dla tego oddziaływania istotna jest zarówno struktura drugorzędowa, jak i sekwencja nukleotydów w regionie SL2 i SL3 [44,61]. Oddziaływanie PTB z regionem X może mieć związek z regulacją procesu translacji. Zaproponowano mechanizm wzmocnienia efektywności procesu, poprzez oddziaływanie pomiędzy końcami 5' i 3' genomu HCV za pośrednictwem białka PTB z zaangażowaniem jeszcze innego, hipotetycznego białka Y [62]. Efekt wzmocnienia translacji poprzez cyklizację genomu jest obserwowany u wielu wirusów [9]. Jednak nie wszystkie wyniki potwierdzają wzmocniającą rolę białka PTB w procesie translacji HCV, niekiedy wydaje się ona być wręcz hamująca [63].

Nie ma również zgodności co do wpływu 3'UTR na efektywność translacji. Wykazano na przykład, że w układzie *in vitro*, delecja SL3 w regionie X i/lub odcinka poli (U/UC) spowodowała zwiększenie ilości powstającego białka [63]. Możliwym wytłumaczeniem tej obserwacji byłoby, że te fragmenty sekwencji, oddziałując z innymi czynnikami białkowymi hamują proces translacji. W innych badaniach zaobserwowano natomiast, że obecność 3'UTR nie miała wpływu na zwiększenie ilości produktu oraz efektywność procesu rozcinania poliproteiny [51,64]. Można sądzić, że w badaniach tego rodzaju kluczową rolę odgrywa wybór modelu eksperymentalnego. Okazało się bowiem, że o ile w lizacie z retikulocytów królika nie obserwuje się wpływu



3'UTR na efektywność translacji [52,65], o tyle w komórkach HeLa, hepatocytach oraz w modelu mysim obecność 3'UTR na końcu genomu stymuluje ten proces [65]. Ostatnio, o roli 3'UTR we wzmacnieniu efektywności translacji doniesiono na podstawie wyników badań przeprowadzonych zarówno w lizacie retikulocytów królika, jak i w komórkach Huh7 [66].

Na podstawie komputerowej analizy sekwencji genomu HCV, znaleziono potencjalną możliwość oddziaływania regionów 3'UTR oraz 5'UTR z komplementarnymi odcinkami sekwencji genu wirusowej polimerazy oddzielnymi o jeden nukleotyd [67]. Takie zbliżenie obydwu końców genomowego RNA zapewniłoby pewien sposób jego cykliczacji, oddziaływanie to wymaga jednak eksperymentalnego potwierdzenia.

#### INNE PROCESY ORAZ POTENCJALNE ODDZIAŁYWANIA

Badania, jak na trwałość wirusowego RNA wpływa obecność jego końca 3' wykazały, że istotną rolę pełni w tym przypadku region X [52]. Jednakże, nie we wszystkich genotypach wirusa efekt ten jest równie znaczący. Region 3'UTR zaangażowany jest także w oddziaływanie z białkami komórkowymi innymi niż PTB [4]. Sądzi się, że miejscem, do którego przyłącza się wiele z nich jest odcinek poli (U/UC). Jednym z takich białek jest HuR (białko człowieka wiążące RNA) [4], które w komórce zaangażowane jest w transport białek oraz kwasów nukleinowych pomiędzy jądrem a cytoplazmą. Jego poziom zmienia się w zależności od stopnia rozwoju komórki. Białko HuR przyłącza się zarówno do końca 3' nici genomowej wirusa HCV jak i do nici replikacyjnej. Przypuszcza się, że może ono chronić wirusowe RNA przed degradacją. Dodatkowo może być zaangażowane w proces replikacji [4]. Innym białkiem oddziałującym z odcinkiem poli (U/UC) jest hnRNP C. Białko to obecne jest jedynie w jądrze komórkowym i uczestniczy w składaniu i poliadenylacji mRNA. Postulowane oddziaływanie hnRNP C z wirusowym RNA budzi wiele wątpliwości. Czy w zainfekowanej komórce może dojść do przeniesienia białka jądrowego na teren cytoplazmy, gdzie mógłby utworzyć się odpowiedni kompleks? Sugeruje się, że hnRNP C oddziałując z końcem 3' wirusowego RNA może wpływać na zmianę jego struktury II- i III- rzędowej, ułatwiając kompleksowi replikacyjnemu przyłączenie się do RNA [4]. Wyniki innych badań wskazują, że odcinek poli (U/UC) jest również miejscem rozpoznawanym przez antygen La oraz GADPH (dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego), natomiast do regionu X o pełnej długości wiążą się białka komórkowe p87 i p130 [4]. Jak dotąd, nie poznano jakie to białka, jaką funkcję pełnią w komórce i w cyklu życiowym wirusa. Region X oddziałuje również z białkami rybosomalnymi: L22, L3, S3 i mL3 [47]. Podobne oddziaływania zaobserwowano pomiędzy białkiem L22 i RNA wirusa EBV (ang. *Epstein-Barr virus*) oraz HPV-1 (wirus brodawczaka typu 1 człowieka), wykazując dodatni wpływ L22 na efektywność translacji [47]. Tymczasem w przypadku wirusa Q $\beta$ , rybosomalne białka gospodarza uczestniczą w tworzeniu wirusowego kompleksu replikacyjnego [47]. Niejasne jest, czy oddziaływanie białek rybosomalnych z regionem X wirusa HCV ma związek z procesem replikacji, czy translacji, czy też z tymi obydwoma procesami. Wykazana możliwość wiązania się białka NS5B wirusa HCV z rybosomem [68], mogłaby wska-

zywać na podobieństwo do strategii wykorzystywania białek rybosomalnych gospodarza, jaką przyjmuje wirus Q $\beta$ .

#### PODSUMOWANIE

Jeszcze do niedawna sądzono, że dla zrozumienia funkcjonowania organizmów żywych oraz identyfikacji czynników odpowiedzialnych za ich rozwój i zróżnicowanie, decydujące znaczenie ma poznanie wszystkich białek kodowanych przez ich genomy. Obecnie, coraz powszechniej sądzi się, że za różnorodność żywych organizmów odpowiada w dużym stopniu niekodująca część ich informacji genetycznej [69,70]. Jak przedstawiono w niniejszym artykule, poznanie struktury i funkcji regionów niekodujących genomowego RNA wirusa HCV jest bardzo istotne dla zrozumienia przebiegu procesów życiowych tego wirusa. Ponadto, wiedza ta może okazać się pomocna w opracowaniu skutecznych metod terapii antywirusowej.

Zakażenie wirusem HCV okazało się w ostatnich latach jednym z najistotniejszych problemów zdrowotnych na świecie. Stosowane obecnie metody leczenia odnoszą oczekiwany skutek najwyżej u 40-60% pacjentów [2]. Jak dotąd, nie opracowano także szczepionki przeciwko HCV. Przyczyną jest wysoka zmienność wirusa, porównywalna do zmienności wirusa HIV. Wobec braku w pełni skutecznych, konwencjonalnych leków i szczepionek, podjęto liczne próby zaprojektowania inhibitorów wirusowych białek oraz oligomerów typu antysens i rybozymów, a ostatnio także interferencyjnych RNA, skierowanych przeciwko wirusowemu RNA [2,31,71].

W przypadku wirusa HCV, podobnie jak innych wirusów RNA, regionami szczególnie obiecującymi jako cel ataku są ich regiony niekodujące 5' i 3'. Regiony te cechuje bardzo wysoka zachowawczość i są one niezbędne w procesach translacji oraz replikacji wirusa. W przypadku atakowania konserwatywnych odcinków RNA kodujących wirusowe białka, obserwowano mutacje przystosowawcze zachodzące w obrębie zaatakowanego regionu, nie zmieniające składu aminokwasowego białka, które odpowiedzialne były za tzw. efekt ucieczki wirusa [31,72-75]. Natomiast w przypadku niekodujących fragmentów RNA o wysokiej zachowawczości, nawet niewielkie zmiany w sekwencji nukleotydów prowadzą często do zaburzenia ich struktury i tym samym do ich dysfunkcji. Można więc sądzić, że atakowanie wirusowych cząsteczek RNA w obrębie ich regionów niekodujących jest bardziej obiecujące w strategii antywirusowej, niż atakowanie regionów kodujących białka.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362
2. Dev A, Patel K, McHutchison JG (2004) New therapies for chronic hepatitis C virus infection. *Curr Gastroenterol Rep* 6: 77-86
3. Rijnbrand RCA, Lemon SM (2000) Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation in Hepatitis C Virus Replication, In: Hagedorn CH, Rice CM (eds.) *The hepatitis C viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology* 242: 85-116
4. Shi ST, Lai MM (2001) Hepatitis C viral RNA: challenges and promises. *Cell Mol Life Sci* 58: 1276-1295
5. Kamińska A, Bednarska A, Radkowski M (2003) Pozawątrobowa replikacja wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV). *Przegl Epidemiol* 57: 317-320



6. Adamek A (1999) Hepatitis C: współczesne poglądy na biologię molekularną HCV. *Pol Merkuriusz Lek* 6: 53-56
7. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlowsky JM (2004) Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39: 5-19
8. Sidorkiewicz M (2002) Powstawanie i funkcje białek wirusa zapalenia wątroby typu C. *Postępy Biochemii* 48: 143-150
9. Juszczuk M, Zagórski-Ostojka W, Hulanicka D (1999) Mechanizm ekspresji genomu wirusów (+) RNA. *Postępy Biochemii* 45: 87-94
10. Gallego J, Varani G (2002) The hepatitis C virus internal ribosome-entry site: a new target for antiviral research. *Biochem Soc Trans* 30: 140-145
11. Kieft JS, Zhou K, Jubin R, Murray MG, Lau JY, Doudna JA (1999) The hepatitis C virus internal ribosome entry site adopts an ion-dependent tertiary fold. *J Mol Biol* 292: 513-529
12. Murthy VL, Rose GD (2003) RNABase: an annotated database of RNA structures. *Nucleic Acids Res* 31: 502-504
13. Spahn CM, Kieft JS, Grassucci RA, Penczek PA, Zhou K, Doudna JA, Frank J (2001) Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40S ribosomal subunit. *Science* 291: 1959-1962
14. Beales LP, Rowlands DJ, Holzenburg A (2001) The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy. *RNA* 7: 661-670
15. Otto GA, Puglisi JD (2004) The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* 119: 369-380
16. Ji H, Fraser CS, Yu Y, Leary J, Doudna JA (2004) Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16990-16995
17. Lytle JR, Wu L, Robertson HD (2002) Domains on the hepatitis C virus internal ribosome entry site for 40S subunit binding. *RNA* 8: 1045-1055
18. Odreman-Macchioli F, Baralle FE, Buratti E (2001) Mutational analysis of the different bulge regions of hepatitis C virus domain II and their influence on internal ribosome entry site translational ability. *J Biol Chem* 276: 41648-41655
19. Otto GA, Lukavsky PJ, Lancaster AM, Sarnow P, Puglisi JD (2002) Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40S interaction. *RNA* 8: 913-923
20. Odreman-Macchioli FE, Tisminetzky SG, Zotti M, Baralle FE, Buratti E (2000) Influence of correct secondary and tertiary RNA folding on the binding of cellular factors to the HCV IRES. *Nucleic Acids Res* 28: 875-885
21. Fukushi S, Okada M, Stahl J, Kageyama T, Hoshino FB, Katayama K (2001) Ribosomal protein S5 interacts with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Biol Chem* 276: 20824-20826
22. He Y, Yan W, Coito C, Li Y, Gale M, Jr., Katze MG (2003) The regulation of hepatitis C virus (HCV) internal ribosome-entry site-mediated translation by HCV replicons and nonstructural proteins. *J Gen Virol* 84: 535-543
23. Kalliampakou KI, Kalamvoki M, Mavromara P (2005) Hepatitis C virus (HCV) NS5A protein downregulates HCV IRES-dependent translation. *J Gen Virol* 86: 1015-1025
24. Zhang J, Yamada O, Yoshida H, Iwai T, Araki H (2002) Autogenous translational inhibition of core protein: implication for switch from translation to RNA replication in hepatitis C virus. *Virology* 293: 141-150
25. Li D, Lott WB, Martyn J, Haqshenas G, Gowans EJ (2004) Differential effects on the hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site by vitamin B12 and the HCV core protein. *J Virol* 78: 12075-12081
26. Boni S, Lavergne JP, Boulant S, Cahour A (2005) Hepatitis C virus core protein acts as a trans-modulating factor on internal translation initiation of the viral RNA. *J Biol Chem* 280: 17737-17748
27. Costa-Mattioli M, Svitkin Y, Sonenberg N (2004) La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell Biol* 24: 6861-6870
28. Pudi R, Srinivasan P, Das S (2004) La protein binding at the GCAC site near the initiator AUG facilitates the ribosomal assembly on the hepatitis C virus RNA to influence internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem* 279: 29879-29888
29. Lu H, Li W, Noble WS, Payan D, Anderson DC (2004) Riboproteomics of the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *J Proteome Res* 3: 949-957
30. Dasgupta A, Das S, Izumi R, Venkatesan A, Barat B (2004) Targeting internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation to block hepatitis C and other RNA viruses. *FEMS Microbiol Lett* 234: 189-199
31. Gomez J, Nadal A, Sabariego R, Beguiristain N, Martell M, Piron M (2004) Three properties of the hepatitis C virus RNA genome related to antiviral strategies based on RNA-therapeutics: variability, structural conformation and tRNA mimicry. *Curr Pharm Des* 10: 3741-3756
32. Piron M, Beguiristain N, Nadal A, Martinez-Salas E, Gomez J (2005) Characterizing the function and structural organization of the 5' tRNA-like motif within the hepatitis C virus quasispecies. *Nucleic Acids Res* 33: 1487-1502
33. Smith RM, Walton CM, Wu CH, Wu GY (2002) Secondary structure and hybridization accessibility of hepatitis C virus 3'-terminal sequences. *J Virol* 76: 9563-9574
34. Schuster C, Isel C, Imbert I, Ehresmann C, Marquet R, Kieny MP (2002) Secondary structure of the 3' terminus of hepatitis C virus minus-strand RNA. *J Virol* 76: 8058-8068
35. Oh JW, Ito T, Lai MM (1999) A recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase capable of copying the full-length viral RNA. *J Virol* 73: 7694-7702
36. Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R (2001) Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 75: 12047-12057
37. Reigadas S, Ventura M, Sarih-Cottin L, Castroviejo M, Litvak S, Astier-Gin T (2001) HCV RNA-dependent RNA polymerase replicates *in vitro* the 3' terminal region of the minus-strand viral RNA more efficiently than the 3' terminal region of the plus RNA. *Eur J Biochem* 268: 5857-5867
38. Kashiwagi T, Hara K, Kohara M, Iwahashi J, Hamada N, Honda-Yoshino H, Toyoda T (2002) Promoter/origin structure of the complementary strand of hepatitis C virus genome. *J Biol Chem* 277: 28700-28705
39. Reigadas S, Ventura M, Andreola ML, Michel J, Gryaznov S, Tarrago-Litvak L, Litvak S, Astier-Gin T (2003) An oligonucleotide complementary to the SL-B1 domain in the 3'-end of the minus-strand RNA of the hepatitis C virus inhibits *in vitro* initiation of RNA synthesis by the viral polymerase. *Virology* 314: 206-220
40. Reusken CB, Dalebout TJ, Eerligh P, Bredendiek PJ, Spaan WJ (2003) Analysis of hepatitis C virus/classical swine fever virus chimeric 5'NTRs: sequences within the hepatitis C virus IRES are required for viral RNA replication. *J Gen Virol* 84: 1761-1769
41. Banerjee R, Dasgupta A (2001) Specific interaction of hepatitis C virus protease/helicase NS3 with the 3'-terminal sequences of viral positive- and negative-strand RNA. *J Virol* 75: 1708-1721
42. Wang W, Deng Q, Huang K, Duan Z, Shao J, Huang Z, Huang Z (2003) A cellular protein specifically binds to the 3'-terminal sequences of hepatitis C virus intermediate negative-strand RNA. *Chin Med J* 116: 932-936
43. Blight KJ, Rice CM (1997) Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 71: 7345-7352
44. Ito T, Lai MM (1997) Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome. *J Virol* 71: 8698-8706
45. Dutkiewicz M, Ciesiolka J (2005) Structural characterization of the highly conserved 98-base sequence at the 3' end of HCV RNA genome and the complementary sequence located at the 5' end of the replicative viral strand. *Nucleic Acids Res* 33: 693-703
46. Friebe P, Boudet J, Simorre JP, Bartenschlager R (2005) Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol* 79: 380-392
47. Wood J, Frederickson RM, Fields S, Patel AH (2001) Hepatitis C virus 3'X region interacts with human ribosomal proteins. *J Virol* 75: 1348-1358



48. Smith RM, Wu GY (2004) Secondary structure and hybridization accessibility of the hepatitis C virus negative strand RNA 5'-terminus. *J Viral Hepat* 11: 115-123
49. Yanagi M, St Claire M, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J (1999) *In vivo* analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after *in vitro* mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2291-2295
50. Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM (2000) Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication *in vivo*. *J Virol* 74: 2046-2051
51. Friebe P, Bartenschlager R (2002) Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 76: 5326-5338
52. Yi M, Lemon SM (2003) 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 77: 3557-3568
53. Yi M, Lemon SM (2003) Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *RNA* 9: 331-345
54. Yamashita T, Kaneko S, Shiota Y, Qin W, Nomura T, Kobayashi K, Murakami S (1998) RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region. *J Biol Chem* 273: 15479-15486
55. Oh JW, Sheu GT, Lai MM (2000) Template requirement and initiation site selection by hepatitis C virus polymerase on a minimal viral RNA template. *J Biol Chem* 275: 17710-17717
56. Kim M, Kim H, Cho SP, Min MK (2002) Template requirements for *de novo* RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase on the viral X RNA. *J Virol* 76: 6944-6956
57. Kao CC, Yang X, Kline A, Wang QM, Barkett D, Heinz BA (2000) Template requirements for RNA synthesis by a recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 74: 11121-11128
58. Shim JH, Larson G, Wu JZ, Hong Z (2002) Selection of 3'-template bases and initiating nucleotides by hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 76: 7030-7039
59. Butcher SJ, Grimes JM, Makeyev EV, Bamford DH, Stuart DJ (2001) A mechanism for initiation RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* 410: 235-240
60. DeMarini DJ, Johnston VK, Konduri M, Gutshall LL, Sarisky RT (2003) Intracellular hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Virol Methods* 113: 65-68
61. Tsuchihara K, Tanaka T, Hijikata M, Kuge S, Toyoda H, Nomoto A, Yamamoto N, Shimotohno K (1997) Specific interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the extreme 3'-terminal structure of the hepatitis C virus genome, the 3'X. *J Virol* 71: 6720-6726
62. Ito T, Lai MM (1999) An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequence. *Virology* 254: 288-296
63. Murakami K, Abe M, Kageyama T, Kamoshita N, Nomoto A (2001) Down-regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA. *Arch Virol* 146: 729-741
64. Imbert I, Dimitrova M, Kien F, Kieny MP, Schuster C (2003) Hepatitis C virus IRES efficiency is unaffected by the genomic RNA 3'NTR even in the presence of viral structural or non-structural proteins. *J Gen Virol* 84: 1549-1557
65. McCaffrey AP, Ohashi K, Meuse L, Shen S, Lancaster AM, Lukavsky PJ, Sarnow P, Kay MA (2002) Determinants of hepatitis C translational initiation *in vitro*, in cultured cells and mice. *Mol Ther* 5: 676-684
66. Wang H, Shen XT, Ye R, Lan SY, Xiang L, Yuan ZH (2005) Roles of the polypyrimidine tract and 3' noncoding region of hepatitis C virus RNA in the internal ribosome entry site-mediated translation. *Arch Virol* 150: 1085-1099
67. Thurner C, Witwer C, Hofacker IL, Stadler PF (2004) Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *J Gen Virol* 85: 1113-1124
68. Tanaka T, Sugiyama K, Ikeda M, Naganuma A, Nozaki A, Saito M, Shimotohno K, Kato N (2000) Hepatitis C virus NS5B RNA replicase specifically binds ribosomes. *Microbiol Immunol* 44: 543-550
69. Barciszewski J, Erdmann VA (2003) Noncoding RNAs: molecular biology and molecular medicine. Landes Bioscience / Eurekah. Com, Georgetown, Texas U.S.A. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, New York U.S.A
70. Żywicki M, Szymański M, Barciszewski J (2004) Różnorodność i funkcje niekodujących regulatorowych RNA. *Postępy Biochemii* 50: 90-102
71. Randall G, Rice CM (2004) Interfering with hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res* 102: 19-25
72. McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA (2002) RNA interference in adult mice. *Nature* 418: 38-39
73. Gitlin L, Karelsky S, Andino R (2002) Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 418: 430-434
74. Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Miyagishi M, Maekawa S, Yi L, Kurosaki M, Taira K, Watanabe M, Mizusawa H (2003) Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 4: 602-608
75. Boden D, Pusch O, Lee F, Tucker L, Ramratnam B (2003) Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J Virol* 77: 11531-11535

## Structure and function of the non-coding regions of hepatitis C viral RNA

Mariola Dutkiewicz, Agata Świątkowska, Jerzy Ciesiolka

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

e-mail: ciesiolk@ibch.poznan.pl

**Key words:** hepatitis C virus, HCV, noncoding RNA region, UTR, region X, IRES

### ABSTRACT

At the 5' and 3' end of genomic HCV RNA there are two highly conserved, untranslated regions, 5'UTR and 3'UTR. These regions are organized into spatially ordered structures and they play key functions in regulation of processes of the viral life cycle. Most nucleotides of the region located at the 5' side of the coding sequence serve as an internal ribosomal entry site, IRES, which directs cap-independent translation. The RNA fragment present at the 3' end of the genome is required for virus replication and probably contributes to translation of viral proteins. During virus replication its genomic strand is transcribed into a strand of minus polarity, the replicative strand. Its 3' terminus is responsible for initiation of synthesis of descendant genomic strands. This article summarizes our current knowledge on the structure and function of the non-coding regions of hepatitis C genomic RNA, 5'UTR and 3'UTR, and the complementary sequences of the replicative viral strand.



Dorota Łubgan<sup>1,✉</sup>

Agnieszka Marczak<sup>1</sup>

Luitpold Distel<sup>2</sup>

Zofia Józwiak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Termobiologii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

<sup>2</sup>Department of Radiation Oncology, Friedrich-Alexander-University of Erlangen-Nuremberg, 27 Universitätsstrasse, D-91054 Erlangen, Germany

<sup>✉</sup>Katedra Termobiologii, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: lubgan1@poczta.onet.pl, tel. (042) 635 44 81

Artykuł otrzymano 15 lipca 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 29 września 2005 r.

**Słowa kluczowe:** koniugaty transferyny, terapia przeciwnowotworowa, receptor transferyny, endocytoza.

**Wykaz skrótów:** apoTRF – apotransferyna; DMT1 (ang. *divalent metal transporter*) – przenośnik dwuwartościowych metali; holoTRF – holotransferyna; sTRF- (ang. *soluble transferrin receptor*) – receptor transferyny; MDR (ang. *multidrug resistance*) – oporność wielolekowa; TRF – transferyna; DMSO – dimetylosulfotlenek; O<sub>2</sub><sup>-</sup> – anionorodnik ponadtlenków

## STRESZCZENIE

**W** celu zwiększenia skuteczności terapii nowotworów prowadzone są badania nad nośnikami, które będą selektywnie transportować lek do komórek nowotworowych nie uszkadzając przy tym komórek zdrowych. Nośniki leków powinny ograniczyć skutki uboczne chemioterapii i zwiększyć skuteczność leczenia. Z uwagi na fakt, że komórki nowotworowe posiadają na powierzchni swoich błon komórkowych zwiększoną liczbę receptorów transferyny duże nadzieje daje wykorzystanie tego właśnie białka jako nośnika leków przeciwnowotworowych. W niniejszej pracy przedstawiono możliwości zastosowania transferyny do przenoszenia leków przeciwnowotworowych, jonów oraz DNA do różnego typu komórek.

## WPROWADZENIE

Chemioterapia jest jak dotychczas podstawową metodą leczenia różnego rodzaju nowotworów. Często jednak niepożądane działania uboczne towarzyszące temu rodzajowi leczenia przewyższają efekt terapeutyczny. Dzieje się tak na skutek nieselektywnego oddziaływania leków z komórkami tak nowotworowymi jak i zdrowymi. Czasami stosowanie terapii wielolekowej lub podanie cytostatyków za pomocą odpowiednich „nośników” zapobiega temu zjawisku. Dlatego też celem wielu badań stało się otrzymanie nośnika dla leków przeciwnowotworowych i stworzenie takiego koniugatu lek-cząsteczka transportująca, który będzie toksyczny dla komórek nowotworowych, pozostawi zaś nienaruszone komórki zdrowe. Jednym z takich nośników otwierających nowe możliwości skuteczniejszego leczenia jest transferyna. Jest to białko dobrze poznane i komercyjnie dostępne [1]. Większość komórek nowotworowych posiada na powierzchni swoich błon dużą liczbę receptorów transferyny, wielokrotnie wyższą niż w przypadku komórek prawidłowych. Ten fakt nadekspresji receptorów znalazł zastosowanie w badaniach nad wykorzystaniem transferyny jako transportera leków przeciwnowotworowych, jonów oraz DNA do wnętrza komórki [2].

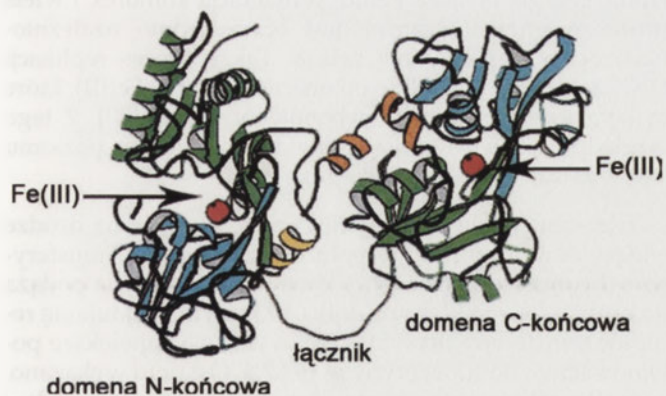
## TRANSFERYNA – CHARAKTERYSTYKA BIAŁKA

Transferyny należą do grupy glikoprotein biorących udział w metabolizmie jonów żelaza. Najlepiej poznana i scharakteryzowana jest odkryta w 1946 roku transferyna osocza (TRF). Transferyna jest składnikiem krwi, płynu owodniowego, mózgowo-rdzeniowego oraz limfy ssaków. Do grupy transferyn zalicza się ponadto laktoferynę mleka, owotransferynę białka jaja i metalotransferynę, będącą składnikiem błon plazmatycznych komórek barwnikowych. Transferyny (oprócz laktoferyny) wykazują właściwości kwasowe. Wartość pH waha się w granicach 5,6-5,8 i jest specyficzna gatunkowo. Dla laktoferyny pH wynosi 8,7. TRF jest wytwarzana głównie w hepatocytach, a jej stężenie w surowicy człowieka wynosi 2,5 mg/ml (35 μmol/l) z czego tylko 30% występuje w formie związanej z jonami żelaza [2].

Cząsteczka transferyny zbudowana jest z pojedynczego, glikozylowanego łańcucha polipeptydowego o długości około 700 aminokwasów i masie cząsteczkowej około 80 kDa. Dwie bardzo do siebie podobne pod względem rozmiaru domeny łańcucha nazywane podjednostkami N- i C-końcową, połączone są za pomocą krótkiego peptydu. Każda z domen zbudowana jest z układających się naprzemiennie fragmentów o strukturze β oraz fragmentów α helikalnych i zawiera jedno miejsce wiążące atom żelaza. Taka budowa pozwala na przeniesienie przez jedną cząsteczkę transferyny dwóch atomów żelaza (Rys. 1) [2].

Miejsca wiążące atom żelaza w obu domenach są bardzo podobnie zbudowane. W przyłączaniu Fe(III) do domeny C-końcowej biorą udział atomy tlenu Tyr188, Tyr95, Asp63, atom azotu His249 oraz dwa atomy tlenu pochodzące od jonu CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Do domeny N-końcowej natomiast jony żelaza zostają przyłączone za pomocą Tyr517, Tyr426, Asp392, His585 oraz jonu CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (Rys. 2).





Rysunek 1. Model cząsteczki holotransferyny człowieka. Rysunek przedrukowano z: [http://srs.dl.ac.uk/arch/DALAI/BIOLOGICAL/fe2hst\\_big.gif](http://srs.dl.ac.uk/arch/DALAI/BIOLOGICAL/fe2hst_big.gif), za zgodą autora dr Manolis Pantos, Science Division Daresbury Laboratory, Keckwick Lane, Warrington WA4 4AD, UK

Transferyna podczas wiązania i uwalniania jonów żelaza ulega cyklicznym zmianom konformacyjnym, umożliwiając tym samym rozpoznanie białka przez receptor znajdujący się w błonach plazmatycznych komórek.

W pH fizjologicznym (pH=7,4) wiązanie jonów żelaza przez transferynę jest bardzo trwałe zaś odłączanie Fe(III) od białka następuje przy wartości pH niższej od 6,5. Ponadto proces uwalniania jonów żelaza jest zależny od wielu czynników fizykochemicznych takich jak temperatura, obecność chelatorów i jonów (np. Cl) [3].

W surowicy i innych płynach pozakomórkowych TRF występuje w kilku formach: niezwiązanej z atomami żelaza apotransferyny (apoTRF), z jednym atomem żelaza oraz w formie holotransferyny (holoTRF) tj. z dwoma atomami żelaza. Udział poszczególnych form w całej puli transferyny w osoczu zależy od stężenia jonów żelaza i białka.

## RECEPTORY TRANSFERYNY

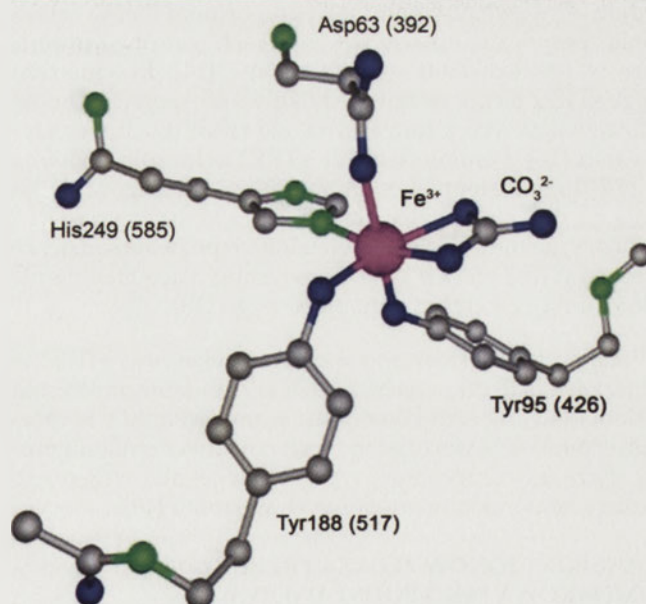
Struktura receptora transferyny (sTRF, ang. *soluble transferrin receptor*) po raz pierwszy została opisana przez McClelland i Schneider w 1984 roku. Ilość sTRF na powierzchni błon plazmatycznych jest uzależniona od zapotrzebowania komórek na jony żelaza. Obecność receptora zaobserwowano na powierzchni wszystkich jądrzastych komórek strunowców m. in.: hepatocytów, tyreocytów, komórek nabłonkowych jelit, monocytów, neuronów. Komórki szeregu erytroblastycznego, a także pobudzone, intensywnie dzielące się i nowotworowe komórki posiadają wielokrotnie wyższą liczbę receptorów transferyny (150 000-1 000 000), co związane jest z ich zwiększonym zapotrzebowaniem na jony żelaza [4]. Natomiast poziom receptorów w komórkach nieproliferujących pozostaje prawie niewykrywalny [5]. Wyróżnia się dwa typy receptorów opisywanych jako sTRF1 i sTRF2 różniących się stopniem powinowactwa do transferyny. Receptor typu drugiego ma około 25 razy mniejsze powinowactwo do TRF niż sTRF1.

Receptor sTRF1 komórek człowieka jest transbłonowym dimerem glikoproteinowym składającym się z dwóch identycznych monomerów o masie około 90 kDa każdy. Łańcuchy białkowe są glikozylowane i połączone ze sobą mostkiem disiarczkowym w pozycji Cys 89 i Cys 98. Fragment

cytoplazmatyczny łańcucha liczy 67 aminokwasów (1-67), część transbłonowa 20 (68-88) zaś ektodomenę C-końcową budują 673 aminokwasy (89-760) [6]. Ektodomena C-końcowa zawiera ponadto miejsce przyłączenia transferyny, które jest wrażliwe na trawienie tripsyną (Rys.3).

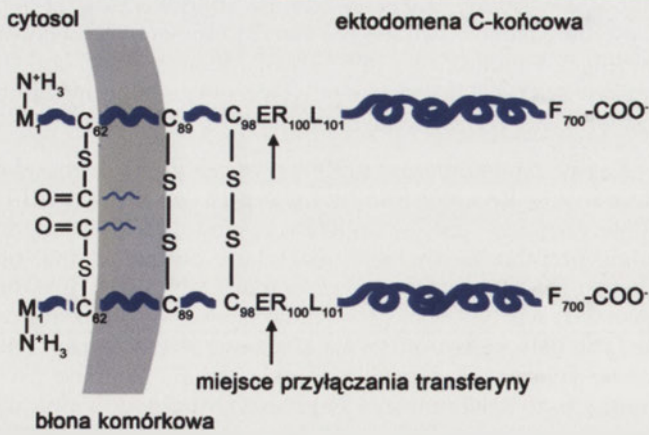
Każdy z monomerów sTRF przyłącza jedną cząsteczkę transferyny. Receptor transferyny typu pierwszego (sTRF1) syntetyzowany jest w retikulum endoplazmatycznym, gdzie przechodzi również glikozylację potranslacyjną [6]. Domena N-końcowa posiada trzy miejsca N-glikozylowane (Asn 251, Asn 317, Asn 727) i jedno miejsce O-glikozylowane (Thr 104), które odgrywają kluczową rolę w transporcie jonów żelaza związanych z transferyną [7]. Mutacje prowadzące do zahamowania N-glikozylacji powodują utratę funkcji receptora sTRF1. Podobnie brak glikozylacji Thr104 powoduje zahamowanie zdolności transportowych receptora i przyczynia się do enzymatycznego usunięcia domeny C-końcowej [8]. Badania krystalograficzne wykazały, że kształt ektodomeny C-końcowej receptora sTRF1 człowieka przypomina motyla. Ponadto dowiedziono, że ektodomena sTRF1 składa się z trzech strukturalnie różnych domen: proksymalnej, zapewniającej stabilizację receptora na błonie komórkowej, helikalnej ułatwiającej połączenie z drugim monomerem, oraz apikalnej (Rys. 4) [9].

sTRF1 wykazuje bardzo wysokie powinowactwo do holotransferyny [10]. Małe zmiany strukturalne w budowie receptora mogą drastycznie obniżyć jego powinowactwo do transferyny jednak zawsze białko przenoszące dwa atomy żelaza łączy się znacznie łatwiej z receptorem w porównaniu z TRF z jednym atomem żelaza lub apotransferyną. Nie jest do końca wyjaśnione w jaki sposób TRF wiąże się z receptorem [11]. Sugerowano, że tylko domena apikalna odpowiedzialna jest za rozpoznanie i w konsekwencji wiązanie TRF do receptora [2]. Jednakże badania grupy Masona [12] wykazały, że obecność obu domen helikalnej i



Rysunek 2. Budowa miejsca wiążącego jony żelaza w domenach C- i N-końcowej w cząsteczce transferyny człowieka. W nawiasach zaznaczono aminokwasy biorące udział w przyłączaniu jonów żelaza do domeny N-końcowej. Rysunek przedrukowano z: [http://userpage.chemie.fu-berlin.de/~abram/e\\_learning/html/bio/a\\_5b.htm](http://userpage.chemie.fu-berlin.de/~abram/e_learning/html/bio/a_5b.htm), za zgodą autora prof. Ulricha Abrama, Institut für Chemie Anorganische und Analytische Chemie, Freie Universität Berlin, Fabeckstraße 34-36, D-14195 Berlin





Rysunek 3. Homodimer receptora transferyny. Użyte jednoliterowe symbole aminokwasów: C-cysteina, E-kwas glutaminowy, F-fenylalanina, L-leucyna, M-metionina, R-arginina.

apikalnej jest niezbędna do prawidłowego rozpoznania cząsteczki TRF przez receptor i jej transportu do wnętrza komórki. Cząsteczka transferyny jest wiązana przed apikalną część ektodomeny C-końcowej, jednakże do prawidłowego przebiegu procesu potrzebne jest również oddziaływanie z fragmentem helikalnym [9, 13].

Receptor sTRF2 został sklonowany w 1999 r. [14]. Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała w 45% identyczność i w 66% podobieństwo do receptora typu pierwszego [14]. sTRF2 występuje na powierzchni błon plazmatycznych komórek wątroby i pełni taką samą funkcję jak receptor typu pierwszego, jednakże powinowactwo sTRF2 do holotransferyny jest 25 razy mniejsze w porównaniu z sTRF1 [15]. Ekspresja sTRF2 nie zależy od modyfikacji potranskrypcyjnych, ale od fazy cyklu komórkowego i szybkości proliferacji komórki [15]. Cel istnienia dwóch typów receptorów transferyny nie jest jeszcze wyjaśniony [11]. Sugeruje się, że receptory sTRF2, których ekspresja nie zależy bezpośrednio od wewnątrzkomórkowego poziomu jonów żelaza pełnią specyficzną funkcję w komórkach wątroby i uczestniczą w różnicowaniu się erytrocytów [14]. Przypuszcza się, że sTRF2 bierze udział nie tylko w transporcie atomów żelaza związanych z transferyną, ale także w ich magazynowaniu [16]. Pomimo tego, że sTRF2 pełni rolę podobną do sTRF1 nie zastępuje receptora typu pierwszego [17]. Badania na myszach pozbawionych genu kodującego sTRF1 wykazały, że mutacja taka jest letalna, co pozwala sądzić, że receptor sTRF2 nie jest w stanie wystarczająco efektywnie pełnić funkcji receptora typu pierwszego [18].

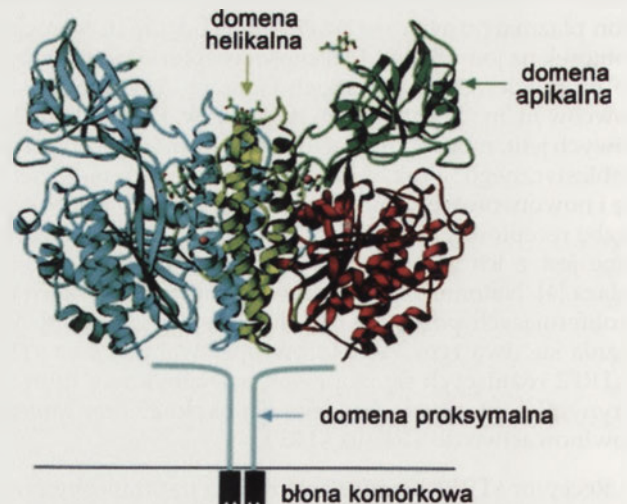
Ponadto zaobserwowano wzmożoną ekspresję sTRF2 w komórkach białaczkowych szeregu erytroidalnego. Wysoki poziom sTRF2 w tych komórkach w porównaniu z komórkami szpiku nie wykazującego cech nowotworzenia sugerować może użycie receptora typu drugiego jako wczesnego markera komórek nowotworowych w szpiku [19].

#### TRANSPORT JONÓW ŻELAZA PRZEZ BŁONĘ KOMÓRKOWĄ JAKO PODSTAWOWA FUNKCJA TRANSFERYNY

Podstawową funkcją transferyny jest transport jonów żelaza do wnętrza komórki. Jak wiadomo jest to pierwiastek odgrywający katalityczną rolę w wielu procesach fizjologicznych zachodzących w organizmach żywych. Wytwa-

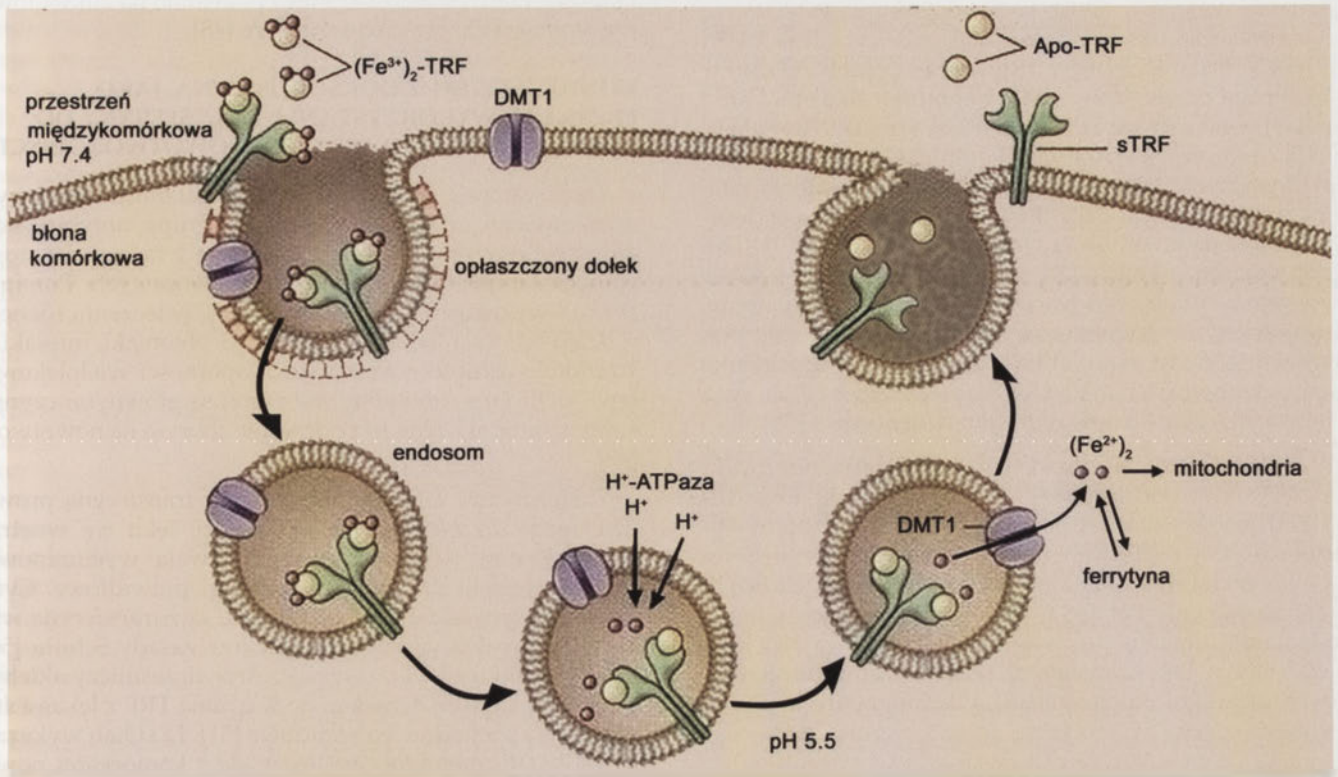
ranie energii, synteza hemu, proliferacja komórek i wiele procesów enzymatycznych jest bezpośrednio uzależnionych od poziomu jonów żelaza. Także proces replikacji DNA zależy bezpośrednio od obecności jonów Fe(III), które są kofaktorem reduktazy rybonukleotydu [20]. Z tego względu bardzo ważna jest prawidłowa regulacja poziomu jonów żelaza i jego metabolizmu.

Transport jonów żelaza odbywa się głównie na drodze endocytozy zależnej od receptorów transferyny. Transferyna z dwoma atomami Fe(III), czyli holotransferyna podąża do opłaszczonego klatryną dołka, w którym znajduje się receptor transferyny (Rys. 5). sTRF wykazuje największe powinowactwo do transferyny w pH 7,4. Ostatnio wykazano, że białko HFE - należące do klasy I głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC) - znacznie ułatwia to wiązanie. HFE, mimo swojej przynależności do grupy białek MHC, nie ma zdolności przyłączania peptydów i nie bierze udziału w procesach immunologicznych. 343 aminokwasy białka HFE tworzą część transbłonową, krótki fragment cytoplazmatyczny oraz trzy domeny pozakomórkowe:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$  połączone niekowalencyjnie z lekkim łańcuchem  $\beta$ -2 mikroglobuliny. Białko HFE tworzy z sTRF oraz przyłączoną do niego transferyną kompleks (jedna cząsteczka TRF, homodimer receptora i białko HFE) [21], który umożliwia receptorowi zmiany konformacyjne podczas transportu [22]. Mutacja genu sTRF odpowiedzialnego za wytworzenie miejsca wiązania białka HFE powoduje znaczne obniżenie wydajności endocytozy. Spowodowane jest to niemożnością przyłączenia się białka HFE do kompleksu receptor-transferyna [23]. Również mutacja w sekwencji aminokwasowej samego białka HFE powoduje zaburzenia w transporcie jonów żelaza [24]. Po utworzeniu kompleksu sTRF-TRF-HFE zostaje on otoczony błoną komórkową i od tej chwili nosi nazwę endosomu (Rys. 5). Podczas procesu nazywanego dojrzewaniem, błona endosomu, dzięki obecnej w niej pompie protonowej zależnej od ATP, transportuje do jego wnętrza protony doprowadzając pH do wartości około 5,5. W pH kwaśnym powinowactwo TRF do jonów Fe(III) zmniejsza się około milion razy, co sprzyja uwolnieniu jonów żelaza od transferyny, która pozostaje nadal związana z receptorem [25]. Dokładny mechanizm uwolnienia Fe(III) od transfery-



Rysunek 4. Struktura ektodomeny receptora transferyny. Rysunek przedrukowano z: Lawrence, CM, Ray S, Babyonyshev M, Gallussem R, Borhani DW, Harrison SC (1999) Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor. Science 286: 779-782, za zgodą autorów i wydawnictwa Science.





**Rysunek 5.** Holotransferyna łączy się z sTRF znajdującym się w opłaszczonym klatryną dołku. Powstaje endosom.  $H^+$ -ATPaza transportuje do jego wnętrza protony doprowadzając pH do wartości około 5.5. Następuje uwolnienie  $Fe^{3+}$  od transferyny i jego enzymatyczna redukcja do  $Fe^{2+}$ . Transporter DMT1 przenosi jony  $Fe^{2+}$  z endosomu do cytosolu. Po uwolnieniu jonów żelaza pęcherzyk zawierający kompleks sTRF-apoTRF przemieszcza się w kierunku błony komórkowej i ulega fuzji. W pH około 7.4 apotransferyna ma niewielkie powinowactwo do receptora i zostaje uwolniona do przestrzeni międzykomórkowych. Rysunek przedrukowano z: [http://walz.med.harvard.edu/Research/Iron\\_Transport/TfR-Tf-Figure-1.gif](http://walz.med.harvard.edu/Research/Iron_Transport/TfR-Tf-Figure-1.gif), za zgodą dr Thomasa Walza, Department of Cell Biology, Harvard Medical School, 240 Longwood Avenue, Boston, MA 02115

ny nie jest do końca poznany, ale sugeruje się, że w niskim pH zachodzą zmiany konformacyjne w domenie apikalnej i helikalnej sTRF, które oddziałują na TRF tak, że jej konformacja zmienia się z zamkniętej na otwartą z równoczesnym uwolnieniem dwóch atomów żelaza [9]. Uwolnione  $Fe(III)$  zostaje zredukowane enzymatycznie w kwaśnym środowisku endosomu do  $Fe(II)$  prawdopodobnie przy udziale oksydoreduktazy [26]. Do momentu odkrycia transportera DMT1 (ang. *divalent metal transporter*) [27] sposób, w jaki jony żelaza są transportowane z endosomu do cytosolu był nieznany. Transporter DMT1 (Rys. 5) przenosi jony  $Fe(II)$  z endosomu do cytosolu na zasadzie symportu z protonami [28]. Jony  $Fe(II)$  zostają zmagazynowane w ferrytynie. Po uwolnieniu jonów żelaza pęcherzyk zawierający kompleks sTRF-apoTRF przemieszcza się w kierunku błony komórkowej i ulega fuzji. W pH fizjologicznym apotransferyna ma niewielkie powinowactwo do receptora i zostaje uwolniona do przestrzeni międzykomórkowych [29], podczas gdy receptor pozostaje na powierzchni błony komórkowej lub w opłaszczonych dołkach. Cykl trwa około 16 min z czego 4 min przypadają na wiązanie transferyny, 5 min na transport endosomalny, 7 min na powrót nośnika i apoTRF na powierzchnię błony plazmatycznej [30]. Receptor sTRF jest używany średnio w 100-200 cyklach [31].

## TRANSFERYNA JAKO PRZENOŚNIK JONÓW

Ponieważ tylko 30% całej puli TRF uczestniczy w przeniesieniu jonów żelaza sugeruje się, że białko może brać udział także w przenoszeniu innych jonów trójwartościowych. Obecnie wiadomo, że aż 30 różnych jonów jest w stanie łą-

czyć się z transferyną [10]. Do najbardziej znanych połączeń jon-TRF należy silne połączenie  $Bi(III)-TRF$ , przy którym dochodzi do zmiany konformacji transferyny z otwartej na zamkniętą, co jest warunkiem rozpoznania takiego połączenia przez receptor, a w konsekwencji transportu do wnętrza komórki [32]. Badania sugerują, że  $Bi(III)-TRF$  jest transportowana na zasadzie endocytozy, w taki sam sposób jak jony żelaza [33]. Oprócz wykorzystania  $Bi(III)-TRF$  w terapii przeciwnowotworowej [32, 34], związek ten właśnie dzięki swoistemu rodzajowi transportu wykazywać może działanie bakteriobójcze.  $Bi(III)$  konkuruje z jonami żelaza o miejsca przyłączenia do TRF i łączy się z nią preferencyjnie pozbawiając komórki bakteryjne jonów żelaza niezbędnych do ich szybkiego wzrostu [35].

Wysoką aktywność przeciwnowotworową, skierowaną głównie przeciwko komórkom budującym ogniska przerzutów, wykazują również kompleksy rutenu z aminami lub DMSO. [36]. Okazało się, że kompleksy te są transportowane do wnętrza komórek w połączeniu z TRF na drodze typowej endocytozy. Podanie chorem  $Ru(III)-TRF$  powoduje redukcję liczby komórek nowotworowych guzów litych [34]. Proces ten jest bezpośrednio związany z wykorzystaniem nadekspresji sTRF w komórkach nowotworowych do podania do ich wnętrza większej ilości cytostatyku. Kompleks ruten-transferyna wykazuje ponadto aktywność przeciwnowotworową skierowaną przeciwko komórkom nowotworowym jelita człowieka [2].  $Ru(III)-TRF$  wykazuje dużo wyższą skuteczność niż koniugat  $Ru$ -albumina [36].



Badania wykazują także, że kompleksy Ti(IV)-TRF, są wysoce toksyczne dla komórek białaczkowych linii P388 i L1210 [37]. Tytan łączy się z TRF w miejsce jonu żelaza i w takiej formie przenoszony jest do komórki. Badania Guo i wsp. [38] wykazały, że Ti(IV) nie wiąże się z DNA w pH fizjologicznym, ale tworzy trwałe kompleksy z nukleotydami w pH kwaśnym. Autorzy sugerują, że do uwolnienia tytanu z kompleksu dochodzi w kwaśnym środowisku endosomów [38]. Ponadto wyższa szybkość transportu Ti(IV)-TRF w porównaniu z Fe(III)-TRF może powodować niedobór jonów żelaza w komórkach nowotworowych. Jak wiadomo, cytosol komórek nowotworowych charakteryzuje się niższymi wartościami pH, co dodatkowo ułatwia uwalnianie tytanu z kompleksu Ti(IV)-TRF i łączenie się z DNA, oraz zwiększa jego skuteczność przeciwnowotworową [39].

W radiodiagnostyce wykorzystywany jest również In(III), który wiąże się z transferyną silniej w porównaniu do Ga(III) [11]. Podając pacjentom roztwory indu o pH kwaśnym wykazano, że 95% In(III) preferencyjnie łączy się z transferyną [40] z podobnym powinowactwem jak jony żelaza [2]. Z kolei zastąpienie Tyr 188 w cząsteczce transferyny przez fenyloalaninę umożliwiło zwiększenie powinowactwa białka do miedzi [3], katalizującej reakcje wolnorodnikowe, których produkty mogą uszkadzać komponenty komórek nowotworowych.

#### KONIUGATY TRANSFERINY A TERAPIA GENOWA

Sukcesy terapii genowej skłaniają naukowców do poszukiwania nowych form przenośników genów do komórek. Często wektory wirusowe, jak np. adenowirusowe, charakteryzują się wysoką immunogennością dla komórek gospodarza wywołującą u niego odpowiedź immunologiczną [41]. Jako alternatywę dla tego rodzaju wektorów stosuje się często nośniki niewirusowe. Niestety charakteryzują się one niskim stopniem przenikalności przez błony komórkowe [11]. Ważne miejsce wśród nośników DNA może zatem zająć transferyna i transport kwasów nukleinowych z jej udziałem do komórek na drodze endocytozy.

Do najbardziej znanych połączeń należy koniugat TRF z DNA i polilizyną, która nadaje łańcuchowi kwasu nukleinowego dodatni ładunek elektryczny w pH fizjologicznym i ułatwia jego przyłączenie do transferyny [42]. Takie koniugaty wykorzystywane były do transportu DNA do wnętrza różnego rodzaju komórek; białaczkowych K562 [43], HeLa [44], szeregu hematopoetycznego [45] oraz czerniaka [46]. Głównym problemem zastosowania TRF jako przenośników DNA jest zapewnienie dobrego, skutecznego uwalniania genów we wnętrzu endosomu. Dodanie chlorochiny podczas procedury transfekcji zapobiega nadmiernemu spadkowi pH w endosomie i przyspiesza transfer DNA do jądra [45]. Dodanie glicerolu osłabia błonę endosomu umożliwiając tym samym łatwiejsze przenikanie polilizyny przez błonę pęcherzyka [47].

Wiadomo jest, że zamknięcie DNA w liposomach było stosowane jako jeden ze sposobów przenoszenia go do komórki [2]. Jednakże zastosowanie przenośników liposomalnych okazywało się często nieskuteczne z powodu oddziaływań z substancjami zawartymi w osoczu krwi, które opóźniały transport DNA do wnętrza komórek. Dopiero dołączenie transferyny do kompleksu liposom-DNA podniosło znacznie wydajność procesów transportu DNA do

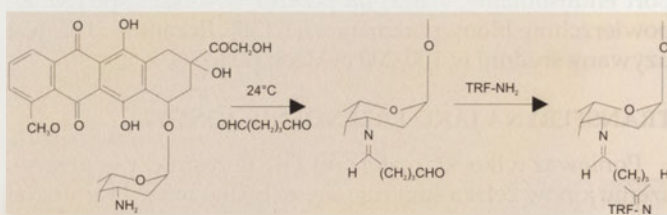
komórek HeLa, K562, raka płuc i pozwoliło na zlikwidowanie hamujących właściwości osocza [48].

#### KONIUGATY TRF Z DOKSORUBICYNĄ, JAKO PRZYKŁAD WYKORZYSTANIA TRANSFERINY DO TRANSPORTU LEKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH

Duże nadzieje związane są z koniugatami transferyny z doksorubicyną (DOX), należąca do grupy antybiotyków antracyklinowych. Lek ten jest jednym z najczęściej stosowanych terapeutów przeciwnowotworowych. Pomimo, iż DOX wykazuje wysoką efektywność w leczeniu różnego rodzaju schorzeń takich jak białaczki, chłoniaki, mięsaki to kardiotoxyczność oraz zjawisko oporności wielolekowej, tzw. MDR (ang. *multidrug resistance*) są głównymi czynnikami ograniczającymi jej podawanie chorym na nowotwory [49].

Zastosowanie DOX w połączeniu z transferyną prowadzi do zwiększenia akumulacji leku we wnętrzu komórek nowotworowych oraz pozwala wyeliminować szkodliwy efekt działania na komórki prawidłowe. Cytostatyki, w tym także DOX, połączone są z transferyną wiązaniem kowalencyjnym o charakterze zasady Schiffa [50]. W tworzeniu tego wiązania najczęściej uczestniczy aldehyd glutarowy (Rys. 6). Czasami do wiązania TRF z lekami stosowane są pochodne maleimidowe [51]. Li i Qian wykazali, że DOX-TRF preferencyjnie łączy się z komórkami nowotworowymi i wykazuje efekt toksyczny, zaś leukocyty prawidłowe pozostają nienaruszone [2]. Obiecujące wyniki dla ewentualnego zastosowania klinicznego DOX-TRF dostarczyły badania Kratza i wsp. [51]. Wykazały one możliwość bezpiecznego podania koniugatu myszom w dawce prawie trzykrotnie przekraczającej stężenie wolnego leku. Wyniki te wskazują na znaczną redukcję efektów ubocznych w komórkach po podaniu koniugatu w porównaniu z zastosowaniem wolnej DOX. Dotychczas wiadomo, że koniugaty DOX-TRF są znacznie bardziej cytotoxyczne dla komórek różnorodnych linii aniżeli wolny lek [50-54]. Inkubacja 16-18 godzinna z 0,05  $\mu\text{mol/l}$  DOX-TRF powodowała śmierć 37% komórek, podczas gdy efekt uszkadzający wolnej doksorubicyny w tej samej dawce dotyczył tylko 5% populacji [50]. Eksperymenty *in vivo* przeprowadzane na myszach z wrodzonym nowotworem wykazały znaczące wydłużenie życia osobników, którym podano DOX-TRF w porównaniu do tych przyjmujących tylko lek wolny (wydłużenie życia o 69%-DOX-TRF i o 37%-DOX) [50].

Wykazano również, że koniugat DOX-TRF może skutecznie przełamywać zjawisko oporności wielolekowej [11]. Badania grupy Singha [50] wskazują, że koniugat DOX-TRF jest około 4-5 razy bardziej cytotoxyczny dla komórek linii HL60 i Hep2 i aż 10 razy w stosunku do komórek opornych na doksorubicynę. Dawka IC50 DOX-TRF dla innych komó-



Rysunek 6. Wiązanie doksorubicyny z transferyną przy udziale aldehydu glutarowego.



rek opornych na wolny lek (L292) była 130 razy niższa niż dawka doksorubicyny potrzebna dla wywołania tego samego efektu cytotoksycznego [55]. Dokonano również porównania toksyczności obu form leku wobec komórek linii KB-3-1 i odpornej na doksorubicynę linii KB [52]. Komórki KB charakteryzują się zwiększoną aktywnością kinazy białkowej typu C [56]. W tych badaniach koniugat DOX-TRF okazał się również bardziej skuteczny. Dawka 0,006  $\mu\text{mol/l}$  i 0,028  $\mu\text{mol/l}$  powodowała śmierć 50% populacji komórek linii wrażliwej i odpornej, podczas gdy do uzyskania tego samego efektu stosowane stężenie doksorubicyny wynosiło odpowiednio 0,03  $\mu\text{mol/l}$  dla KB-3-1 i 0,12  $\mu\text{mol/l}$  dla linii odpornej. Ponadto dawki IC<sub>50</sub> 0,025-0,02  $\mu\text{mol/l}$  DOX-TRF skutecznie niszczy komórki nowotworowe linii KB-C1 i KB-V1, charakteryzujące się bardzo wysoką opornością na doksorubicynę. Zastosowanie nawet 1  $\mu\text{mol/l}$  DOX nie wywierało żadnego toksycznego wpływu na te komórki [52]. Te rezultaty dowodzą jak bardzo skuteczny może okazać się koniugat DOX-TRF w przełamaniu oporności wielolekowej. Mechanizm działania koniugatu DOX-TRF nie jest do końca poznany. Wiadomo jest, że łączy się on zarówno z wyizolowanymi receptorami TRF [57], jak i tymi obecnymi na powierzchni błon plazmatycznych [58] z podobnym powinowactwem jak TRF oraz nie wpływa na transport jonów żelaza.

Efekt cytostatyczny wolnej doksorubicyny przejawia się głównie w jej zdolności do wbudowywania się pomiędzy zasady helisy DNA lub wytwarzania reaktywnych form tlenu podczas cyklu redoks. Oporność na DOX przejawia się często nadekspresją białek z rodziny MDR, które na drodze transportu aktywnego usuwają lek z komórki. Wzmoczona aktywność glikoproteiny P u pacjentów poddanych chemioterapii stanowi bardzo istotny problem kliniczny [49]. Niektórzy badacze uważają, że w przeciwieństwie do wolnej DOX, mechanizm działania DOX-TRF nie polega na wbudowywaniu się między zasady DNA [52,55,58,59], ale opiera się głównie na oddziaływaniu z błoną komórkową. Badania Lai i wsp. [55] wykonane na komórkach opornych na DOX; mysiej białaczki (L929) oraz raka sutka człowieka (MCF-7) wykazały, iż po 3 godzinnej inkubacji w 37°C wolny lek obecny był w błonie plazmatycznej, cytoplazmie oraz jądrze komórkowym, podczas gdy koniugat DOX-TRF wykryto tylko w cytosolu. Stwierdzono przy tym, że DOX połączona z TRF, pomimo iż nie wnika do jądra komórkowego, zachowuje zdolność do produkcji wolnych rodników [55]. Indukowane przez koniugat wolne rodniki uszkadzają głównie błonę komórkową, ale nie jest wykluczone, że część z nich dociera do jądra i oddziałuje z DNA. Badania Kotamraju i wsp. [60] wykazały, że koniugat DOX-TRF w komórkach nabłonkowych indukuje apoptozę. Proces ten związany jest z zablokowaniem przez koniugat receptorów transferyny, oraz redukcją transportu jonów żelaza.

Jednym z głównych problemów terapii doksorubicyną jest jej silna kardiotoxyczność ograniczająca dawkę leku do 550 mg/m<sup>2</sup>. Uważa się, że kardiotoxyczność DOX zależy w głównej mierze od indukcji apoptozy [61]. Proces ten może zależeć od kilku różnych czynników: cyklu redoks DOX, aktywacji białka p53 przez O<sub>2</sub><sup>•-</sup> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aktywacji genu bax [62]. Zastosowanie doksorubicyny w połączeniu z transferyną budzi nadzieję na skuteczną redukcję kardiotoxyczności, m. in. przez zmniejszenie dawki DOX (dzięki transportowi

z pomocą receptorów transferyny), prowadzące do zmniejszenia udziału wolnej DOX w cyklu redoks [63].

## KONIUGATY TRANSFERYNY Z INNYMI SUBSTANCJAMI O DZIAŁANIU PRZECIWNOWOTWOROWYM

Zastosowanie TRF w kombinacji z interleukiną 2 może indukować śmierć komórek nowotworowych oraz proliferację komórek NK skierowanych przeciwko komórkom nowotworowym [64]. Połączenie natomiast transferyny z lekiem artemisinin skutkuje przełamaniem oporności na chemioterapeutyki w komórkach drobnokomórkowego raka płuc [65]. Już nanomolarne stężenie kompleksu artemisinin-TRF jest cytotoksyczne dla komórek nowotworowych, nie tylko raka drobnokomórkowego płuc [65], ale również dla komórek linii nowotworowych z nadekspresją receptorów sTRF CCRF-CEM i U373 [66]. Autorzy stwierdzili, że komórki białaczkowe CCRF-CEM posiadają o 95% więcej receptorów TRF niż komórki macierzyste dla tej linii, tj. monocytu.

Chlorambucil należy do grupy cytostatyków skutecznych w leczeniu białaczek limfatycznych, chłoniaków, zaawansowanych postaci raka jajnika i sutka. Jednakże jego zastosowanie jest często ograniczone ze względu na występujące podczas chemioterapii efekty uboczne. Połączenie chlorambucilu z TRF i podanie go w takiej formie do komórek raka sutka linii MCF7 lub komórek białaczkowych linii MOLT4 spowodowało 18-krotne obniżenie parametru IC<sub>50</sub> dla chlorambucilu. Badania na myszach potwierdziły, że taka forma chlorambucilu jest dużo lepiej wchłaniana przez komórki nowotworowe i działa na nie bardziej cytotoksycznie [67].

Zastosowanie koniugatu mitomycyny, cytostatyku tworzącego wiązania krzyżowe z DNA, z transferyną wykazywało efekt toksyczny przeciwko komórkom raka wątroby HepG2, mięsaka oraz białaczki promielocytarnej HL60. W przypadku HepG2 i HL60 obserwowano zahamowanie proliferacji *in vitro* [68, 69]. Podanie daunorubicyny połączonej z transferyną wykazało 10-krotnie większy efekt cytotoksyczny dla komórek drobnokomórkowego raka płuc NCI-SCCL w porównaniu w wolną doksorubicyną [70]. Również cisplatyna zastosowana w formie kompleksu z transferyną i polietylenoglikolem charakteryzowała się dużo wyższą skutecznością w komórkach MKN45P (wrodzony nowotwór myszy) i znacząco wydłużała długość życia osobników z tym typem nowotworu [71]. Sugeruje się, że tego typu koniugaty zapobiegają wychwytywaniu liposomów przez układ retikuloendotelialny zapewniając im dłuższy czas cyrkulacji w krwiobiegu [71].

## PODSUMOWANIE

Koniugaty transferyny, jak wynika z powyższych badań wykorzystywane są do przenoszenia jonów, leków oraz DNA. Szczególnie obiecujące wydają się badania dotyczące cytostatyków. Duża liczba receptorów transferyny zlokalizowana na powierzchni komórek nowotworowych ułatwia gromadzenie leków w tych komórkach. Zmniejsza się tym samym ryzyko wystąpienia skutków ubocznych, które zawsze towarzyszą chemioterapii.

Wydaje się więc, że koniugaty transferyny mogą być kolejnym ważnym etapem w walce z nowotworami.



## PIŚMIENNICTWO

1. von Bonsdorff L, Tolo H, Lindeberg E, Nyman T, Harju A, Parkkinen J (2001) Development of a pharmaceutical apotransferrin product for iron binding therapy. *Biologicals* 29: 27-37
2. Li H, Qian ZM (2002) Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery. *Med Res Rev* 22: 225-250
3. He QY, Mason AB, Woodworth RC, Tam BM, MacGillivray RT, Grady JK, Chasteen ND (1997) Inequivalence of the two tyrosine ligands in the N-lobe of human serum transferrin. *Biochemistry* 36: 14853-14860
4. Galbraith GM, Galbraith RM, Faulk WP (1980) Transferrin binding by human lymphoblastoid cell lines and other transformed cells. *Cell Immunol* 49: 215-222
5. Inoue T, Cavanaugh PG, Steck PA, Brunner N, Nicolson GL (1993) Differences in transferrin response and numbers of transferrin receptors in rat and human mammary carcinoma lines of different metastatic potentials. *J Cell Physiol* 156: 212-217
6. Schneider C, Owen MJ, Banville D, Williams JG (1984) Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature* 311: 675-678
7. Hayes GR, Enns CA, Lucas JJ (1992) Identification of the O-linked glycosylation site of the human transferrin receptor. *Glycobiology* 2: 355-359
8. Rutledge EA, Enns CA (1996) Cleavage of the transferrin receptor is influenced by the composition of the O-linked carbohydrate at position 104. *J Cell Physiol* 168: 284-293
9. Lawrence CM, Ray S, Babyonyshev M, Galluser R, Borhani DW, Harrison SC (1999) Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor. *Science* 286: 779-782
10. Sun H, Li H, Sadler PJ (1999) Transferrin as a metal ion mediator. *Chem Rev* 99: 2817-2842
11. Qian ZM, Li H, Sun H, Ho K (2002) Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmaco Rev* 54: 561-587
12. Mason AB, Tam BM, Woodworth RC, Oliver RW, Green BN, Lin LN, Brandts JF, Savage KJ, Lineback JA, MacGillivray RT (1997) Receptor recognition sites reside in both lobes of human serum transferrin. *Biochem J* 326: 77-85
13. Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz T (2004) Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* 116: 565-576
14. Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, Koeffler HP (1999) Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem* 274: 20826-20832
15. West AP Jr, Bennett MJ, Sellers VM, Andrews NC, Enns CA, Bjorkman PJ (2000) Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. *J Biol Chem* 275: 38135-38138
16. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S (2001) Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8780-8785
17. Kawabata H, Tong X, Kawanami T, Wano Y, Hirose Y, Sugai S, Koeffler HP (2004) Analyses for binding of the transferrin family of proteins to the transferrin receptor 2. *Br J Haematol* 127: 464-473
18. Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC (1999) Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet* 21: 396-399
19. Kawabata H, Germain RS, Ikezoe T, Tong X, Green EM, Gombart AF, Koeffler HP (2001) Regulation of expression of murine transferrin receptor 2. *Blood* 98: 1949-1954
20. Gomme PT, McCann KB, Bertolini J (2005) Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today* 10: 267-273
21. Lebron JA, West AP Jr, Bjorkman PJ (1999) The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *J Mol Biol* 294: 239-245
22. Bennett MJ, Lebron JA, Bjorkman PJ (2000) Crystal structure of the hereditary hemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature* 403: 46-53
23. West AP Jr, Giannetti AM, Herr AB, Bennett MJ, Nangiana JS, Pierce JR, Weiner LP, Snow PM, Bjorkman PJ (2001) Mutational analysis of the transferrin receptor reveals overlapping HFE and transferrin binding sites. *J Mol Biol* 313: 385-397
24. Lebron JA, Bennett MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, Mintier GA, Feder JN, Bjorkman PJ (1998) Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* 93: 111-123
25. Bali PK, Zak O, Aisen P (1991) A new role for the transferrin receptor in the release of iron from transferrin. *Biochemistry* 30: 324-328
26. Nunez MT, Gaete V, Watkins JA, Glass J (1990) Mobilization of iron from endocytic vesicles. The effects of acidification and reduction. *J Biol Chem* 265: 6688-6692
27. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Borron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388: 482-488
28. Tabuchi M, Yoshimori T, Yamaguchi K, Yoshida T, Kishi F (2000) Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEP-2 cells. *J Biol Chem* 275: 22220-22228
29. Morgan EH (2001) Mechanisms of iron transport into rat erythroid cells. *J Cell Physiol* 186: 193-200
30. Aisen P (2004) Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2137-2143
31. Rutledge EA, Gaston I, Root BJ, McGraw TE, Enns CA (1998) The transferrin receptor cytoplasmic domain determines its rate of transport through the biosynthetic pathway and its susceptibility to cleavage early in the pathway. *J Biol Chem* 273: 12169-12175
32. Sun H, Li H, Mason AB, Woodworth RC, Sadler PJ (2001) Competitive binding of bismuth to transferrin and albumin in aqueous solution and in blood plasma. *J Biol Chem* 276: 8829-8835
33. Zhang L, Szeto KY, Wong WB, Loh TT, Sadler PJ, Sun H (2001) Interactions of bismuth with human lactoferrin and recognition of the Bi(III)-lactoferrin complex by intestinal cells. *Biochemistry* 40: 13281-13287
34. Ando A, Ando I, Hiraki T, Hisada K (1988) Distribution of <sup>103</sup>Ru-chloride in tumor-bearing animals and the mechanism for accumulation in tumor and liver. *Int J Rad Appl Instrum B* 15: 133-140
35. Domenico P, Reich J, Madonia W, Cunha BA (1996) Resistance to bismuth among gram-negative bacteria is dependent upon iron and its uptake. *J Antimicrob Chemother* 38: 1031-1040
36. Kratz F, Hartmann M, Keppler B, Messori L (1994) The binding properties of two antitumor ruthenium(III) complexes to apotransferrin. *J Biol Chem* 269: 2581-2588
37. Harding MM, Mokdsi G (2000) Antitumour metallocenes: structure-activity studies and interactions with biomolecules. *Curr Med Chem* 7: 1289-1303
38. Guo M, Sun H, McArdle HJ, Gambling L, Sadler PJ (2000) Ti(IV) uptake and release by human serum transferrin and recognition of Ti(IV)-transferrin by cancer cells: understanding the mechanism of action of the anticancer drug titanocene dichloride. *Biochemistry* 39: 10023-10033
39. Yamagata M, Tannock IF (1996) The chronic administration of drugs that inhibit the regulation of intracellular pH: in vitro and anti-tumour effects. *Br J Cancer* 73: 1328-1334
40. Van Hulle M, De Cremer K, Cornelis R, Lameire N (2001) In vivo distribution and speciation of [<sup>114m</sup>In]InCl<sub>3</sub> in the Wistar rat. *J Environ Monit* 3: 86-90
41. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM (1994) Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4407-4411
42. Schmidt-Wolf GD, Schmidt-Wolf IG (2003) Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. *Trends Mol Med* 9: 67-72
43. Dash PR, Read ML, Fisher LK, Howard KA, Wolfert M, Oupicky D, Subr V, Strohm J, Ulbrich K, Seymour LW (2000) Decreased binding to proteins and cells of polymeric gene delivery vectors surface modified with a multivalent hydrophilic polymer and retargeting through attachment of transferrin. *J Biol Chem* 275: 3793-3802



44. Uike H, Sakakibara R, Iwanaga K, Ide M, Ishiguro M (1998) Efficiency of targeted gene delivery of ligand-poly-L-lysine hybrids with different crosslinks. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 1247-1248
45. Zenke M, Steinlein P, Wagner E, Cotton M, Beug H, Birnstiel ML (1990) Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3655-3659
46. Wightman L, Patzelt E, Wagner E, Kircheis R (1999) Development of transferrin-polycation/DNA based vectors for gene delivery to melanoma cells. *J Drug Target* 7: 293-303
47. Zauner W, Kichler A, Schmidt W, Sinski A, Wagner E (1996) Glycerol enhancement of ligand-polylysine/DNA transfection. *Biotechniques* 20: 905-913
48. Yanagihara K, Cheng H, Cheng PW (2000) Effects of epidermal growth factor, transferrin, and insulin on lipofection efficiency in human lung carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 7: 59-65
49. Richardson DS, Johnson SA (1997) Anthracyclines in haematology: preclinical studies, toxicity and delivery systems. *Blood Rev* 11: 201-223
50. Singh M, Atwal H, Micetich R (1998) Transferrin directed delivery of adriamycin to human cells. *Anticancer Res* 18: 1423-1427
51. Kratz F, Beyer U, Roth T, Tarasova N, Collery P, Lechenault F, Cazabat A, Schumacher P, Unger C, Falken U (1998) Transferrin conjugates of doxorubicin: synthesis, characterization, cellular uptake, and in vitro efficacy. *J Pharm Sci* 87: 338-346
52. Fritzer M, Szekeres T, Szuts V, Jarayam HN, Goldenberg H (1996) Cytotoxic effects of a doxorubicin-transferrin conjugate in multidrug-resistant KB cells. *Biochem Pharmacol* 51: 489-493
53. Wang F, Jiang X, Yang DC, Elliott RL, Head JF (2000) Doxorubicin-gallium-transferrin conjugate overcomes multidrug resistance: evidence for drug accumulation in the nucleus of drug resistant MCF-7/ADR cells. *Anticancer Res* 20: 799-808
54. Hatano T, Ohkawa K, Matsuda M (1993) Cytotoxic effect of the protein-doxorubicin conjugates on the multidrug-resistant human myelogenous leukemia cell line, K562, in vitro. *Tumour Biol* 14: 288-294
55. Lai BT, Gao JP, Lanks KW (1998) Mechanism of action and spectrum of cell lines sensitive to a doxorubicin-transferrin conjugate. *Cancer Chemother Pharmacol* 41: 155-160
56. Drew L, Groome N, Hallam TJ, Warr JR, Rumsby MG (1994) Changes in protein kinase C subspecies protein expression and activity in a series of multidrug-resistant human KB carcinoma cell lines. *Oncol Res* 6: 429-438
57. Ruthner M, Berczi A, Goldenberg H (1994) Interaction of a doxorubicin-transferrin conjugate with isolated transferrin receptors. *Life Sci* 54: 35-40
58. Berczi A, Ruthner M, Szuts V, Fritzer M, Schweinzer E, Goldenberg H (1993) Influence of conjugation of doxorubicin to transferrin on the iron uptake by K562 cells via receptor-mediated endocytosis. *Eur J Biochem* 213: 427-436
59. Barabas K, Sizensky JA, Faulk WP (1992) Transferrin conjugates of adriamycin are cytotoxic without intercalating nuclear DNA. *J Biol Chem* 267: 9437-9442
60. Kotamraju S, Chitambar CR, Kalivendi SV, Joseph J, Kalyanaraman B (2002) Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells: role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis. *J Biol Chem* 277: 17179-17187
61. Kim Y, Ma AG, Kitta K, Fitch SN, Ikeda T, Ihara Y, Simon AR, Evans T, Suzuki YJ (2003) Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Mol Pharmacol* 63: 368-377
62. Clementi ME, Giardina B, Di Stasio E, Mordente A, Misiti F (2003) Doxorubicin-derived metabolites induce release of cytochrome C and inhibition of respiration on cardiac isolated mitochondria. *Anticancer Res* 23: 2445-2450
63. Xu X, Persson HL, Richardson DR (2005) Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Mol Pharmacol* 68: 261-271
64. Okamoto T, Tani R, Yabumoto M, Sakamoto A, Takada K, Sato GH, Sato JD (1996) Effects of insulin and transferrin on the generation of lymphokine-activated killer cells in serum-free medium. *J Immunol Methods* 195: 7-14
65. Sadava D, Phillips T, Lin C, Kane SE (2002) Transferrin overcomes drug resistance to artemisinin in human small-cell lung carcinoma cells. *Cancer Lett* 179: 151-156
66. Efferth T, Benakis A, Romero MR, Tomicic M, Rauh R, Steinbach D, Hafer R, Stamminger T, Oesch F, Kaina B, Marschall M (2004) Enhancement of cytotoxicity of artemisinins toward cancer cells by ferrous iron. *Free Radic Biol Med* 37: 998-1009
67. Beyer U, Roth T, Schumacher P, Maier G, Unold A, Frahm AW, Fiebig HH, Unger C, Kratz F (1998) Synthesis and in vitro efficacy of transferrin conjugates of the anticancer drug chlorambucil. *J Med Chem* 41: 2701-2708
68. Tanaka T, Fujishima Y, Kaneo Y (2001) Receptor mediated endocytosis and cytotoxicity of transferrin-mitomycin C conjugate in the HepG2 cell and primary cultured rat hepatocyte. *Biol Pharm Bull* 24: 268-273
69. Tanaka T, Kaneo Y, Miyashita M (1998) Intracellular disposition and cytotoxicity of transferrin-mitomycin C conjugate in HL60 cells as a receptor-mediated drug targeting system. *Biol Pharm Bull* 21: 147-152
70. Bejaoui N, Page M, Noel C (1991) Cytotoxicity of transferrin-daunorubicin conjugates on small cell carcinoma of the lung (SCCL) cell line NCI-H69. *Anticancer Res* 11: 2211-2213
71. Iinuma H, Maruyama K, Okinaga K, Sasaki K, Sekine T, Ishida O, Ogiwara N, Johkura K, Yonemura Y (2002) Intracellular targeting therapy of cisplatin-encapsulated transferrin-polyethylene glycol liposome on peritoneal dissemination of gastric cancer. *Int J Cancer* 99: 130-137

## Transferrin conjugates in the anticancer therapy

Dorota Łubgan<sup>1,2</sup>, Agnieszka Marczak<sup>1</sup>, Luitpold Distel<sup>2</sup>, Zofia Józwiak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Thermobiology, University of Łódź, 12/16 Banacha Str. 90-237 Łódź, Poland, <sup>2</sup>Department of Radiation Oncology, Friedrich-Alexander-University of Erlangen-Nuremberg, 27 Universitätsstrasse, D-91054 Erlangen, Germany

✉ e-mail: lubgan1@poczta.onet.pl

**Key words:** doxorubicin-transferrin conjugate, anticancer therapy, transferrin receptor, endocytosis

### ABSTRACT

To enhance the therapeutic efficiency of anticancer drugs and reducing its systemic side-effects carriers are used. Transferrin is one of the very promising protein which can be used to transport drugs, DNA and ions into the cancer cells. Because of the fact that neoplastic cells have increased number of transferrin receptors, the transferrin can deliver the drugs directly to the neoplastic cells without injury of normal cells.



Elżbieta Rozpończyk<sup>1,✉</sup>

Janusz Szemraj<sup>1</sup>

Mariusz Malinowski<sup>2</sup>

Jolanta Rozpończyk<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź

<sup>2</sup> Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź

<sup>3</sup> Zakład Farmacji, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź

✉ Katedra Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; e-mail: elroz2@interia.pl

Artykuł otrzymano 3 sierpnia 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 3 października 2005 r.

**Słowa kluczowe:** fibrynoliza, plazmina, plazminogen, stafylokinaza

**Wykaz skrótów:**  $\alpha_2$ -AP – antyplazmina, inhibitor plazminy; FDP – produkty degradacji fibryny; LBS (ang. *lysine binding site*) – miejsca wiążące lizynę obecne w plazminie; PAI – (ang. *plasminogen activator inhibitor*) – inhibitor aktywatora plazminogenu typu pierwszego (PAI-1) i drugiego (PAI-2); Sak – stafylokinaza; Sk – streptokinaza; t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu; u-PA – urokinazowy aktywator plazminogenu, urokinaza

## STRESZCZENIE

Stafylokinaza jest białkiem zbudowanym ze 135 aminokwasów, produkowanym przez szczepy *Staphylococcus aureus*. Należy ona do selektywnych aktywatorów plazminogenu, których działanie zależy od obecności fibryny. Białko to przekształca nieaktywny proenzym – plazminogen w plazminę rozpuszczającą skrzeplinę. Celem tej pracy jest przedstawienie biochemicznych, trombolitycznych właściwości stafylokinazy i jej pochodnych, a także potencjalnego zastosowania w leczeniu zawału mięśnia sercowego oraz innych chorób układu krążenia.

## WPROWADZENIE

Zawał mięśnia sercowego oraz jego następstwa są jedną z głównych przyczyn zgonów lub inwalidztwa w Polsce i krajach Europy Zachodniej [1,2]. Bezpośrednią przyczyną zawału jest całkowite lub częściowe zamknięcie tętnicy wieńcowej przez zakrzep spowodowany pęknięciem blaszki miażdżycowej. Celem terapii trombolitycznej jest przywrócenie jak najszybszego przepływu krwi w zamkniętym naczyniu, zmniejszenie rozmiaru uszkodzenia oraz ograniczenie śmiertelności poprzez aktywację układu fibrynolitycznego [1-3].

Układ ten składa się z proenzymu – plazminogenu, który pod wpływem tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) i urokinazowego aktywatora plazminogenu (u-PA) przekształca się w aktywną plazminę, rozkładającą fibrynę do rozpuszczalnych produktów (FDP). Proces fibrynolizy jest ściśle regulowany przez inhibitory aktywatorów plazminogenu (PAI-1 lub PAI-2) oraz inhibitory plazminy – antyplazminę ( $\alpha_2$ -AP), makroglobulinę ( $\alpha_2$ -M) i karboksypeptydazę (TAFI) [2-6] (Rys. 1).

W czasie leczenia trombolitycznego podawane są aktywatory plazminogenu nasilające proces przekształcania proenzymu plazminogenu w aktywną plazminę rozpuszczającą skrzeplinę. Możemy wyróżnić aktywatory niespecyficzne, do których należy: streptokinaza, urokinaza i acylowane kompleksy plazminogenu ze streptokinazą (APSAC) oraz specyficzne obejmujące: prourokinazę, tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA), rekombinowaną stafylokinazę, a także ich pochodne [2,3,5,7]. Kryterium podziału opiera się na tym, że specyficzne ograniczają swoje działanie do obszaru zakrzepu, a niespecyficzne aktywują plazminogen, zarówno związany z włóknikiem, jak i krążący w osoczu (Rys. 2). Te ostatnie wywołują tym samym więcej powikłań poprzez degradację  $\alpha_2$ -antyplazminy, fibrynogenu, czynników krzepnięcia V i VIII. Może to doprowadzić do poważnych krwotoków na skutek zmniejszenia zawartości wyżej wymienionych czynników oraz wzrostu produktów degradacji fibrynogenu, hamujących agregację płytek krwi [5,7].

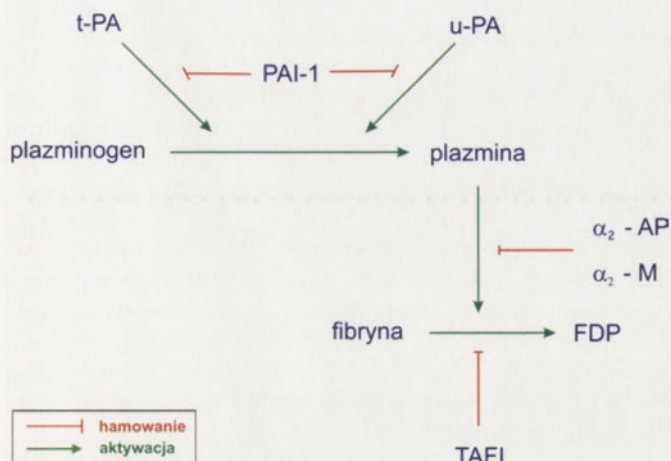
Celem tej pracy jest zaprezentowanie roli stafylokinazy w układzie fibrynolitycznym, mechanizmu jej działania, a także zastosowania jako selektywnego aktywatora plazminogenu w leczeniu zawału mięśnia sercowego. Badania nad tym białkiem bakteryjnym podjęto z powodu wysokiej selektywności działania i ekonomicznej możliwości produkcji w porównaniu z tkankowym aktywatorem plazminogenu czy prourokinazą.

## KRÓTKA HISTORIA STAFYLOKINAZY

Stafylokinaza jest białkiem produkowanym przez *Staphylococcus aureus*. Nazwę wprowadził Much w roku 1908 [8]. Dwadzieścia pięć lat później potwierdzono zdolności fibrynolityczne szczepów gronkowca złocistego, ale dopiero w 1948 roku określono, że stafylokinaza jest aktywatorem plazminogenu [9]. Badania przeprowadzone przez Lewisa i wsp. [10] oraz Kanae'a [11] na psach



## układ fibrynolityczny



**Rysunek 1.** Główne składniki układu fibrynolitycznego. Plazminogen jest aktywowany przez t-PA i u-PA. Te enzymy są regulowane przez inhibitory PAI. Powstająca plazmina trawi fibrynę do FDP (produkty degradacji fibryny). Plazmina jest hamowana przez  $\alpha_2$ -antyplazminę i  $\alpha_2$ -makroglobulinę. Proces rozkładu włókna przez proteazę serynową (plazminę) jest regulowany przez karboksypeptydazę (TAFI). Rysunek zmodyfikowany na podstawie [6].

wykazały, że stafylokinaza mimo rozpuszczania skrzepiny, wywołuje szereg działań niepożądanych: krwawienia, wydłużenie czasu protrombinowego, a także znaczne zmniejszenie poziomu fibrynogenu. Wyniki te na wiele lat doprowadziły do spadku zainteresowania tym białkiem jako czynnikiem trombolitycznym. Dopiero praca Matsuo i wsp. [12] z użyciem osocza człowieka była punktem zwrotnym w badaniach. Ujawniła znaczne różnice między wpływem stafylokinazy na układ fibrynolityczny ludzi i psów. Wcześniejsze badania wskazujące na wysoką toksyczność preparatu, spowodowane były wyborem złego modelu badawczego – psów, które są bardzo wrażliwe na działanie tego białka.

Dalsze prace doprowadziły do sklonowania genu kodującego stafylokinazę z bakteriofagów: serotypu B (*sakΦC*) [13] i serotypu F (*sak42D*) [14] oraz z genomowego DNA lizogennych szczepów *S. aureus* (*sakSTAR*) [15]. Mała wydajność produkcji i zanieczyszczenie toksynami bakteryjnymi uniemożliwiało jednak prowadzenie dalszych szczegółowych badań nad tym białkiem. Dopiero skonstruowanie odpowiedniego wektora ekspresyjnego [16] i szczepu *Bacillus subtilis* pozbawionego proteaz degradujących stafylokinazę pozwoliło na uzyskanie dużej ilości rekombinowanej stafylokinazy oraz ułatwiło proces jej oczyszczenia [16,17]. To otworzyło drogę do badania wpływu tego białka na układ fibrynolityczny [18].

## BUDOWA GENU KODUJĄCEGO STAFYLOKINAZĘ

Collen i wsp. [19] oraz Sako i wsp. [20] określili strukturę genu stafylokinazy. Fragment zawierający otwartą ramkę odczytu zbudowany jest z 489 par zasad i koduje 163 aminokwasy. Rejon kodujący jest poprzedzony sekwencjami Shine-Dalgarno oraz promotorowymi znajdującymi się w odległości -10 i -35 od kodonu startu ATG. Gen stafylokinazy pochodzący z genomowego DNA *Staphylococcus aureus* oraz bakteriofagów *sakΦC* i *sak42D* różni się tylko cztere-

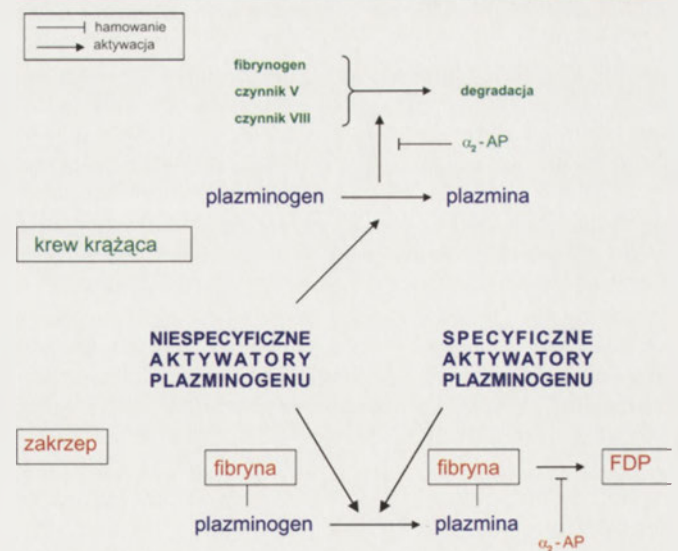
ma nukleotydami [21]. Nie wykazuje jednak homologii ze streptokinazą – nieselektywnym aktywatorem plazminogenu [19,20]. Horii i wsp. [22] zlokalizowali gen kodujący stafylokinazę wewnątrz obszaru kodującego amidazę N-acetylomuramyl-alaninową w szczepach gronkowca złocistego opornego na ampicylinę. Jest to enzym odpowiedzialny za hydrolizę ściany komórkowej bakterii w czasie cyklu litycznego bakteriofaga.

## CHARAKTERYSTYKA BIAŁKA

Stafylokinaza jest białkiem zbudowanym ze 135 aminokwasów [23]. Powstaje po usunięciu 28 aminokwasów z N-końca prekursora w trakcie procesu dojrzewania [24]. Tworzy pojedynczy łańcuch polipeptydowy, nie posiadający mostków siarczkowych i miejsc glikozylacji. Jej struktura nie wykazuje żadnej homologii z innymi aktywatorami plazminogenu. Tworzy ona zbitą elipsoidę, w której rdzeń stanowią hydrofobowe aminokwasy ułożone w strukturę harmonijki  $\beta$  lub  $\alpha$  helisy [23]. Wykazano, że białko to składa się z dwóch domen o podobnej wielkości [21]. Oczyszczone preparaty stafylokinazy różnią się masą cząsteczkową (16,5 – 18 kDa) i punktem izoelektrycznym. Związane jest to z brakiem 6 lub 10 aminokwasów na N-końcu stafylokinazy, ale nie ma to wpływu na jej aktywność [24]. Metionina w pozycji 26 odgrywa jednak kluczową rolę w aktywacji plazminogenu. Podstawienie jej arginina lub walina zmniejsza powinowactwo do plazminogenu i wywołuje utratę aktywności [21].

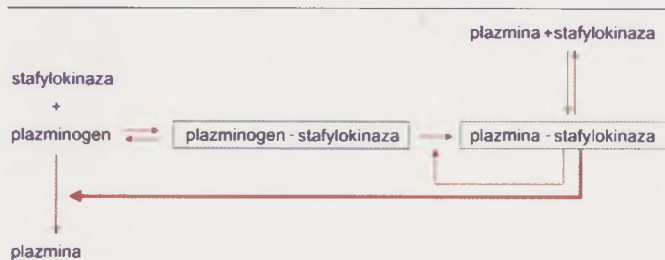
## AKTYWACJA PLAZMINOGENU PRZEZ STAFYLOKINAZĘ

Stafylokinaza łączy się z domenami typu *kringle* K1 i K4 plazminogenu poprzez rejon obejmujący aminokwasy w pozycji 44-50, 65-69 oraz 90-100 [24,25]. Rajamohan i wsp.



**Rysunek 2.** Podział aktywatorów plazminogenu. Niespecyficzne aktywatory plazminogenu (streptokinaza, urokinaza, acylowany kompleks plazminogenu ze streptokinazą – APSAC) aktywują plazminogen krążący w osoczu i związany z fibryną. Powstająca plazmina jest hamowana przez  $\alpha_2$ -antyplazminę. Po wyczerpaniu rezerw inhibitora plazmina trawi czynniki krzepnięcia (fibrynogen, czynnik V i VIII). Specyficzne aktywatory plazminogenu (prourokinaza, t-PA, stafylokinaza i ich pochodne) aktywują głównie plazminogen związany z fibryną. Tworzona na powierzchni zakrzepu plazmina jest chroniona przed inaktywacją ze strony inhibitora –  $\alpha_2$ -antyplazminy. Rysunek zmodyfikowany na podstawie [2].





**Rysunek 3.** Mechanizm aktywacji plazminogenu przez stafylokinazę. Stafylokinaza łączy się z plazminogenem tworząc nieaktywny kompleks oznaczony na rysunku w ramce plazminogen-stafylokinaza. Nie posiada on zdolności aktywacji plazminogenu. Wykazano, że stafylokinaza z bakterii ma duże powinowactwo do plazminy. Niewielka ilość plazminy wystarcza do powstania aktywnego kompleksu plazmina-stafylokinaza (w ramce), który jest aktywatorem kompleksu plazminogen-stafylokinaza. Powstały aktywny kompleks plazmina-stafylokinaza jest silnym modulatorem przejścia plazminogenu w plazminę. Na rysunku zaznaczono pogrubioną strzałką główną drogę aktywacji plazminogenu. Rysunek zmodyfikowany na podstawie [24].

[26] wykazali, że N-koniec stafylokinazy, a zwłaszcza obecność w tym obszarze lizyny, zwiększa powinowactwo do prekursora proteazy serynowej. Poprzez usunięcie 10 aminokwasów z N-końca, plazmina odsłania lizynę w pozycji 11 białka Sak, co umożliwia mu oddziaływanie z domeną *kringle* K5 plazminogenu [26].

Lijnen i Collen [24] zaproponowali mechanizm aktywacji plazminogenu przez stafylokinazę. Jest on odmienny od działania t-PA i uPa, które bezpośrednio aktywują plazminogen poprzez hydrolizę wiązania peptydowego między arginina w pozycji 561 a waliną w pozycji 562. Proces ten nie polega na proteolitycznym rozszczepieniu cząsteczki plazminogenu ponieważ stafylokinaza nie jest enzymem, działa tylko jako kofaktor uczestniczący w wiązaniu oraz ustaleniu optymalnej orientacji przestrzennej proenzymu [27]. Na początku tworzy się nieaktywny kompleks plazminogen-stafylokinaza w stosunku stechiometrycznym 1:1. Jego aktywacja wymaga niewielkiej ilości (około 30 ppm) plazminy. Dopiero powstała plazmina w połączeniu ze stafylokinazą jest aktywatorem plazminogenu zarówno związanego ze stafylokinazą i wolnego (Rys. 3). Powstało pytanie, czy to białko bakteryjne preferuje łączenie się z plazminą, czy z jej proenzymem. Na podstawie analizy kinetycznej wykazano, że stafylokinaza ma większe powinowactwo do plazminy (stała wiązania  $K_A = 50$  nM) niż do plazminogenu ( $K_A = 8 \mu\text{M}$ ), a więc główną drogą jest tworzenie kompleksu plazmina-stafylokinaza, który aktywuje proenzym proteazy serynowej [24]. Opisany wyżej mechanizm różni się od działania streptokinazy (Sk), innego białka bakteryjnego, pochodzącego z hemolitycznych szczepów *Streptococcus*. Aktywuje ono pośrednio plazminogen, poprzez zmiany konformacyjne i prezentowanie jego miejsc aktywnych. Utworzony kompleks plazminogen-streptokinaza ulega proteolizie i tworzy aktywną plazminę połączoną z streptokinazą. W przeciwieństwie do stafylokinazy kompleks plazmina-streptokinaza nie posiada zdolności aktywacji plazminogenu [7].

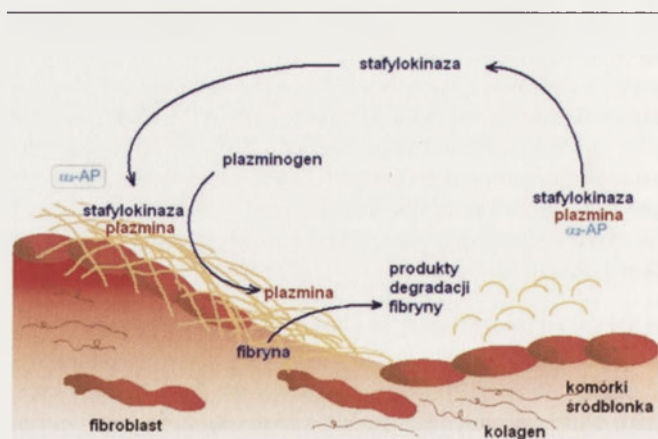
### MECHANIZM SELEKTYWNEGO DZIAŁANIA STAFYLOKINAZY

W prawidłowych warunkach, gdy w naczyniach nie występuje skrzeplina, tworzenie kompleksu plazmina-stafylokinaza praktycznie nie zachodzi, gdyż proteaza serynowa,

plazmina jest szybko hamowana przez  $\alpha_2$ -antyplazminę [21,24]. Proces ten wymaga dostępu inhibitora do wolnych miejsc wiążących lizynę (LBS – ang. *lysine binding site*) w cząsteczce plazminy. Obecność fibryny, ale nie fibrynogenu, opóźnia inaktywację plazminy w kompleksie ze stafylokinazą przez  $\alpha_2$ -AP. Mechanizm ten polega na wiązaniu włóknika do miejsc LBS plazminy, poprzez które łączy się ona także ze swoim inhibitorem. W ten sposób fibryna chroni plazminę przed degradacją. Ułatwia ona także tworzenie kompleksu plazmina-stafylokinaza, a przez to zwiększa aktywację plazminogenu na powierzchni skrzepliny [21,24,27]. Należy podkreślić, że stafylokinaza nie łączy się bezpośrednio z włóknikiem i nie jest inaktywowana przez  $\alpha_2$ -antyplazminę. Po neutralizacji plazminy w kompleksie plazmina-stafylokinaza przez  $\alpha_2$ -AP, uwolniona stafylokinaza może łączyć się z plazminogenem lub inną cząsteczką proteazy serynowej (plazminą) i pełnić funkcje aktywatora fibrynolizy (Rys. 4) [21,24].

Wykazano ponadto, że stafylokinaza ma niskie powinowactwo do plazminogenu posiadającego konformację  $\alpha$  (krążącego w osoczu) lub  $\beta$  (na powierzchni nienaruszonej przez proteazy fibryny), ale wysokie do struktury przestrzennej  $\gamma$ . Plazminogen związany z częściowo rozpuszczonym zakrzepem przyjmuje preferowaną przez stafylokinazę konformację  $\gamma$ . Pozwala to na kumulację dużych ilości kofaktora bakteryjnego w obszarze trawionego włóknika [6].

Reasumując, regulacja tworzenia kompleksu plazmina-stafylokinaza przez fibrynę,  $\alpha_2$ -AP i strukturę  $\gamma$  plazminogenu jest podstawą selektywnego działania stafylokinazy. Ogranicza to efekty uboczne związane z tworzeniem dużej ilości plazminy degradującej nie tylko włóknik, ale również fibrynogen, co zaburza proces równowagi między fibrylizacją a krzepnięciem. W przeciwieństwie do streptokinazy, która w kompleksie z plazminą lub plazminogenem, nie jest degradowana przez  $\alpha_2$ -AP, stafylokinaza wywołuje mniej powikłań krwotocznych [7].



**Rysunek 4.** Mechanizm selektywnego działania stafylokinazy. Kompleks stafylokinaza-plazmina na powierzchni fibryny jest chroniony przed degradacją przez  $\alpha_2$ -antyplazminę ( $\alpha_2$ -AP). Jest on silnym aktywatorem plazminogenu. Powstała plazmina trawi fibrynę. Kompleks stafylokinaza-plazmina nie związany z włóknikiem jest szybko degradowany przez  $\alpha_2$ -AP. Uwolniona z kompleksu stafylokinaza może łączyć się z plazminą związaną ze skrzepliną i aktywować kolejne cząsteczki plazminogenu. Rysunek zmodyfikowany na podstawie [27].



Po określeniu mechanizmu działania w warunkach *in vitro* dalsze prace nad stafylokinazą prowadzono w kierunku sprawdzenia skuteczności trombolitycznego działania na modelach zwierzęcych i możliwości potencjalnego zastosowania tego białka w leczeniu chorób zatorowo-zakrzepowych u ludzi. Podjęto jednocześnie próby określenia parametrów farmakologicznych i porównania działania tego związku z obecnie stosowanymi lekami: streptokinazą i tkankowym aktywatorem plazminogenu. Eksperymenty z udziałem chomików z zatorem płucnym i królików ze skrzepliną w żyłę szyjnej wykazywały podobną skuteczność działania stafylokinazy i streptokinazy, jednak ten pierwszy czynnik wykazywał znaczną przewagę w usuwaniu zakrzepów bogatopłytkowych, tworzonych w tętnicach i nie wywoływał uogólnionej aktywacji systemu fibrynolitycznego [24,28].

Co więcej, w oparciu o modelowe badania nad królikami z zakrzepem w żyłę szyjnej ustalono, że mniejsze dawki stafylokinazy (150 µg/kg) są tak samo skuteczne jak wysokie stężenie tkankowego aktywatora plazminogenu (500 µg/kg). Dodatkowo wykazano, że stafylokinaza nie wydłuża czasu krwawienia i charakteryzuje się mniejszym ryzykiem ponownego zamknięcia naczyń (reokluzyi) w porównaniu z t-PA [24,29]. Podobne rezultaty, wskazujące na możliwość zastosowania dziesięciokrotnie mniejszych dawek stafylokinazy w porównaniu z streptokinazą, uzyskano u pawianów ze skrzepliną w tętnicy udowej [24]. Powyższe eksperymenty na zwierzętach modelowych pozwoliły na sformułowanie wniosku, że stafylokinaza ma zwiększoną efektywność działania w porównaniu z t-PA i streptokinazą [24,28]. Dało to podstawę do prowadzenia badań nad zastosowaniem stafylokinazy u ludzi. W celu oceny skuteczności działania czynników fibrynolitycznych wprowadzono czterostopniową klasyfikację TIMI (ang. *Thrombolysis In Myocardial Infarction trial*), w zakresie od 0 do 3. Polega ona na ocenie drożności naczyń na podstawie koronarografii. Stopień „0” oznacza całkowity brak przepływu poza miejscem zamknięcia, stopień „1” – przenikanie kontrastu poza zwężenie, ale bez dalszego przepływu, stopień „2” – przepływ przez miejsce zwężenia z wolnym wypełnianiem kontrastem obwodowego segmentu naczyń (perfuzję częściową), stopień „3” – reperfuzję całkowitą [5].

Pilotażowy eksperyment przeprowadzono początkowo z udziałem 10 pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego ze stopniem przepływu „0” w skali TIMI. Po podaniu stafylokinazy w dawce 10 mg uzyskano całkowitą reperfuzję (TIMI-3) u 8 pacjentów bez istotnych zmian poziomu fibrynogenu, plazminogenu i  $\alpha_2$ -AP [30]. Kolejne badania objęły 100 pacjentów po niedawno przeżytym zawałe mięśnia sercowego i miały na celu porównanie skuteczności działania stafylokinazy i tkankowego aktywatora plazminogenu. W wyniku tego eksperymentu stwierdzono, że stafylokinaza podobnie jak t-PA szybko udrażnia zamknięte przez zakrzep naczyń, ale w przeciwieństwie do tego drugiego leku nie zmienia poziomu plazminogenu i czynników krzepnięcia [31].

W celu ułatwienia sposobu podawania, próbowano stosować stafylokinazę w postaci pojedynczych wlewów do-

żylnych (20 mg w ciągu 5 min), ale okazało się, że lepszy efekt uzyskuje się wprowadzając mniejsze podwójne dawki (schemat 2x10 mg przez 5 min) [24]. Skuteczność stafylokinazy sprawdzano także w leczeniu zatorów tętnic obwodowych. Wstępne badania Vanderschuerena i wsp. [32] objęły 30 pacjentów, a pozytywne rezultaty zachęciły do podjęcia dalszych prób przez zespół Heymansa [33]. W eksperymentach tych uczestniczyło 191 pacjentów z chromaniem przestankowym, martwicą niedokrwinną kończyn dolnych oraz ostrym lub przewlekłym niedotlenieniem naczyń obwodowych. We wszystkich wyżej wymienionych przypadkach stwierdzono, że stafylokinaza zmniejsza śmiertelność, eliminuje konieczność amputacji, skraca czas krwawienia, ale w niewielkim stopniu przyczynia się do powstawania krwotoków wewnątrzczaszkowych i reakcji alergicznych [32].

Równoległe podejmowano także badania w celu określenia właściwości farmakologicznych stafylokinazy. Eksperymenty z udziałem królików wykazały, że stafylokinaza ma bardzo krótki okres półtrwania, który wynosi ok. 1,7 min, co spowodowane jest szybkim usuwaniem jej z osocza (14ml/min) [24]. Stafylokinaza usuwana jest głównie przez nerki i mięśnie, a nie przez wątrobę jak większość leków. Badania z udziałem pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego wykazały, że dawka 10 mg podawana dożylnie przez okres 30 min była usuwana bardzo szybko z osocza (270 ml/min), a czas półtrwania wynosił około 6 min [29]. Reasumując, stafylokinaza wykazuje silne trombolityczne działanie, co ma znaczenie w leczeniu zawału mięśnia sercowego i innych chorób zatorowo-zakrzepowych.

## POCHODNE STAFYLOKINAZY

Stafylokinaza mimo wysokiej selektywności działania i szerokiego zastosowania ma także wady. Jako białko pochodzące ze *Staphylococcus aureus* wywołuje odpowiedź immunologiczną u leczonych pacjentów. Prowadzi to do powstania przeciwciał klasy IgG, które zmniejszają skuteczność jej działania [5]. Odpowiedź organizmu na stafylokinazę zależy od wieku pacjenta, co związane jest z pamięcią immunologiczną (wcześniejszymi infekcjami wywołanymi przez gronkowce) [24]. Zidentyfikowano obszary odpowiedzialne za powstawanie przeciwciał. Obejmują one następujące rejony stafylokinazy [34]: A1 (N-końiec), D1 (aminokwasy 16-32), F2 (aminokwasy 56-72), C3 (aminokwasy 71-87), D4 (aminokwasy 106-122), A5 (C-końiec).

Najbardziej immunogenny okazał się rejon C3 [34]. Jest on rozpoznawany przez układ zgodności tkankowej HLA-DR człowieka i stymuluje proliferację limfocytów T. Eliminacja tego obszaru może zmniejszać immunogenność stafylokinazy, a ponieważ jest on zlokalizowany na zewnątrz miejsc wiążących plazminę może nie mieć wpływu na aktywację plazminogenu [35]. Prace Collena i wsp. potwierdzają immunogenność: lizyny 74, kwasu glutaminowego 75 oraz argininy 77 [36].

Metodą ukierunkowanej mutagenyzy skonstruowano pochodne stafylokinazy o nazwie SakSTAR.M38 (w której lizyna w pozycji 35, kwas glutaminowy w pozycji 38, lizyna 74, kwas glutaminowy 75, arginina 77 zastąpione zosta-



ly alaniną) oraz SakSTAR.M89 (w tym przypadku alaninę wprowadzono zamiast lizyny w pozycji 74, kwasu glutaminowego 75 i 80, argininy 77, kwasu asparaginowego 82). Związki te wykazują zmniejszoną immunogenność, ale i siłę trombolitycznego działania [37]. W przeciwieństwie do wyżej wymienionych, nowa pochodna SakSTAR(K74) z podstawieniem lizyny w pozycji 74 alaniną zachowuje przy zmniejszonej indukcji układu immunologicznego człowieka pełną zdolność do aktywacji plazminogenu [38].

Wadą stafylokinazy obok immunogenności jest bardzo krótki okres półtrwania, co utrudnia proces podawania tego leku [39]. Podstawienie 12 aminokwasów w cząsteczce stafylokinazy zmniejszyło zdolność białka bakteryjnego do produkcji przeciwciał, a dodatkowe wprowadzenie cysteiny w pozycję 3 (seryna) i połączenie z pochodną glikolu polietylenowego doprowadziło do powstania wyjątkowo skutecznego czynnika trombolitycznego SY161-P5 o przedłużonym okresie półtrwania (do 15 min) [40]. Wstępne badania z zastosowaniem nowej pochodnej u pacjentów z zawałem mięśnia sercowego dały obiecujące wyniki [40], które zachęciły do podjęcia dalszych prób przez zespół Armstronga i wsp. (tzw. badania CAPTORS – ang. *Collaborative Angiographic Patency Trial Of Recombinant Staphylokinase*) [41]. Badania te miały na celu określenie wielkości skutecznej dawki, profilu bezpieczeństwa i działań niepożądanych oraz porównanie skuteczności działania nowej pochodnej SY161-P5 z tkankowym aktywatorem plazminogenu. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w wyniku podania obu czynników trombolitycznych, a także nie wystąpiły reakcje alergiczne po podaniu nowej pochodnej stafylokinazy [42].

W drugiej fazie badań klinicznych (CAPTORSII) wykazano, że stosowanie stafylokinazy połączonej z glikolem polietylenowym związane jest z pewnym ryzykiem krwotoku wewnątrzczaszkowego i drobnymi krwawieniami, ale lek wykazuje selektywność działania tylko w obecności fibryny oraz charakteryzuje się łatwością podawania w postaci jednorazowych iniekcji ze względu na długi okres półtrwania. W przyszłości planowane są badania trzeciej fazy (CAPTORSIII) w celu ustalenia standardów bezpieczeństwa [43].

Stosowanie stafylokinazy, podobnie jak innych leków fibrynolitycznych, jest obarczone ryzykiem wystąpienia efektu prokoagulacyjnego. Polega on na ponownym zamknięciu naczynia wcześniej udroźnionego przez leki trombolityczne. Dochodzi do tego na skutek miejscowego uszkodzenia naczyń i aktywacji układu krzepnięcia [44]. W celu zapobiegania temu zjawisku połączono stafylokinazę z hirudyną [45] lub dipetaliną [46]. Są to inhibitory trombiny – ostatniego ogniwa tworzenia zakrzepu. W ten sposób udało się skonstruować czynniki o właściwościach antykoagulacyjnych i fibrynolitycznych. Przyspieszają one proces trawienia skrzepliny, a przez to ograniczają rozmiar uszkodzenia.

Innym podejściem przy zapobieganiu powstania efektu prokoagulacyjnego jest wprowadzenie do stafylokinazy sekwencji RGD, czyli argininy, glicyny i kwasu asparaginowego. Trójpeptyd ten jest rozpoznawany przez receptor glikoproteinowy GPIIb/IIIa płytek krwi, co ma kluczowe zna-

Tabela 1. Pochodne stafylokinazy.

Nazwa pochodnej	Efekt modyfikacji	Piśmiennictwo
SakSTAR.M38	zmniejszenie immunogenności oraz siły fibrynolitycznego działania na skutek wprowadzenia mutacji punktowej	[37]
SakSTAR.M89	zmniejszenie immunogenności, pełne zachowanie zdolności do aktywacji plazminogenu po podstawieniu lizyny w pozycji 74 alaniną	[38]
Sak STAR (K74)	zmniejszenie immunogenności, pełne zachowanie zdolności do aktywacji plazminogenu po podstawieniu lizyny w pozycji 74 alaniną	[38]
SY161-P5	zwiększenie okresu półtrwania do 15 min, a także selektywności działania w wyniku połączenia z pochodną glikolu polietylenowego	[39,40]
HE-Sak	połączenie stafylokinazy z inhibitorem trombiny – hirudyną doprowadziło do powstania czynnika o właściwościach antykoagulacyjnych i fibrynolitycznych	[45]
H <sub>6</sub> -Sak-Dip-I+II	stafylokinaza związana z inhibitorem trombiny – dipetaliną to czynnik o właściwościach trombolitycznych i fibrynolitycznych	[46]
DGR i RL1	połączenie stafylokinazy z sekwencjami RGD (arginina-glicyna-kwas asparaginowy) pozwoliło na uzyskanie czynnika o właściwościach antykoagulacyjnych	[47]
Sak/RGD/K2	wprowadzenie sekwencji RGD i domeny <i>kringle</i> K2 tkankowego aktywatora doprowadziło do powstania czynnika o właściwościach antyagregacyjnych i zwiększonym powinowactwie do włókniaka	[48]
SAKM3-L-K1	wprowadzenie domeny <i>kringle</i> K1 plazminogenu oraz mutacji punktowej doprowadziło do powstania czynnika o właściwościach bezpośredniego wiązania ze skrzepem	[49]

czenie w ich agregacji, a tym samym w tworzeniu zakrzepu [47]. Powstały w ten sposób czynnik posiada nie tylko właściwości aktywatora plazminogenu, ale także inhibitora agregacji płytek krwi. Kolejną trudnością pojawiającą się w czasie leczenia trombolitycznego jest ryzyko występowania krwawień lub nawet groźnych krwotoków wewnątrzczaszkowych. Dochodzi do tego w czasie wyczerpania się rezerwy inhibitorów aktywatora plazminogenu (PAI) oraz  $\alpha_2$ -antyplazminy. Podawanie egzogennych aktywatorów plazminoge-



nu prowadzi do tworzenia dużej ilości plazminy trawiącej fibrynę i czynniki krzepnięcia [44]. W celu zmniejszenia ryzyka potencjalnych krwotoków proponuje się zwiększenie selektywności poprzez bezpośrednie połączenie stafylokinazy ze skrzepliną. Sama stafylokinaza nie posiada takich właściwości w związku z tym wprowadzono do niej domenę *kringle* K2 tkankowego aktywatora plazminogenu, odpowiedzialną za wiązanie z włóknikiem, a także dodano hirudynę i sekwencje RGD. Otrzymane białko Sak/RGD/K2 charakteryzuje się właściwościami antykoagulacyjnymi, antyagregacyjnymi oraz zwiększonym powinowactwem do fibryny [48]. Wu i wsp. [49] skonstruowali czynnik o nazwie SakM3-L-K1, który charakteryzuje się zwiększoną zdolnością wiązania ze skrzepliną. Składa się on z domeny *kringle* K1 plazminogenu wiążącej fibrynę i stafylokinazy z podstawioną alaniną w pozycji 30 (Tabela 1).

Obecnie obok tworzenia metodami inżynierii genetycznej pochodnych stafylokinazy duże znaczenie ma leczenie skojarzone. Stafylokinazę podaje się pacjentom leczonym aspiryną (hamującą agregację płytek krwi) lub heparyną (inhibitorem trombiny) [7]. Ciekawe rezultaty w warunkach eksperymentalnych *in vitro* uzyskano w wyniku dodania do roztworu stafylokinazy domen  $\beta$  i  $\gamma$  streptokinazy – innego białka bakteryjnego o właściwościach fibrinolitycznych. Powstały kompleks stafylokinaza- $\beta$ -streptokinaza wykazywał zwiększoną zdolność aktywacji plazminogenu w porównaniu z wolną stafylokinazą [50].

## PODSUMOWANIE

Stafylokinaza – białko bakteryjne należące do specyficznych aktywatorów plazminogenu, wykazuje zwiększoną skuteczność działania w porównaniu z tkankowym aktywatorem plazminogenu i prourokinazą [24,28,31]. Wywołuje mniej strat fibrynogenu, plazminogenu i  $\alpha_2$ -antyplazminy w osoczu [51]. Jej wyjątkowy mechanizm tworzenia plazminy na powierzchni zakrzepu w przeciwieństwie do streptokinazy, zwiększa bezpieczeństwo podania stafylokinazy jako leku trombolitycznego [7]. Stafylokinaza nie jest jednak idealnym aktywatorem plazminogenu z uwagi na immunogenność i krótki okres półtrwania [5]. W związku z tym skonstruowano szereg jej pochodnych o zmienionych właściwościach biochemicznych [37-40,45-49]. Prowadzone badania na ludziach i zwierzętach dowiodły, że stafylokinaza jest skuteczna w leczeniu zawału mięśnia sercowego i innych chorób zatorowo-zakrzepowych [24,28].

## PIŚMIENNICTWO

1. Sadowski Z, Budaj A, Dłużniewski M, Duszyński A, Dziatkowiak A, Pasyk S, Rużyło W, Tracz W, Wodniecki J (1997) Choroba niedokrwienna serca. Polskie Towarzystwo Kardiologiczne standardy postępowania w chorobach układu krążenia. Kardiologia Pol 46: Supl. 1: 156-168
2. Lijnen HR, Collen D (2000) Molecular basis of thrombolytic therapy. J Nucl Cardiol 7: 373-381
3. Armstrong PW, Collen D (2001) Fibrinolysis for acute myocardial infarction: current status and new horizons for pharmacological reperfusion, part 1. Circulation 103: 2862-2866
4. Cesarman-Mau G, Hajjar KA (2005) Molecular mechanisms of fibrinolysis. Br J Haematol 129: 307-321
5. Łopaciuk S (2002) Zatory i zakrzepy, Wydawnictwo PZWL, Warszawa

6. Rijken DC, Sakharov DV (2001) Basic principles in thrombolysis: regulatory role of plasminogen. Thromb Res 103: Supp 1: S41-49
7. Collen D, Lijnen HR (2000) Recent developments in thrombolytic therapy. Fibrinolysis Proteol 14: 66-72
8. Much U (1908) Über eine vorstufe des fibrinfermentes in kulturen von Staphylokinase areus. Biochemische Zeitschrift 14: 143-155
9. Vanderschueren S, Van de Werf F, Collen D (1997) Recombinant staphylokinase for thrombolytic therapy. Fibrinolysis Proteol 11: Suppl 2: 39-44
10. Lewis JH, Kerber CW, Wilson JH (1964) Effects of fibrinolytic agents and heparin on intravascular clot lysis. Am J Physiol 207:1044-48
11. Kanae K (1986) Fibrinolysis by staphylokinase in vivo. Biol Abstr 81: AB748, abstrakt 65436
12. Matsuo O, Okada K, Fukao H, Tomioka Y, Ueshima S, Watanuki M, Sakai M (1990) Thrombolytic properties of staphylokinase. Blood 76: 925-929
13. Sako T, Sawaki S, Sakurai T, Ito S, Yoshizawa Y, Kondo I (1983) Cloning and expression of the staphylokinase gene of *Staphylococcus aureus* in *E. coli*. Mol Gen Genet 190: 271-277
14. Behnke D, Gerlach D (1987) Cloning and expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus sanguis* of a gene for staphylokinase-A bacterial plasminogen activator. Mol Gen Genet 210: 528-534
15. Collen D, Silence K, Demarsin E, De Mol M, Lijnen HR (1992) Isolation and characterization of natural and recombinant staphylokinase. Fibrinolysis 6: 203-210
16. Schlott B, Hartmann M, Giihrs KH, Birch-Hirschfeld E, Pohl HD, Vanderschueren S, Van de Werf F, Michael A, Collen D, Behnke D (1994) High yield production and purification of recombinant staphylokinase for thrombolytic therapy. Biotechnology 12: 185-189
17. Ye R, Kim JH, Kim BC, Szarka S, Sirota E, Wong SL (1999) High-Level Secretory Production of Intact, Biologically Active Staphylokinase from *Bacillus subtilis*. Biotechnol Bioeng 62: 87-96
18. Collen D (1996) Fibrin-selective thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. Circulation 93: 857-865
19. Collen D, Zhao ZA, Holvoet P, Marynen P (1992) Primary structure of staphylokinase. Fibrinolysis 6: 226-231
20. Sako T, Tsuchida N (1983) Nucleotide sequence of the staphylokinase gene from *Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Res 11: 7679-7693
21. Collen D, Lijnen HR (1994) Staphylokinase, a fibrin-specific plasminogen activator with therapeutic potential? Blood 84: 680-686
22. Horii T, Yokoyama K, Barua S, Odagiri T, Futamura N, Hasegawa T, Ohta M (2000) The staphylokinase gene is located in the structural gene encoding N-acetylmuramyl-L-alanine amidase in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 185: 221-224
23. Collen D, Lijnen R (2005) Thrombolytic agents. Thromb Haemost 93: 627-630
24. Lijnen HR, Collen D (1996) Staphylokinase, a fibrin - specific bacterial plasminogen activator. Fibrinolysis 10: 119-126
25. Rajamohan G, Dahiya M, Mande SC, Dikshit KL (2002) Function of the 90-loop (Thr90-Glu100) region of staphylokinase in plasminogen activation probed through site-directed mutagenesis and loop deletion. Biochem J 365: 379-389
26. Rajamohan G, Dikshit KL (2002) Role of the N-terminal region of staphylokinase (SAK): evidence for the participation of the N-terminal region of SAK in the enzyme-substrate complex formation. FEBS Lett 474: 151-158
27. Parry MA, Zhang XC, Bode W (2000) Molecular mechanisms of plasminogen activation: bacterial cofactors provide clues. TIBS 25: 53-59
28. Pietrucha T, Watała C (1996) Stafylokinazę – nowy środek w leczeniu chorób układu krążenia. Biotechnologia 3: 44-51



29. Verstraete M (2000) Third-Generation Thrombolytic Drugs. *Am J Med* 109: 52-58
30. Collen D, Van de Werf F (1993) Coronary thrombolysis with recombinant staphylokinase in patients with evolving myocardial infarction. *Circulation* 87: 1850-1853
31. Vanderschueren S, Barrios L, Kerdsinchai P, Van den Heuvel P, Hermans L, Vrolix M, De Man F, Benit E, Muyltermans L, Collen D (1995) A randomized trial of recombinant staphylokinase versus alteplase for coronary artery patency in acute myocardial infarction. The STAR Trial Group. *Circulation* 92: 2044-2049
32. Vanderschueren S, Stockx L, Wilms G, Lacroix H, Verhaeghe R, Vermeylen J, Collen D (1995) Thrombolytic therapy of peripheral arterial occlusion with recombinant staphylokinase. *Circulation* 92: 2050-2057
33. Heymans S, Vanderschueren S, Verhaeghe R, Stockx L, Lacroix H, Nevelsteen A, Laroche Y, Collen D (2000) Outcome and one year follow-up of intra-arterial staphylokinase in 191 patients with peripheral arterial occlusion. *Thromb Haemost* 83: 666-671
34. Warmerdam PA, Vanderlick K, Vandervoort P, De Smedt H, Plaisance S, De Maeyer M, Collen D (2002) Staphylokinase-specific cell-mediated immunity in humans. *J Immunol* 168: 155-161
35. Warmerdam PA, Plaisance S, Vanderlick K, Vandervoort P, Brepoels K, Collen D, De Maeyer M (2002) Elimination of a human T-cell region in staphylokinase by T-cell screening and computer modeling. *Thromb Haemost* 87: 666-673
36. Collen D, Stockx L, Lacroix H, Suy R, Vanderschueren S (1997) Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. IV: Identification of variants with reduced antibody induction but intact potency. *Circulation* 95: 463-472
37. Collen D, Moreau H, Stockx L, Vanderschueren S (1996) Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. II: Thrombolytic properties and antibody induction. *Circulation* 94: 207-216
38. Collen D, de Cock F, Demarsin E, Jenne S, Lasters I, Laroche Y, Warmerdam P, Jespers L (1997) Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. III: Species Variability of antibody binding patterns. *Circulation* 95: 455-462
39. Armstrong PW, Burton J, Pakola S, Malhoek G, Betriu A, Tendera M, Bode C, Adgey AA, Bar F, Vahanian A, Van de Werf F (2003) Collaborative angiographic patency trial of recombinant staphylokinase (CAPTORS II). *Am Heart J* 146: 484-488
40. Collen D, Sinnaeve P, Demarsin E, Moreau H, De Maeyer M, Jespers L, Laroche Y, Van de Werf F (2000) Polyethylene glycol-derivatized cysteine-substitution variants of recombinant staphylokinase for single-bolus treatment of acute myocardial infarction. *Circulation* 102: 1766-1772
41. Armstrong PW, Burton JR, Palisaitis D, Thompson CR, Van de Werf F, Rose B, Collen D, Teo KK (2000) Collaborative angiographic patency trial of recombinant staphylokinase (CAPTORS). *Am Heart J* 139: 820-823
42. Armstrong PW, Burton J, Pakola S, Molhoek PG, Betriu A, Tendera M, Bode C, Adgey AA, Bar F, Vahanian A, Van de Werf F, CAPTORS II Investigators (2003) Collaborative angiographic patency trial of recombinant staphylokinase (CAPTORS II). *Am Heart J* 146: 484-488
43. Moreadith RW, Collen D (2003) Clinical development of PEGylated recombinant staphylokinase (PEG-Sak) for bolus thrombolytic treatment of patients with acute myocardial infarction. *Adv Drug Deliv Rev* 55:1337-1345
44. Marder VJ (2000) Thrombolytic therapy: 2001. *Blood Rev* 15: 143-157
45. Lian Q, Szarka SJ, Ng KK, Wong SL (2003) Engineering of a staphylokinase-based fibrinolytic agent with antithrombotic activity and targeting capability toward thrombin-rich fibrin and plasma clots. *J Biol Chem* 278: 26677-26686
46. Icke C, Schlott B, Ohlenschlager O, Hartmann M, Guhrs KH, Glusa E (2002) Fusion proteins with anticoagulant and fibrinolytic properties: functional studies and structural considerations. *Mol Pharmacol* 62: 203-209
47. Su HB, Zhang YG, He JT, Mo W, Zhang YL, Tao XM, Song HY (2004) Construction and characterization of novel staphylokinase variants with antiplatelet aggregation activity and reduced immunogenicity. *Acta Biochim Biophys Sin* 36: 336-342
48. Szemraj J, Walkowiak B, Kawecka I, Janiszewska G, Buczek W, Bartkowiak J, Chabielska E (2005) A new recombinant thrombolytic and antithrombotic agent with higher fibrin affinity – a staphylokinase variant. I. *In vitro* study. *Thromb Haemost* 22: 1538-1550
49. Wu SC, Castellino FJ, Wong SL (2003) A fast-acting, modular-structured staphylokinase fusion with Kringle-1 from human plasminogen as the fibrin-targeting domain offers improved clot lysis efficacy. *J Biol Chem* 278: 18199-18206
50. Dahiya M, Rajamohan G, Dikshit KL (2005) Enhanced plasminogen activation by staphylokinase in the presence of streptokinase beta/betagamma domains: plasminogen kringles play a role. *FEBS Lett* 579: 1565-72
51. Okada K, Lijnen HR, Moreau H, Vanderschueren S, Collen D (1996) Procoagulant properties of intravenous staphylokinase versus tissue-type plasminogen activator. *Thromb Haemost* 76: 857-859

## Staphylokinase - a specific plasminogen activator

Elżbieta Rozpończyk<sup>1,✉</sup>, Janusz Szemraj<sup>1</sup>, Mariusz Malinowski<sup>2</sup>, Jolanta Rozpończyk<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and <sup>2</sup>Department of Molecular and Medical Biophysics, and <sup>3</sup>Department of Pharmacy, Medical University of Lodz, 6/8 Mazowiecka St., 92-215 Lodz, Poland

✉e-mail: elroz2@interia.pl

**Key words:** fibrinolysis, plasmin, plasminogen, staphylokinase

### ABSTRACT

Staphylokinase is a 135 amino acid protein produced by certain strains of *Staphylococcus aureus*. It belongs to fibrin - specific plasminogen activator. Staphylokinase converts plasminogen - the inactive proenzyme - to the plasmin, which dissolves the fibrin of a blood clots. This review will focus on the biochemical and thrombolytic properties of staphylokinase and its derivatives, which would make use of treatment in acute myocardial infarction and other cardiovascular diseases.



# Odpowiedź ścisła – mechanizm adaptacyjnej odpowiedzi bakterii na warunki stresowe

## STRESZCZENIE

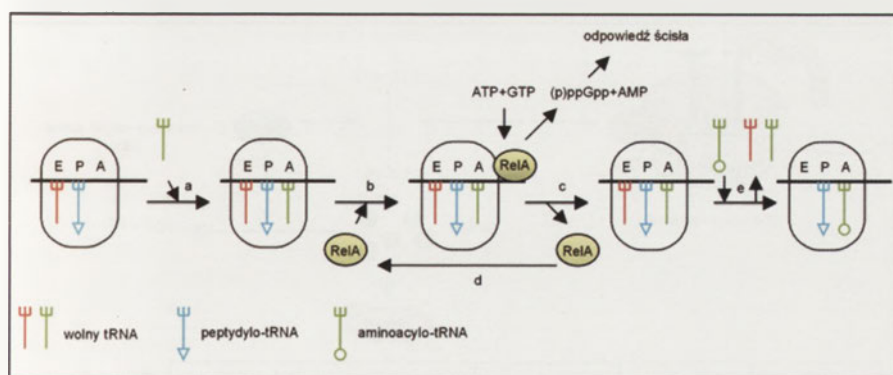
Odpowiedź ścisła stanowi jeden z kluczowych mechanizmów bakteryjnej odpowiedzi na warunki stresowe. Głód aminokwasowy, niedobór węgla, azotu czy fosforu prowadzi do wzmożonej syntezy i akumulacji alarmonów odpowiedzi ścisłej – tetra- i pentaosforanów guanozyny, w metabolizmie których kluczową rolę odgrywają białka RelA i SpoT. Nukleotydy (p)ppGpp oddziałując bezpośrednio z polimerazą RNA zmieniają aktywność transkrypcyjną niektórych genów – negatywnie regulowana jest transkrypcja genów kodujących rRNA, tRNA i białka rybosomalne, pozytywnie – genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy aminokwasów, proteolizy białek i czynnika sigma S. Wiązanie czynnika sigma S z rdzeniem polimerazy RNA nadaje jej powinowactwo do genów kodujących białka związane z przejściem komórek w stacjonarną fazę wzrostu i ich odpowiedzią na stres oksydacyjny, osmotyczny i cieplny.

## WPROWADZENIE

Wszystkie organizmy żywe wytworzyły na drodze ewolucji mechanizmy adaptacyjnej odpowiedzi na czynniki stresowe, umożliwiające im przeżycie w niesprzyjających warunkach. U bakterii, jednym z głównych mechanizmów odpowiedzi na warunki stresowe obok systemu SOS i reakcji chemotaktyjnej, jest odpowiedź ścisła (ang. *stringent response*), odkryta u *E. coli* przed ponad czterdziestoma laty [1]. Polega ona na adaptacyjnej reakcji organizmu na zmiany w dostępie pożywienia (np. głód aminokwasowy) i inne stresy środowiskowe. Wyznacznikiem odpowiedzi ścisłej jest wzmożona synteza i akumulacja tetra- i pentaosforanów guanozyny (ppGpp i pppGpp), nietypowych nukleotydów o charakterze regulatorowym, zwanych alarmonami odpowiedzi ścisłej. Nukleotydy te oddziałując bezpośrednio z polimerazą RNA prowadzą do przeprogramowania bakteryjnej aktywności transkrypcyjnej. W konsekwencji dochodzi do globalnych zmian metabolizmu komórki – hamowania procesów wymagających dużych nakładów energii oraz aktywacji mechanizmów umożliwiających adaptację i przeżycie niesprzyjających warunków [2].

## METABOLIZM (p)ppGpp

U *E. coli* synteza pppGpp odbywa się na zasadzie enzymatycznej fosforylacji GTP z użyciem ATP jako donora reszt fosforanowych. Reakcję katalizuje enzym RelA (EC: 2.7.6.5) związany z rybosomem. Ponieważ pppGpp prawdopodobnie



**Rysunek 1.** Model mechanizmu syntezy (p)ppGpp katalizowanej przez białko RelA. (a) Głód aminokwasowy prowadzi do akumulacji nienaladowanych form tRNA, które wiążą się z miejscem akceptorowym rybosomu i blokują translację; (b) RelA rozpoznaje zablokowany rybosom z wystającym 3' końcem mRNA; (c) Białko RelA katalizuje syntezę (p)ppGpp w obecności nienaladowanego tRNA w akceptorowym miejscu rybosomu, równocześnie enzym oddysocjuje od rybosomu; (d) Uwolniony enzym RelA przeskakuje na kolejny zablokowany rybosom i cykl syntezy (p)ppGpp powtarza się. Wysoki poziom (p)ppGpp indukuje odpowiedź ścisłą; (e) Po ustąpieniu stresu wzrasta pula aminoacylo-tRNA, który ze względu na wyższe powinowactwo do akceptorowego miejsca rybosomu zajmuje miejsce akceptorowe i proces translacji zostaje wznowiony. Związanie aminoacylo-tRNA do miejsca akceptorowego rybosomu prowadzi również do uwolnienia wolnego tRNA z miejsca E rybosomu. Wg [5].

Grażyna Dąbrowska<sup>✉</sup>

Justyna Prusińska

Anna Goc

Zakład Genetyki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

<sup>✉</sup>Zakład Genetyki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; e-mail: browsk@uni.torun.pl, tel. (056) 611 45 76

Artykuł otrzymano 25 lipca 2005 r.  
Artykuł zaakceptowano 28 października 2005 r.

**Słowa kluczowe:** odpowiedź ścisła, tetra- i pentaosforany guanozyny

**Wykaz skrótów:** ppGpp – tetraosforan guanozyny; pppGpp – pentaosforan guanozyny



nie jest toksyczny w wyższych stężeniach, ulega on szybkiej hydrolizie do ppGpp katalizowanej przez rybosomalne białka kodowane przez geny *gpp*. Produkt tej reakcji jest następnie rozkładany do GDP przy udziale cytozoluowego enzymu SpoT (E.C. 3.1.7.2) w roli katalizatora i kationów manganowych w roli kofaktorów. Białko SpoT, w pewnych określonych warunkach, takich jak brak węgla, azotu czy fosforu, katalizuje również reakcję syntezy pppGpp. Cały cykl metabolizmu alarmonów odpowiedzi ścisłej dopełnia rybosomalne białko kodowane przez gen *ndk* i katalizujące fosforylację GDP do GTP [2-4].

Uważa się, że czynnikiem regulującym syntezę (p)ppGpp jest stosunek aminoacylo-tRNA do wolnego, nienaładowanego tRNA. W warunkach bezstresowych, w logarytmicznej fazie wzrostu bakterii, wolny tRNA stanowi około 15% całkowitej puli tRNA, której przeważającą część stanowi wówczas aminoacylo-tRNA. W warunkach głodu aminokwasowego zawartość wolnego tRNA może wzrosnąć nawet do 80% puli tRNA, tym samym wzrasta prawdopodobieństwo jego związania z miejscem akceptorowym rybosomu. Zablockowany w ten sposób rybosom rozpoznawany jest przez białko RelA, które się z nim wiąże i katalizuje syntezę (p)ppGpp (Rys. 1). Stwierdzono, że do przyłączenia białka RelA do rybosomu niezbędna jest obecność mRNA na rybosomie, co więcej, wykazano że efektywność tego wiązania jest pozytywnie skorelowana z długością 3' końca mRNA wystającego z rybosomu. Synteza (p)ppGpp katalizowana przez RelA zależy natomiast od obecności nienaładowanego tRNA w miejscu akceptorowym rybosomu i aktywności rybosomalnego białka L11 [5]. Wykazano, że delekcja 36 aminokwasów z N-końca tego białka nie ma wpływu na efektywność wiązania RelA do rybosomu, natomiast jest wystarczająca do zablockowania syntezy (p)ppGpp [6]. Synteza (p)ppGpp wywołuje prawdopodobnie konformacyjne zmiany enzymu RelA, co prowadzi do jego odłączenia od rybosomu. Uwolnione białko rozpoznaje kolejny zablockowany rybosom i cykl syntezy (p)ppGpp się powtarza. Przywrócenie korzystnych warunków środowiska prowadzi do uzupełnienia puli aminoacylo-tRNA, który ze względu na wyższe powinowactwo do rybosomu, zajmuje miejsce wolnego tRNA w akceptorowym miejscu rybosomu i następuje wznowienie procesu translacji [5].

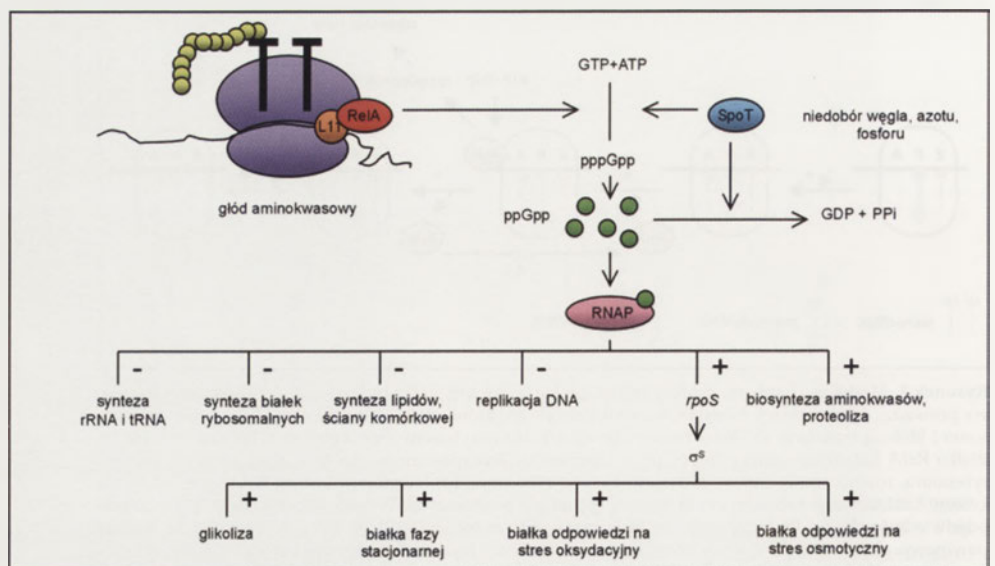
### PROCESY KOMÓRKOWE REGULOWANE PRZEZ ODPOWIEŹ ŚCISŁĄ

W warunkach stresowych akumulacja alarmonów odpowiedzi ścisłej inicjuje globalne zmiany w komórkowym metabolizmie: reguluje ekspresję genów przede wszystkim na poziomie transkrypcji [7-27], hamuje wzrost i podziały komórkowe [2,28,29], wpływa na procesy rekombinacji i naprawy DNA [30], wywołuje różne formy bakteryjnej adaptacji do warunków stresowych, takie jak zmiana właściwości wirulencyjnych, in-

dukacja syntezy antybiotyków, zmiana kształtu i wielkości komórek [31-36].

Powstające w warunkach stresu czy głodu alarmony odpowiedzi ścisłej regulują procesy transkrypcji poprzez bezpośrednie oddziaływanie z C-końcem podjednostki  $\beta$  oraz N-końcem podjednostki  $\beta'$  bakteryjnej polimerazy RNA [7,8]. Wyniki badań krystalicznej struktury polimerazy RNA w kompleksie z ppGpp wykazały, że nukleotydy te mogą wiązać się z enzymem w pobliżu jego miejsca aktywnego w dwóch alternatywnych orientacjach oznaczonych jako 3' i 5', w zależności od tego, które grupy difosforanowe – przy 3' czy 5' węgla cząsteczki ppGpp – ustawione są proksymalnie w stosunku do reszt kwasu asparaginowego centrum aktywnego enzymu. Prawdopodobnie orientacja ppGpp związanego z polimerazą RNA determinuje typ regulacji procesu transkrypcji [9].

Głównym fizjologicznym efektem działania odpowiedzi ścisłej jest zahamowanie wzrostu i podziałów komórek, w związku z czym transkrypcja genów kodujących rRNA, tRNA i białka rybosomalne, czyli cały aparat translacyjny, regulowana jest negatywnie (Rys. 2). Hamowana jest również transkrypcja genów kodujących białka biorące udział w syntezie lipidów czy elementów ściany komórkowej. Pozytywnej regulacji podlegają geny kodujące enzymy szlaku biosyntezy aminokwasów (operon tryptofanowy, histydynowy) i proteolizy białek [10,11]. Indukowana jest również transkrypcja genów *rpoS* kodujących czynniki sigma S ( $\sigma^S$ ) [12]. Przyłączenie czynnika  $\sigma^S$  do rdzenia polimerazy RNA nadaje jej powinowactwo do promotorów genów kodujących białka odpowiedzialne za przejście komórek w stacjonarną fazę wzrostu i niezbędne do przetrwania warunków stresowych [12,13]. Celem takiego przeprogramowania bakteryjnej aktywności transkrypcyjnej jest oszczędność energii poprzez ograniczenie syntezy białek i elementów maszynierii biorącej udział w ich syntezie. Jednoczesne przejście komórek w stacjonarną fazę wzrostu sprawia, że stają się mniej wrażliwe na podwyższoną temperaturę [14],  $H_2O_2$ , czy wysoką osmolarność środowiska [15].



Rysunek 2. Model bakteryjnego mechanizmu odpowiedzi ścisłej, wg [10].



Tabela 1. Mechanizmy negatywnej regulacji transkrypcji przez ppGpp [10,16-20].

Tworzenie kompleksu otwartego	wykazano, że obecność ppGpp różnie wpływa na tempo tworzenia kompleksu otwartego różnych promotorów
Stabilność otwartego kompleksu	wiązanie ppGpp do polimerazy RNA bezpośrednio destabilizuje otwarte kompleksy promotorowe wszystkich genów, natomiast negatywnie regulowane są tylko te promotory, których otwarte kompleksy istotnie charakteryzują się niską stabilnością – np. promotory genów rRNA
Oczyszczanie promotora	badania promotora $\lambda P_R$ wykazały, że negatywny efekt ppGpp wynika przede wszystkim ze zmniejszenia tempa tzw. oczyszczania promotora, etapu, w którym kończy się inicjacja, a rozpoczyna elongacja transkrypcji i polimeraza RNA opuszcza promotor
Pauzowanie	ppGpp zwiększa pauzowanie pol RNA w czasie elongacji transkrypcji
Współzawodnictwo pomiędzy ppGpp i substratami NTP	ppGpp konkuruje z substratami NTP o centrum aktywne polimerazy RNA
Parowanie z cytozynami	wiązanie ppGpp do pol RNA w orientacji 3' umożliwia parowanie tego nukleotydu z resztami cytozyny w bogatym w GC regionie promotora na niematrycowej nici DNA

## MODELE REGULACJI TRANSKRYPCJI PRZEZ (p)ppGpp

Powstało kilka modeli mechanizmu pozytywnej jak i negatywnej regulacji transkrypcji w warunkach odpowiedzi ścisłej. Różne mechanizmy negatywnej regulacji poprzez ppGpp (Tab. 1) wzajemnie się nie wykluczają, mogą dotyczyć różnych genów, mogą też współdziałać ze sobą [10,16-20]. Fakt, że w systemie transkrypcyjnym *in vitro*, ppGpp nie stymulowało transkrypcji z promotorów genów kodujących enzymy szlaków biosyntezy aminokwasów sugeruje, że wpływ tych nukleotydów na pozytywną regulację transkrypcji nie jest bezpośredni i wymaga dodatkowych czynników pośredniczących w tym procesie lub specyficznych warunków. Zaproponowano więc model, w którym destabilizacja otwartych kompleksów promotorów rRNA prowadzi do uwolnienia polimerazy RNA i tym samym zwiększa jej dostępność dla promotorów genów szlaków biosyntezy aminokwasów w związku z czym są one pozytywnie regulowane. Najnowsze badania wskazują jednak, że w kontroli transkrypcji regulowanej przez odpowiedź ścisłą oprócz (p)ppGpp, zarówno pozytywnie jak i negatywnie, bierze również udział czynnik transkrypcyjny – białko DksA. W jego obecności (p)ppGpp pozytywnie regulują *in vitro* transkrypcję z promotorów genów szlaków biosyntezy amino-

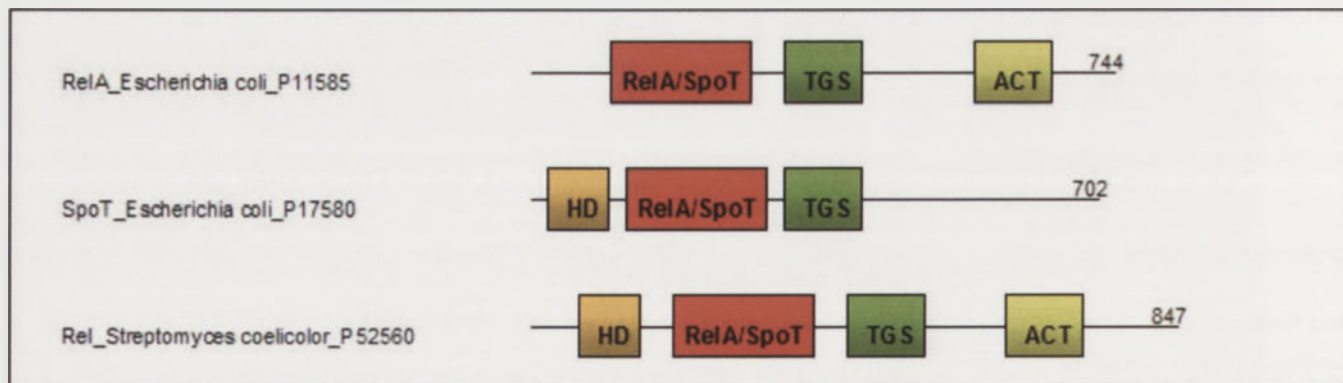
kwasów. Wykazano również, że białko DksA nie wiąże się z DNA lecz z polimerazą RNA i wzmacnia bezpośredni negatywny efekt (p)ppGpp na aktywność promotorów rRNA [21-23].

Stwierdzono również, że (p)ppGpp aktywuje geny, których promotory zależne są od alternatywnych czynników sigma ( $\sigma^{32}$ ,  $\sigma^5$ ,  $\sigma^{54}$ ) (Tab. 2) [12,13,24-26]. Aktywacja ta oparta jest na regulacji współzawodnictwa pomiędzy tymi alternatywnymi czynnikami a czynnikiem  $\sigma^{70}$  o rdzeń polimerazy RNA. Czynniki  $\sigma^{70}$  odpowiedzialny jest za inicjację transkrypcji większości genów w fazie logarytmicznego wzrostu komórek. W warunkach głodu dochodzi do akumulacji alternatywnych czynników sigma, a obecność (p)ppGpp drastycznie redukuje frakcję czynników  $\sigma^{70}$  związanych z rdzeniem polimerazy. W konsekwencji hamowana jest transkrypcja genów, których promotory zależą od  $\sigma^{70}$  (geny metabolizmu podstawowego, np. rRNA), a stymulowana transkrypcja genów zależnych od czynników  $\sigma^{32}$ ,  $\sigma^5$ ,  $\sigma^{54}$  i zaangażowanych w obronę przed stresem. Jednak nie wszystkie geny zależne od  $\sigma^{70}$  podlegają negatywnej regulacji przez (p)ppGpp, pozytywnie regulowane są geny kodujące białka zaangażowane w syntezę aminokwasów (np. operon histydynowy). Mechanizm współzawodnictwa czynników sig-

Tabela 2. Charakterystyka czynników sigma regulowanych przez (p)ppGpp.

Typ czynnika sigma	Gen kodujący	Geny regulowane przez czynnik sigma	Dowody na zależność czynnika sigma od (p)ppGpp [Piśmiennictwo]	Typ regulacji czynnika sigma przez (p)ppGpp
$\sigma^{70}$ ( $\sigma^D$ )	rpoD	metabolizmu podstawowego	(p)ppGpp redukuje frakcję czynników $\sigma^{70}$ związanych z rdzeniem polimerazy RNA [24]	pozytywna negatywna
$\sigma^{32}$ ( $\sigma^{H1}$ )	rpoH	odpowiedzi na szok cieplny	mutanty charakteryzujące się brakiem lub niskim poziomem (p)ppGpp wykazują opóźnioną ekspresję genów szoku cieplnego zależnych od $\sigma^{32}$ [25]	pozytywna
$\sigma^{54}$ ( $\sigma^N$ )	rpoN	zaangażowane w wykorzystywanie alternatywnych źródeł węgla	efektywność induktorów promotorów Po i Pu zależnych od $\sigma^{54}$ jest pozytywnie skorelowana z poziomem (p)ppGpp [26]	pozytywna
$\sigma^5$ ( $\sigma^5$ )	rpoS	determinujące przejście w stacjonarną fazę wzrostu	mutanty relA-, spoT- wykazują fenotyp charakterystyczny dla rpoS-, co wskazuje na zależność produkcji $\sigma^5$ od obecności (p)ppGpp [12] (p)ppGpp wpływają również na aktywność $\sigma^5$ , bowiem do indukcji promotorów zależnych od $\sigma^5$ , nawet w obecności wysokiego poziomu $\sigma^5$ konieczna jest dodatkowo obecność (p)ppGpp [13]	pozytywna





Rysunek 3. Struktura domenowa białek RelA, SpoT i Rel, na podstawie danych bazy Pfam 18.0 [40].

ma opiera się na destabilizacji otwartych kompleksów transkrypcyjnych poprzez wiązanie ppGpp do polimerazy RNA, odłączeniu polimerazy RNA od promotorów tworzących wewnętrznie niestabilne otwarte kompleksy (np. *rrnP1*) i wzroście puli wolnego enzymu dostępnego do inicjacji transkrypcji z promotorów relatywnie słabo wiążących pol RNA (promotory zależne od alternatywnych czynników sigma). Wykazano również, że (p)ppGpp nie jest niezastąpiony w regulacji współzawodnictwa między czynnikami sigma o rdzeń polimerazy RNA. Obniżenie produkcji  $\sigma^{70}$ , nadprodukcja czynnika anty- $\sigma^{70}$  (Rsd) czy produkcja białka  $\sigma^{70}$  ze zredukowaną zdolnością wiązania polimerazy RNA umożliwiają transkrypcję z promotorów zależnych od  $\sigma^S$  i  $\sigma^{24}$ , nawet przy braku (p)ppGpp [10,25,27].

#### UDZIAŁ (p)ppGpp W PROCESACH REPLIKACJI, REKOMBINACJI I NAPRAWY DNA

Wykazano również udział odpowiedzi ścisłej w bakterijskich procesach replikacji [2,28,39], rekombinacji i naprawy DNA [33]. U *E. coli* zaobserwowano korelację między wzmożoną produkcją i akumulacją (p)ppGpp podczas stresu głodowego a spowolnieniem replikacji z *oriC* poprzez negatywną regulację ekspresji genu *dnaA*, kodującego białko inicjatorowe tego procesu [2,28]. U *Bacillus subtilis* stwierdzono, że odpowiedź ścisła hamuje replikację nie na etapie jej inicjacji jak to jest u *E. coli*, ale w wyniku regulowanej terminacji zachodzącej w charakterystycznych miejscach terminatorowych zwanych *stringent terminators* (*Ster*), znajdujących się między 100 a 200 kbp po obu stronach *oriC*. Do terminacji replikacji w obrębie tych terminatorów niezbędna jest obecność białka RTP zaangażowanego w terminację w normalnych warunkach. Po zniesieniu odpowiedzi ścisłej replikacja postępuje dalej od miejsca wcześniejszego zablokowania [28,29].

Alarmony odpowiedzi ścisłej biorą również udział w naprawie uszkodzeń DNA poprzez rekombinację homologiczną. Wykazano, że wzmożona produkcja (p)ppGpp prowadzi do wzrostu przeżywalności szczepów *E. coli* nieprodukujących resolwazy RuvABC, a traktowanych promieniowaniem UV. Uważa się, że przyłączenie (p)ppGpp do polimerazy RNA zatrzymanej w miejscu uszkodzenia DNA prowadzi do destabilizacji i rozdzielenia kompleksu elongacyjnego. Ekspozycja miejsca uszkodzenia umożliwia jego naprawę, w której bierze udział helikaza RecG formu-

jąca strukturę Hollidaya z zablokowanych w miejscu uszkodzenia widełek replikacyjnych oraz białko PriA inicjujące ponowny start replikacji. Warto podkreślić, że u *E. coli*, gen *recG* znajduje się w jednym operonie z genem *spoT* [30].

#### UDZIAŁ (p)ppGpp W AKTYWACJI RÓŻNYCH FORM BAKTERYJNEJ ADAPTACJI DO WARUNKÓW STRESOWYCH

Wykazano, że (p)ppGpp inicjuje programy rozwojowe bakterii krytyczne dla przeżycia okresów głodu i innych niesprzyjających warunków środowiska. U *Mycococcus xanthus* synteza (p)ppGpp inicjuje powstawanie wielokomórkowego ciała odżywczego „fruiting body”, które różnicuje się w spory odporne na stresy środowiskowe [31]. Akumulacja alarmonów odpowiedzi ścisłej u *Streptomyces coelicolor* indukuje syntezę antybiotyku – aktynomycyny. Stwierdzono bowiem, że w warunkach głodu szczepy rozluźnione (*relA*-) wykazują brak syntazy aktynomycyny I, głównego enzymu szlaku biosyntezy tego antybiotyku [32]. Podobnie regulowana jest synteza kolicyny K u *E. coli* [33]. Potwierdzono również rolę odpowiedzi ścisłej w aktywacji wirulencji bakterii patogennych. U *Legionella pneumophila*, pasożyta płuc, wysoki poziom (p)ppGpp inicjuje pięć wyznaczników przejścia tej bakterii z formy replikatywnej w formę wirulencyjną, a należą do nich: cytotoksyczność, ruchliwość (wytworzenie rzęsek), wrażliwość na jony sodowe, odporność na stres osmotyczny i zdolność do unikania degradacji lizosomalnej. Dzięki nabyciu tych cech bakterie mogą opuścić organizm gospodarza, rozprzestrzenić się w środowisku i znaleźć sprzyjającą niszę dla replikacji. W aktywacji wirulencji *L. pneumophila* bierze udział jeszcze dodatkowy czynnik, gdyż wykazano, że mutanty Lp120, mimo indukowanego akumulacją (p)ppGpp przejścia w stacjonarną fazę wzrostu, nie wykazują żadnej z cech będących wyznacznikiem przejścia w fazę wirulencji [34]. Stwierdzono również udział (p)ppGpp w długoterminowej bezobjawowej przeżywalności bakterii *Mycobacterium tuberculosis* w organizmie gospodarza. W stanie uśpienia komórki tego pasożyta izolowane są w masie komórek limfoidalnych, a dostęp do składników odżywczych i tlenu jest ograniczony. Wykazano, że przeżywalność *in vitro* mutantów *relA*- tego pasożyta płuc była znacznie obniżona w trakcie przedłużonego okresu niedoboru składników odżywczych i tlenu w porównaniu z bakteriami szczepu dzikiego [35]. Co więcej wykazano, że komórki tego pasożyta znajdujące się w fazie



Tabela 3. Porównanie sekwencji domen HD pomiędzy przedstawicielami bakteryjnych białek odpowiedzi ścisłej; na podstawie [41].

Grupa	Organizm, białko	Zachowane w ewolucji motywy domeny HD								
		I	II	III	IV	V				
RelA	Escherichia_RelA	38 TWAYCLDQ-TQGHPSASL 17 DTLP	LLPLADA 5	DVLRESV	KSVVNLHGV 10	AT-HTDSVSSEQVDNVRMLLA 6	CVVIKLAERIAHL 584			
SpoT	Escherichia_SpoT	30 ARDA	EGQ-TRSS	EPYI 17	ETL	LLPLADA 5	QDMEQLF	KVAELVEGV 10	K-----KELAQENFRKMIMA 6	VILIKLARLTHNM 558
Rel	Streptomyces_Rel	133 AERB	IRGQ-KRKS	DPYI 17	AT	LLPLADA 5	EDLRDF	QVVTLLVDGV 9	-----EAAQETVRKVMVA 6	VLVIKLAARLHNM 246

Przedstawiono pięć motywów domeny HD, numer na początku i końcu sekwencji wskazuje pozycję pierwszego i ostatniego aminokwasu domeny; numery pomiędzy motywami wskazują liczbę aminokwasów znajdujących się pomiędzy nimi, a nieuwzględnionych na rysunku; kolorem czerwonym zaznaczono wysoce konserwowane reszty histydyny i kwasu asparaginowego; kolorem żółtym zaznaczono konserwowane hydrofobowe reszty aminokwasowe, a kolorem niebieskim – konserwowane reszty aminokwasów o krótkich łańcuchach węglowodorowych.

uśpienia, charakteryzują się sferycznym kształtem – podobnie jak głodzone *in vitro* komórki jego bliskiego, niepatogenicznego krewniaka – *Mycobacterium smegmatis*, które zmieniają swój kształt z wydłużonego w sferyczny. Zmiana kształtu komórek będąca konsekwencją akumulacji (p)ppGpp sugeruje znaczącą rolę tych nukleotydów w transformacji komórek aktywnych w uśpione [36].

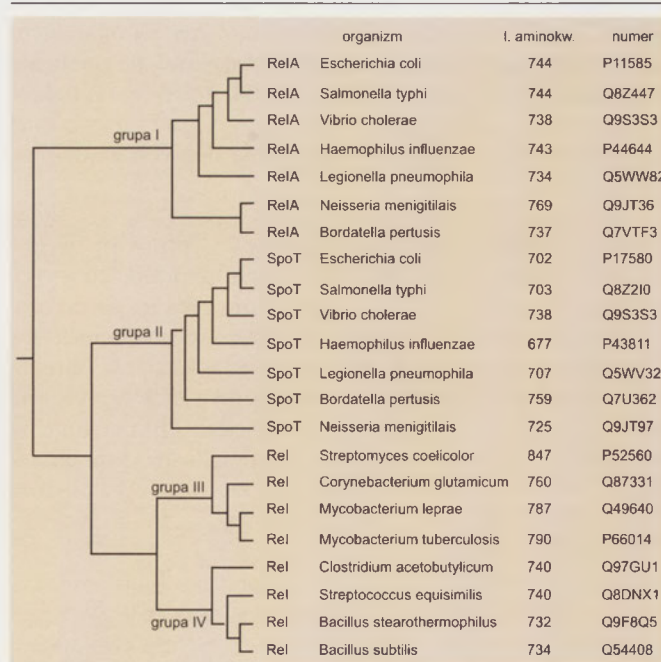
### STRUKTURA I EWOLUCJA BIAŁEK ZAANGAŻOWANYCH W BAKTERYJNĄ ODPOWIEDŹ ŚCISŁĄ

Bakterie Gram ujemne posiadają dwa białka, RelA i SpoT, biorące udział w syntezie i degradacji (p)ppGpp. Analiza sekwencji aminokwasowych obu tych enzymów u *E. coli* wykazała ich wysoką homologię [2,4]. Bakterie Gram dodatnie posiadają tylko jedno białko Rel, wykazujące aktywność zarówno syntetazy jak i hydrolazy (p)ppGpp [37-39].

Porównanie struktury domenowej białek RelA, SpoT i Rel (Rys. 3) wskazuje na obecność w ich obrębie charakterystycznej domeny RelA/SpoT o nieznannej funkcji oraz domeny TGS, której rola polega na wiązaniu nukleotydów GTP/ATP. Ponadto w obrębie białek Rel i SpoT występuje domena HD, charakterystyczna dla fosfohydrolaz metalozależnych i odpowiedzialna za właściwości hydrolazy (p)ppGpp tych białek. W obrębie tej domeny występuje pięć charakterystycznych motywów. Trzy z nich, pierwszy, drugi i piąty, zawierają wysoce konserwowane reszty histydyny i kwasu asparaginowego. Stwierdzono, że w białku RelA, w obrębie przewidywanej katalitycznej części domeny HD, występują substytucje, które prowadzą do jego dezaktywacji. Najczęstszą substytucją występującą w obrębie domeny HD białek RelA jest zamiana kodonu kwasu asparaginowego na kodon proliny, aminokwasu wpływającego na fałdowanie białek (Tab. 3, motyw II). Brak aktywnej domeny fosfohydrolitycznej w obrębie RelA tłumaczy, dlaczego białka te nie rozkładają (p)ppGpp [41]. Dodatkowo w strukturze białek RelA i Rel znajduje się domena ACT, charakterystyczna dla enzymów regulowanych stężeniem aminokwasów, a jej funkcja polega na wiązaniu ligandów, którymi w przypadku białek RelA i Rel są prawdopodobnie nukleotydy GTP [42].

Bazując na wiedzy dotyczącej enzymatycznych właściwości białek RelA, SpoT i Rel zaproponowano model ich ewolucji w obrębie bakterii. Filogenetyczna analiza ortologów genów kodujących te białka ułatwiła ich klasyfikację w cztery główne grupy (Rys. 4). Pierwsze dwie to grupy RelA (I) i SpoT (II) charakterystyczne dla bakterii Gram ujemnych należących do  $\beta$  oraz  $\gamma$  grupy proteobakterii. Stwierdzono

przy tym separację tych białek w ewolucji wynikającą prawdopodobnie z braku – u RelA, a obecności – u SpoT, aktywności hydrolazy (p)ppGpp, co w efekcie bardziej zbliża białka SpoT do białek Rel. Pozostałe dwie obejmują białka Rel bakterii Gram dodatnich grupy *Actinobacteria* (III) i grupy *Bacillus/Clostridium* (IV). Proponowany model przewiduje, iż wspólny przodek proteobakterii grup  $\beta$  i  $\gamma$  posiadał gen *rel* o strukturze charakterystycznej dla grupy *Actinobacteria* (III). Następnie w wyniku duplikacji powstały dwie kopie tego genu, z których jedna w ramach adaptacji do warunków braku węgla i fosforu ewoluowała do *spoT*. Adaptacja drugiej kopii do warunków głodu aminokwasowego polegała na dezaktywacji domeny HD pociągającej za sobą utratę aktywności hydrolitycznej i doprowadziła do powstania genu *relA* [43]. Przedstawiony model ewolucji prokariotycznych białek RelA i SpoT pozostaje zgodny z nowym modelem liniowej ewolucji bakterii, według którego grupa  $\gamma$  proteobakterii stanowi najmłodsze ogniwo ewolucyjne tych mikroorganizmów [44]. Co ciekawe, geny kodujące syntetazy (p)ppGpp nie występują w żadnym z kompletnie zsekwencjonowanych genomów archeobakterii [43]. Prawdopodobnie tłumaczy to fakt, iż celem działania (p)ppGpp jest polimeraza RNA typu bakteryjnego, natomiast archeobakterie posiadają aparat transkrypcyjny zbliżony do eukariotycznego [45].



Rysunek 4. Drzewo filogenetyczne przedstawiające stopień pokrewieństwa między przewidywanymi sekwencjami aminokwasowymi bakteryjnych białek RelA, SpoT i Rel; analizę wykonano w programie ClustalW na podstawie danych bazy Pfam 18.0.



## (p)ppGpp U Eukaryota

Nukleotydy o charakterze regulatorowym, takie jak cAMP czy cGMP, stanowią elementy łańcucha transdukcji sygnału zarówno u *Prokaryota* jak i *Eukaryota*. Odkrycie (p)ppGpp u bakterii skłoniło licznych badaczy do poszukiwań tych nukleotydów u wyższych organizmów. Nie powiodły się próby znalezienia ich u *Neurospora crassa*. Natomiast badania w komórkach ssaków nie dały jednoznacznych wyników [46]. W 1977 roku Pao i in. [47] wykazali natomiast akumulację (p)ppGpp u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* poddanych warunkom szoku cieplnego i zupełny ich brak w komórkach hodowanych w temperaturze pokojowej. Autorzy doświadczenia przeprowadzili również testy wykluczające ewentualną kontaminację komórek drożdżowych bakteriami, która mogłaby doprowadzić do otrzymania wyników fałszywie pozytywnych. Co więcej zasugerowali, że miejscem syntezy tych nukleotydów są mitochondria, jednak nie dali żadnego bezpośredniego dowodu na poparcie tej teorii. W czasie ostatnich kilku lat nukleotydy (p)ppGpp, a także geny kodujące białka biorące udział w ich metabolizmie zidentyfikowano również u glonu *Chlamydomonas reinhardtii* oraz kilku roślin wyższych, między innymi *Arabidopsis thaliana* i *Nicotiana tabacum*. Wyniki przeprowadzonych do tej pory badań sugerują, iż miejsce działania roślinnej odpowiedzi ściślej stanowi chloroplast, a sam mechanizm przypomina bakteryjny i również związany jest z odpowiedzią na warunki stresowe [46-51].

## PODSUMOWANIE

Cztery dekady od odkrycia mechanizmu odpowiedzi ściślej u *E. coli* doprowadziły do identyfikacji genów kodujących kluczowe enzymy tego procesu u większości badanych pod tym kątem przedstawicieli świata *Prokaryota*. Wykazano, że alarmy odpowiedzi ściślej regulują metabolizm komórek bakteryjnych na różnych poziomach, wpływają na procesy replikacji, transkrypcji i rekombinacji DNA, a także na właściwości wirulencyjne bakterii patogennych. Biorąc pod uwagę fakt, że jak dotąd u ssaków nie udało się stwierdzić obecności homologów białek RelA/SpoT, bakteryjne enzymy odpowiedzi ściślej mogą w przyszłości stać się potencjalnym celem oddziaływania nowych leków antybakteryjnych.

Liczne próby stwierdzenia obecności (p)ppGpp u *Eukaryota* doprowadziły natomiast do ich identyfikacji u niektórych gatunków drożdży, glonów oraz roślin wyższych. Przeprowadzone badania wskazują na wysoce konserwowany charakter mechanizmu odpowiedzi ściślej w obrębie tych organizmów, na co z pewnością znaczący wpływ ma przewidywana lokalizacja tej odpowiedzi odpowiednio w mitochondriach i chloroplastach – organellach, które wg teorii endosymbiotycznej właśnie od bakterii się wywodzą.

## PIŚMIENICTWO

1. Stent GS, Brenner S (1961) A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47: 2005-2014
2. Cashel M, Gentry DR, Hernandez VJ, Vinella D (1996) The stringent response, W: Neidhardt FC (red) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, t I. ASM Press, Washington, str. 1458-1496

3. Murray KD, Bremer H (1996) Control of spoT-dependent ppGpp synthesis and degradation in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 259: 41-57
4. Metzger S, Sarubbi E, Glaser G, Cashel M (1989) Protein sequences encoded by the relA and the spoT genes of *Escherichia coli* are inter-related. *J Biol Chem* 264: 9122-9125
5. Wendrich TM, Blaha G, Wilson DN, Marahiel MA, Nierhaus KH (2002) Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol Cell* 10: 779-788
6. Yang X, Ishiguro E (2001) Involvement of the N terminus of ribosomal protein L11 in regulation of the RelA protein of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 6532-6537
7. Chatterji D, Fujita N, Ishihama A (1998) The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the  $\beta$ -subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes Cells* 3: 279-287
8. Touloukhonov I, Shulgina I, Hernandez VJ (2001) Binding of the transcription effector ppGpp to *Escherichia coli* RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N terminus of the  $\beta'$ -subunit. *J Biol Chem* 276: 279-287
9. Artsimovitch I, Patlan V, Sekine S, Vassylueva MN, Hosaka T, Ochi K, Yokoyama S, Vassylyev DG (2004) Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell* 117: 299-310
10. Magnusson LU, Farewell A, Nystrom T (2005) ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* 13: 236-242
11. Barker MM, Gaal T, Josaitis CA, Gourse RL (2001) Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*. *Mol Biol* 26: 673-88
12. Gentry DR, Hernandez VJ, Nguyen LH, Jensen DB, Cashel M (1993) Synthesis of the stationary-phase sigma factor  $\sigma^S$  is positively regulated by ppGpp. *J Bacteriol* 175: 7982-7989
13. Kvint K, Farawell A, Nystrom T (2000) RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate even in the presence of high levels of  $\sigma^S$ . *J Biol Chem* 275: 14795-14798
14. Grossman AD, Taylor WE, Burton ZF, Burgess RR, Gross CA (1985) Stringent response in *Escherichia coli* induces expression of heat shock proteins. *J Mol Biol* 186: 357-365
15. Hengge-Aronis R (1996) Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 21: 887-893
16. Barker MM, Gaal T, Gourse RL (2001) Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. *Mol Biol* 26: 689-702
17. Portrykus K, Węgrzyn G, Hernandez VJ (2002) Multiple mechanisms of transcription inhibition by ppGpp at the  $\lambda p_R$  promoter. *J Biol Chem* 15: 43785-91
18. Paul BJ, Ross W, Gaal T, Gourse RL (2004) rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 38: 749-70
19. Wagner R (2002) Regulation of ribosomal RNA synthesis in *E. coli*: effects of the global regulator guanosine tetraphosphate (ppGpp). *J Mol Microbiol Biotechnol* 4:331-40
20. Jores L, Wagner R (2003) Essential steps in the ppGpp-dependent regulation of bacterial ribosomal RNA promoters can be explained by substrate competition. *J Biol Chem* 9: 16834-43
21. Perederina A, Svetlov V, Vassyleva MN, Tahirov TH, Yokoyama S, Artsimovitch I, Vassylyev DG (2004) Regulation through the secondary channel-structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell* 1118: 297-309
22. Vrentas CE, Gaal T, Ross W, Ebricht RH, Gourse RL (2005) Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the  $\omega$  subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes Dev* 19: 2378-2387
23. Paul BJ, Berkmen MB, Gourse RL (2005) DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc Natl Sci U S A* 31: 7823-7828



24. Hernandez VJ, Cashel M (1995) Changes in conserved region 3 of *Escherichia coli*  $\sigma^{70}$  mediate ppGpp-dependent functions in vivo. *J Mol Biol* 252: 536-549
25. Jishage M, Kvint K, Shingler V, Nystrom T (2002) Regulation of sigma competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev* 16: 1260-1270
26. Carmona M, Rodriguez MJ, Martinez-Costa O, de Lorenzo V (2000) *In vivo* and *in vitro* effects of (p)ppGpp on the  $\sigma^{34}$  promoter Pu of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 182: 4711-4718
27. Nystrom T (2004) Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition? *Mol Microbiol* 54: 855-862
28. Chatterji D, Ojha AK (2001) Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr Opin Microbiol* 4: 160-165
29. Autret S, Levine A, Vannier F, Fujita Y, Seror SJ (1999) The replication checkpoint control in *Bacillus subtilis*: identification of a novel RTP-binding sequence essential for the replication fork arrest after induction of the stringent response. *Mol Microbiol* 31: 1665-1679
30. McGlynn P, Lloyd RG (2000) Modulation of RNA polymerase by (p)ppGpp reveals a RecG-dependent mechanism for replication fork progression. *Cell* 101: 35-45
31. Harris BZ, Kaiser D, Singer M (1998) The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in *Mycococcus xanthus*. *Genes Dev* 1: 1022-35
32. Hoyt S, Jones GH (1999) RelA is required for actinomycin production in *Streptomyces antibioticus*. *J Bacteriol* 181: 3824-3829
33. Kuhar I, Zgur-Bertok D (1999) Transcription regulation of the colicin K *cka* gene reveals induction of colicin synthesis by differential responses to environmental signals. *J Bacteriol* 181: 7373-7380
34. Hammer BK, Swanson MS (1999) Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol Microbiol* 33: 721-731
35. Primm TP, Andersen SJ, Mizrahi V, Avarbock D, Rubin H, Barry CE III (2000) The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J Bacteriol* 182: 4889-4898
36. Ojha AK, Mukherjee TK, Chatterji D (2000) High intracellular level of guanosine tetraphosphate in *Mycobacterium smegmatis* changes the morphology of the bacterium. *Infect Immun* 68: 4084-4091
37. Wehmeier L, Schafer A, Burkovski A, Kramer R, Mechold U, Malke H, Puhler A, Kalinowski J (1998) The role of the *Corynebacterium glutamicum* *rel* gene in (p)ppGpp metabolism. *Microbiology* 144: 1853-1862
38. Avarbock D, Salem J, Li LS, Wang ZM, Rubin H (1999) Cloning and characterization of a bifunctional *relA/spoT* homologue from *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene* 233: 261-269
39. Wendrich TM, Beckering CL, Marahiel MA (2000) Characterization of the *relA/spoT* gene from *Bacillus stearothermophilus*. *FEMS Microbiol Lett* 190: 195-201
40. Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL, Studholme DJ, Yeats C, Eddy SR (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 32: D138-41
41. Aravind L, Koonin EV (1998) The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem Sci* 23: 469-472
42. Gentry DR, Cashel M (1996) Mutational analysis of the *Escherichia coli* *spoT* gene identifies distinct but overlapping regions involved in ppGpp synthesis and degradation. *Mol Microbiol* 19: 1373-1384
43. Mittenhuber G (2001) Comparative genomics and evolution of genes encoding bacterial (p)ppGpp synthetases/hydrolases (the Rel, RelA and SpoT proteins). *J Mol Microbiol Biotechnol* 3: 585-600
44. Gupta RS (2000) The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 24: 367-402
45. Langer D, Hain J, Thuriaux P, Zillig W (1995) Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5768-5772
46. Silverman RH, Atherly AG (1979) The search for guanosine tetraphosphate (ppGpp) and other unusual nucleotides in eukaryotes. *Microbiol Rev* 1: 27-41
47. Pao CC, Paietta J, Gallant JA (1977) Synthesis of guanosine tetraphosphate (magic *spoT* I) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 74: 314-322
48. Van der Biezen EA, Sun J, Coleman MJ, Bibb MJ, Jones JD (2000) *Arabidopsis* RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3747-3752
49. Kasai K, Usami S, Yamada T, Endo Y, Ochi K, Tozawa Y (2002) A RelA/SpoT homolog (Cr-RSH) identified in *Chlamydomonas reinhardtii* generates stringent factor *in vivo* and localizes to chloroplasts *in vitro*. *Nucleic Acids Res* 30: 4985-4992
50. Givens RM, Lin M, Taylor DJ, Mechold U, Berry JO, Hernandez VJ (2004) Inducible expression, enzymatic activity, and origin of higher plant homologues of bacterial RelA/SpoT stress proteins in *Nicotiana tabacum*. *J Biol Chem* 279: 7495-7504
51. Takahashi K, Kasai K, Ochi K (2004) Identification of the bacterial alarmone guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4320-4324

## The stringent response – bacterial mechanism of an adaptive stress response

Grażyna Dąbrowska<sup>✉</sup>, Justyna Prusińska, Anna Goc

Department of Genetics, Institute of General and Molecular Biology, Nicolaus Copernicus University, 9 Gagarina St., 87-100 Toruń, Poland  
<sup>✉</sup>e-mail: browska@uni.torun.pl

**Key words:** stringent response, guanosine tetra- and pentaphosphates

### ABSTRACT

The stringent response is a key regulatory reaction exhibited by bacteria in response to amino acid deprivation or carbon, nitrogen and phosphate limitation. In *E. coli*, the products of the *relA* and *spoT* genes regulate accumulation of the effector molecules of the stringent response – guanosine tetra- and pentaphosphates (ppGpp and pppGpp respectively). These unusual hyperphosphorylated nucleotides bind directly to the bacterial RNA polymerase and change transcriptional activity of some genes – transcription repression of genes associated with the translational apparatus and the simultaneous upregulation of genes encoding metabolic enzymes, especially those involved in amino acid biosynthesis, protein hydrolysis and coding for the sigma S factor. Sigma S factor binds to the core of the bacterial RNA polymerase and induce stationary-phase-specific and stress-response-specific genes expression.



# Roślinny mechanizm adaptacyjnej odpowiedzi na warunki stresowe homologiczny do odpowiedzi ścisłej bakterii

Grażyna Dąbrowska<sup>✉</sup>

Justyna Prusińska

Anna Goc

Zakład Genetyki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

<sup>✉</sup>Zakład Genetyki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; e-mail: brownsk@uni.torun.pl, tel. (056) 611 45 76

Artykuł otrzymano 25 lipca 2005

Artykuł zaakceptowano 24 października 2005

**Słowa kluczowe:** odpowiedź ścisła, tetra- i pentafosforany guanozyny

**Wykaz skrótów:** ppGpp – tetrafosforan guanozyny, pppGpp – pentafosforan guanozyny

## STRESZCZENIE

Wszystkie organizmy żywe wytworzyły na drodze ewolucji mechanizmy adaptacyjnej odpowiedzi na warunki stresowe. Jeden z kluczowych, odkryty u *E. coli*, stanowi odpowiedź ścisła. W ciągu ostatnich pięciu lat zidentyfikowano nie tylko roślinne homologi bakteryjnych genów odpowiedzi ścisłej – RSH (ang. *relA/spoT homologues*), ale również w obrębie chloroplastów produkty ich aktywności, nietypowe nukleotydy o charakterze regulatorowym – tetra- i pentafosforany guanozyny ((p)ppGpp). Co więcej, w chloroplastach roślin stwierdzono wzmożoną ich akumulację w wyniku działania biotycznych i abiotycznych czynników stresowych oraz hormonów roślinnych. Ponadto wykazano, że w warunkach *in vitro* zarówno ppGpp, jak i pppGpp hamują aktywność chloroplastowej polimerazy RNA. Wydaje się, że odpowiedź ścisła roślin stanowi konserwowany mechanizm odpowiedzi na warunki stresowe odbywający się poprzez regulację ekspresji genomu chloroplastowego i co za tym idzie regulację plastydowego metabolizmu.

## WPROWADZENIE

Rośliny żyjące w warunkach naturalnych są stale narażone na działanie różnego typu czynników stresowych. Możliwość egzystencji w określonym środowisku, powodzenie rozwoju osobniczego i wydanie potomstwa, a także wytworzenie plonu rolniczego zależą od tego, w jakim stopniu dany organizm jest dostosowany do funkcjonowania w tym środowisku, a więc od tego, czy i w jakim stopniu wykazuje odporność na występujące w środowisku stresory.

U bakterii, jednym z głównych mechanizmów odpowiedzi na warunki stresowe obok systemu SOS i reakcji chemotaktycznej, jest odpowiedź ścisła (ang. *stringent response*), odkryta u *E. coli* przed ponad czterdziestoma laty. Polega ona na adaptacyjnej reakcji organizmu na zmiany w dostępie pożywienia (np. głód aminokwasowy) oraz inne środowiskowe i metaboliczne czynniki stresowe. Wyznacznikiem odpowiedzi ścisłej jest wzmożona synteza i akumulacja tetra- i pentafosforanów guanozyny (ppGpp i pppGpp), nietypowych nukleotydów o charakterze regulatorowym, w których metabolizm u *E. coli* zaangażowane są białka RelA i SpoT. Nukleotydy (p)ppGpp oddziałując bezpośrednio z polimerazą RNA wpływają na aktywność transkrypcyjną wielu genów, negatywnie regulowana jest transkrypcja genów kodujących rRNA, tRNA i białka rybosomalne, czyli cały aparat translacyjny, natomiast indukowana jest transkrypcja genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy aminokwasów i proteolizy białek [1]. Pozytywnie regulowana jest również transkrypcja genów kodujących czynniki sigma S odpowiedzialne za przejście komórek w stacjonarną fazę wzrostu i niezbędne do przetrwania warunków stresowych [2]. Celem takiego przeprogramowania bakteryjnej aktywności transkrypcyjnej jest oszczędność energii poprzez ograniczenie syntezy białek i elementów maszyneryi biorącej udział w ich syntezie. Natomiast jednoczesne przejście komórek w stacjonarną fazę wzrostu sprawia, że stają się mniej wrażliwe na podwyższoną temperaturę [3], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, czy wysoką osmolarność środowiska [4].

Do niedawna uważano, że odpowiedź ścisła ograniczona jest wyłącznie do świata *Prokaryota*, jednak ostatnie badania dowiodły, że występuje również u roślin, gdzie centrum jej działania stanowi chloroplast. Zidentyfikowano zarówno homologi bakteryjnych enzymów zaangażowanych w mechanizm odpowiedzi ścisłej (białka RSH – ang. *RelA/SpoT Homologues*), jak i produkty ich aktywności – (p)ppGpp. Wyniki przeprowadzonych do tej pory badań sugerują, że podobnie jak u bakterii, roślinna odpowiedź ścisła zaangażowana jest w odpowiedź na warunki stresowe [5-10].



Tabela 1. Charakterystyka domen funkcjonalnych występujących w strukturze białek zaangażowanych w mechanizm odpowiedzi ścisłej.

Domena	Występowanie	Funkcja	Piśmiennictwo
RelA/SpoT	wyłącznie w białkach zaangażowanych w mechanizm odpowiedzi ścisłej u <i>Prokaryota</i> jak i <i>Eukaryota</i>	nieznana	[1]
HD	w enzymach o aktywności fosfohydrolaz metalozależnych zaangażowanych w metabolizm kwasów nukleinowych i łańcuch transdukcji sygnału	prawdopodobnie odpowiedzialna za hydrolityczne aktywności białek SpoT, Rel i RSH	[18]
TGS	w białkach takich jak ThgrRS, GTPaz czy SpoT	wiąże nukleotydy	[19]
ACT	w enzymach regulowanych stężeniem aminokwasów	wiąże ligandy	[20]
Motyw dłoni EF	w białkach łańcucha transdukcji sygnału oraz strukturalnych	wiąże jony wapnia	[21]

### SUBKOMÓRKOWA LOKALIZACJA I STRUKTURA DOMENOWA BIAŁEK RSH

U *E. coli* i innych bakterii Gram ujemnych w metabolizm (p)ppGpp zaangażowane są dwa białka wykazujące duży stopień homologii – RelA i SpoT, przy czym RelA posiada aktywność syntetazy tych nukleotydów, natomiast SpoT jest przede wszystkim hydrolazą, wykazującą w pewnych warunkach, takich jak niedobór węgla i fosforu, również właściwości syntetazy (p)ppGpp. Bakterie Gram dodatnie charakteryzują się obecnością jednego białka Rel wykazującego obie aktywności [1].

Geny kodujące roślinne białka RSH zidentyfikowano do tej pory u *Nicotiana tabacum* [7], *Arabidopsis thaliana* [9], *Oryza sativa* [10], *Suaeda japonica* [11], *Capsicum annuum*, *Pisum sativum*, *Pharbitis trifida* i *Pharbitis nil*, przy czym u trzech pierwszych gatunków wykazano obecność w genomie więcej niż jednego homologa. Podobieństwo białek RSH do ich bakteryjnych homologów – RelA i SpoT oscyluje pomiędzy 50 a 70% na odcinku najbardziej konserwowanych 450 aminokwasów [9].

W oparciu o przewidywaną lokalizację białek RSH zaproponowano ich klasyfikację w dwie odrębne grupy: rsh1 i

rsh2. W skład pierwszej grupy miałyby wchodzić białka takie jak AtRSH1 rzodkiewnika czy NtRSH1 tytoniu, kodujące białka, których przewidywane sekwencje aminokwasowe wskazują na cytoplazmatyczną lokalizację i zakotwiczenie w błonie komórkowej. Natomiast w skład grupy drugiej, białka takie jak AtRSH2, AtRSH3 czy NtRSH2, kodujące białka o przewidywanej lokalizacji chloroplastowej. Chloroplastowa lokalizacja białek RSH grupy drugiej oparta jest na analizie ich sekwencji aminokwasowych w programie TargetP. Ponadto analiza filogenetyczna wykazała, że roślinne białka RSH największą homologię wykazują do białek odpowiedzi ścisłej cyjanobakterii, organizmów, od których wg teorii endosymbiotycznej, roślinne chloroplasty się wywodzą. W celu potwierdzenia przewidywanej plastydowej lokalizacji białka NtRSH2 udowodniono, że w wyniku frakcjonowania subkomórkowego oczyszcza się ono z chloroplastami. Kolejny dowód na plastydową lokalizację białka NtRSH2 to fakt, iż jest ono krótsze niż to wynika z jego przewidywanej sekwencji aminokwasowej, co jest prawdopodobnie wynikiem usunięcia 93 aminokwasów z N-końca następującego podczas translokacji [7]. W przypadku homologa CrRSH u glonu *Chlamydomonas reinhardtii*, również stwierdzono obecność przy N-końcu sekwencji skierowanej do chloroplastów, bogatej w reszty seryny, treoniny, a ubogiej w reszty asparagianinu i glutaminianu. Co więcej, zademonstrowa-

Tabela 2. Analiza struktury bakteryjnych i roślinnych białek zaangażowanych w mechanizm odpowiedzi ścisłej.

Grupa białek	Struktura domenowa	Lokalizacja	Funkcja [Piśmiennictwo]	Przedstawiciel M. cz. (liczba aminokwasów)
RelA		protoplazma	syntetaza (p)ppGpp w warunkach głodu aminokwasowego [1]	<i>E. coli</i> RelA_P11585 83,9 kDa (744)
SpoT		protoplazma	hydrolaza (p)ppGpp, syntetaza (p)ppGpp w warunkach niedoboru węgla i fosforu [1]	<i>E. coli</i> SpoT_P17580 79 kDa (702)
Rel		protoplazma	syntetaza i hydrolaza (p)ppGpp [22]	<i>S. coelicolor</i> Rel_P52560 94 kDa (847)
RSH1		błona komórkowa	syntetaza (p)ppGpp [9]	<i>A.thaliana</i> RSH1_Q9M5P7 98,6kDa (883)
RSH2		chloroplast	syntetaza i hydrolaza (p)ppGpp [6,7]	<i>A.thaliana</i> RSH2_Q9M5P6 80 kDa (710)
RSH3		chloroplast	nie badano	<i>A.thaliana</i> At3g17470_Q84R11 66 kDa (583)



no *in vitro* translokację białka CrRSH do tych organelli [6]. Inne dowody na chloroplastową lokalizację mechanizmu, w którym uczestniczy ta grupa białek RSH stanowią: akumulacja produktów ich aktywności – nukleotydów (p)ppGpp – w chloroplastach [8], potwierdzenie asocjacji aktywności syntetazy (p)ppGpp z chloroplastowymi rybosomami 70S u grochu [5] czy hamowanie aktywności chloroplastowej polimerazy RNA przez (p)ppGpp u tej rośliny [8]. Ponadto w chloroplastach szpinaku [12], *Arabidopsis* [13] i *Chlamydomonas* [14] zidentyfikowano odpowiedniki bakteryjnych, rybosomalnych białek L11, odpowiedzialnych za aktywację katalitycznych funkcji białka RelA. Również plastydowe translacyjne czynniki elongacyjne, EF-G i EF-Tu, wykazują wysoką homologię do czynników bakteryjnych [15,16], a u *E. coli*, mutacja w genie kodującym pierwszy z nich, prowadzi do zaburzeń w syntezie (p)ppGpp [17]. Białka zaangażowane w mechanizm odpowiedzi ścisłej charakteryzują się obecnością kilku konserwowanych domen funkcjonalnych (Tabela 1), przy czym jedna z nich – RelA/SpoT – jest charakterystyczna tylko i wyłącznie dla tych białek [18-22].

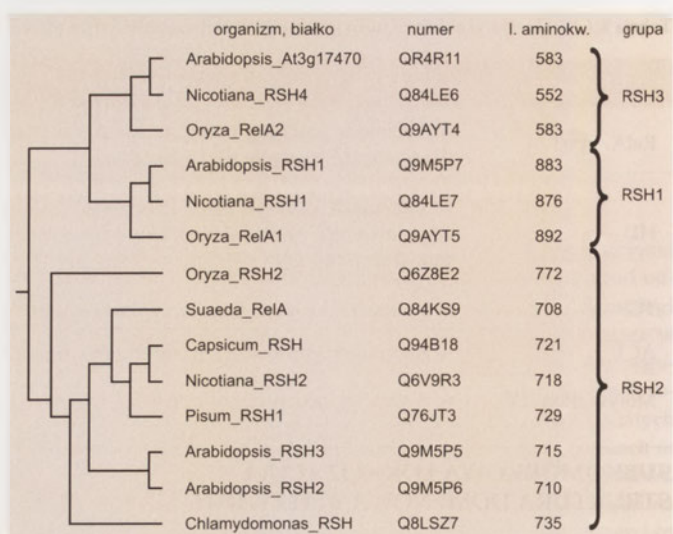
Analiza struktury domenowej białek RSH poszczególnych grup (Tabela 2) wykazała pewną prawidłowość – obecność w grupie pierwszej, obok domen RelA/SpoT i HD domeny TGS – taka struktura charakterystyczna jest dla bakteryjnych białek SpoT. Natomiast domeny TGS nie zidentyfikowano w strukturze białek RSH grupy drugiej.

Biorąc pod uwagę przewidywaną subkomórkową lokalizację białek RSH, ich strukturę domenową oraz analizę filogenetyczną wyraźnie można wyróżnić jeszcze jedną ich grupę charakteryzującą się brakiem zarówno domeny TGS, jak i domeny HD, natomiast wykazującą obok domeny RelA/SpoT obecność dwóch motywów dłoni EF wiążących wapń. Analiza ich przewidywanych sekwencji aminokwasowych wskazuje, że podobnie jak białka grupy RSH2, lokalizują się w chloroplastach. Motywy dłoni EF wiążące wapń nie występują w strukturze żadnego z zidentyfikowanych do tej pory prokariotycznych białek RelA, SpoT czy Rel. Natomiast żadne z roślinnych białek RSH nie posiada domeny ACT, występującej w strukturze białek RelA oraz Rel [23].

Analiza filogenetyczna (Rys.1) wskazuje, że do grupy pierwszej wchodzić miałyby również białko RelA1 ryżu, potwierdza to również jego struktura domenowa (obecność domeny RelA/SpoT, HD i TGS), aczkolwiek białko to charakteryzuje się przewidywaną lokalizacją chloroplastową. Białko RSH2 ryżu również charakteryzuje się strukturą charakterystyczną dla białek grupy pierwszej, natomiast wykazuje chloroplastową lokalizację i co więcej, analiza filogenetyczna wskazuje na jego pokrewieństwo z białkami RSH grupy drugiej. Obydwa te białka stanowią najstarsze pod względem filogenetycznym ogniwo swoich grup, co sugeruje że mogą stanowić formy przejściowe pomiędzy tymi grupami.

#### WŁAŚCIWOŚCI KATALITYCZNE BIAŁEK RSH

Ze względu na wysoką homologię z bakteryjnymi białkami RelA, SpoT i Rel, większość doświadczeń przeprowadzonych w celu określenia funkcji białek RSH opiera się na ich analizie funkcjonalnej w systemach bakteryjnych. W badaniach na *E. coli* wykorzystuje się fakt, że mutanty relA-, a



**Rysunek 1.** Drzewo filogenetyczne przedstawiające stopień pokrewieństwa między przewidywanymi sekwencjami aminokwasowymi białek RSH roślin; analizę wykonano w programie ClustalW na podstawie danych bazy Pfam 18.0.

więc nieprodukujące (p)ppGpp, nie rosną na pożywce SMG [24]. Jest to pożywka minimalna, wzbogacona o aminokwas – serynę, metioninę i glicynę. Taka kombinacja aminokwasów prowadzi do zaburzenia równowagi metabolicznej, czego rezultatem jest głód izoleucynowy następujący wskutek hamowania ekspresji operonu biosyntezy tego aminokwasu. W takich warunkach szczepy dzikie włączają mechanizm odpowiedzi ścisłej i indukują ekspresję operonów biosyntezy aminokwasów, a szczepy rozluźnione (relA-) nie są w stanie poradzić sobie z tymi warunkami i nie rosną na pożywce SMG [25]. Stwarza to możliwość sprawdzenia czy ekspresja wprowadzonego roślinnego genu *rsh* komplementuje tę bakteryjną mutację i tym samym czy białko kodowane przez wprowadzony gen posiada właściwości syntetazy (p)ppGpp tak jak jego bakteryjny homolog RelA. Akumulacja dużych stężeń (p)ppGpp jest dla komórki toksyczna, tak więc wykorzystanie podwójnych mutantów relA-, spoT-, pozwala na sprawdzenie czy badane białko posiada również właściwości hydrolazy (p)ppGpp.

W przypadku wszystkich badanych pod tym kątem roślinnych RSH stwierdzono wzrost na pożywce SMG mutantów relA- *E. coli* ekspresyjnych roślinne geny *RSH* (*CrRSH*, *NtRSH2*, *AtRSH1*, *SjRSH*), co wskazuje na ich właściwości syntetazy (p)ppGpp [6,7,9,11]. Dodatkowo właściwości syntetazy (p)ppGpp białka *NtRSH2* tytoniu potwierdzono *in vitro*. Stwierdzono bezpośrednio, że oczyszczone białko zdolne jest do syntezy ppGpp i pppGpp z ATP i odpowiednio GDP i GTP. Wydajność syntezy była pozytywnie skorelowana ze stężeniem enzymu, przy czym synteza ppGpp zachodziła wydajniej niż pppGpp. Wykazano wolny ale stały wzrost stężenia produktów w okresie 23-godzinny [7]. Natomiast właściwości syntetazy (p)ppGpp białka *AtRSH1* potwierdzono dodatkowo poprzez ekspresję kodującego je genu w szczepie relA- *Streptomyces coelicolor*. U bakterii tej akumulacja (p)ppGpp związana jest z produkcją antybiotyku aktinohordiny. Mutanty relA- *Streptomyces coelicolor* nie są zdolne do syntezy (p)ppGpp, w konsekwencji nie produkują aktinohordiny. Synteza antybiotyku zostaje jednak przywrócona mutantom dzięki ekspresji genu *AtRSH1* [9].



Tabela 3. Porównanie sekwencji domen HD pomiędzy przedstawicielami poszczególnych grup białek odpowiedzi ścisłej; na podstawie [18].

Grupa	Organizm, białko	I	II	III	IV	V
RelA SpoT Rel	Escherichia_RelA	38 TWAYCLQQ-TQGHDPASL 17 DTLKLLFPLADA 5 DVLRESVSKSVNLIHGV 10 AT-HTDSVSSEQVDNVRMLLA 6 CVVIKLAERIAHL 584				
	Escherichia_SpoT	30 ARDAEIGQ-TRSSHPYI 17 ETLKLLFPLADA 5 QDMEQLFKSVAELVEGV 10 K-----EKAQENFRKMIMA 6 VILIKLARLHNM 558				
	Streptomyces_Rel	133 AERERIGQ-KRKSHPYI 17 ATLKLLFPLADA 5 EDLRDFDQVTVLLVDGV 9 -----EAAQETVRKMVVA 6 VLVIKLARLHNM 246				
RSH1	Arabidopsis_RSH1	156 AFEAERIGQ-KRRSHPYI 17 ESIVKLLFPLADA 6 EKIEEETATVRHIVEGE 10 CKTESETIQDVKADLRQMFLLA 6 VIIVKLARLHNM 271				
	Nicotiana_RSH1	150 AFEAERIGQ-KRRSHPYI 17 ESIVKLLFPLADA 6 ERIEKEEPTVRRIVEGE 10 CKDESH-VQDVKADLRQMFLLS 6 VIIVKLARLHNM 272				
	Oryza_RelA1	168 AYEAEERIGQ-KRRSHPYI 17 ESIVKLLFPLADA 6 ERIENEETVTVRRIVEGE 10 CKNEGSKQDVKADLRQMFLLA 6 VIIVKLARLHNM 291				
RSH2	Capsicum_RSH	225 AEKAEERIGQ-VRATHPYL 17 TVVAKLLFPLADA 5 DYIFERTLQAGVADLVEGV 10 RD-FNTASKTVEADRLHMTFLLA 5 AVLKILARLHNM 345				
	Nicotiana_RSH2	225 AEKAEERIGQ-VRASHPYL 17 TVVAKLLFPLADA 5 DYIFERTLQAGVADLVEGV 10 RD-FNTASKTVEADRLHMTFLLA 5 AVLKILARLHNM 345				
	Pisum_PsRSH1	233 AEKAEERIGQ-MRASHPYL 17 TVVAKLLFPLADA 5 DYIFGMFQAGVADLVGGV 10 RD-NNTASKSVEADRLHMTFLLA 5 AVLKILARLHNM 353				
	Suaeda_RelA	210 AEKAEERIGQ-VRASHPYL 17 TVVAKLLFPLADA 5 DYILNIFQSGVADLVNGV 10 RE-NNTASKTVEADRLHMTFLLA 5 AVLKILARLHNM 330				
	Arabidopsis_RSH3	221 AEKAEERIGQ-MRATHPYL 17 TVVAKLLFPLADA 5 DYILRTFQSGVADLVEGV 7 RE-NNTACKTVEADRLHMTFLLA 5 AVLKILARLHNM 338				
	Arabidopsis_RSH2	217 AEKAEERIGQ-MRASRDYPL 17 TVVAKLLFPLADA 5 DYILRNFFQAGVADLVEGV 10 RE-NNTACKTVEADRLHMPFLLA 5 AVLKILARLHNM 337				
	Chlamydomonas_CrRSH	203 AAFAEERQNO-QRKNIESLL 17 ETVAKLLFPLADA 6 EEFMPPSVSVLEHVNTI 10 SA-----TGSFSDTFORLLVG 5 AVIVKLSRLAEL 320				
Oryza_RSH2	131 ASTAEERIGQ-FRKTHPYV 22 NTVAKLLFPLADA 5 KSTIEEQFDVVASLVSGV 10 RR-HRQKNTGGSTLTSEEYFSY 6 AEVAQETLAVWC 257					
RSH3	Arabidopsis_At3g17470	95 SIFILQSLPLASDRSPL 17 EVISASLLSEVDDA 5 YEVRDHIQTGTAHLLHEI 10 DV-----LDDETAASLRKFYLT 5 AVIMDLVSKLDEM 212				
	Nicotiana_RSH4	71 CIPILQSLPLAPDRAPL 17 EVISTGLLREVELEA 5 YDVRDRIQTSTAHLLES 10 EV-----LDDDSATLARKFCLT 5 ALVDLIAIKLDM 187				
	Oryza_RelA2	106 ALPALR----DGRGGRAL 17 EVISKLLFPLADA 5 RDVKSEIQTSTAHLLES 10 DV-----LDDASALRKFCLS 5 AVILELAKLDM 218				

Przedstawiono pięć motywów domeny HD, numer na początku i końcu sekwencji wskazuje pozycję pierwszego i ostatniego aminokwasu domeny; numery pomiędzy motywami wskazują liczbę aminokwasów znajdujących się pomiędzy nimi, a nieuwzględnionych na rysunku; kolorem czerwonym zaznaczono wysoko konserwowane reszty histydyny i kwasu asparaginowego; kolorem żółtym zaznaczono konserwowane hydrofobowe reszty aminokwasowe, a kolorem niebieskim – konserwowane reszty aminokwasów o krótkich łańcuchach węglowodorowych.

Białka RSH grupy pierwszej i drugiej charakteryzują się obecnością domeny HD, która u bakterii odpowiedzialna jest za właściwości hydrolazy (p)ppGpp białek SpoT i Rel [18]. Ekspresja genu *CrRSH* *Chlamydomonas reinhardtii* komplementuje podwójną mutację *relA-*, *spoT-*, co wskazuje na właściwości hydrolazy (p)ppGpp [6]. Jak dotąd aktywności tej nie wykazano w przypadku białek NtRSH2 i AtRSH1 [7,9]. Jednak analiza sekwencji ich domen HD sugeruje, że są one w pełni funkcjonalne (Tabela 3). O funkcjonalności tej decydują konserwowane reszty histydyny (H) i kwasu asparaginowego (D) w obrębie pierwszego, drugiego i piątego motywu domeny. Porównanie sekwencji domen HD białek odpowiedzi ścisłej wykazało, że białka RelA oraz grupy RSH3 wykazują obecność substytucji konserwowanych reszt histydyny i kwasu asparaginowego na reszty innych aminokwasów, co w konsekwencji prowadzi do utraty aktywności hydrolitycznej tych białek. Wszystkie pozostałe znane białka RSH posiadają charakterystyczne dla SpoT i Rel motywy histydyny i kwasu asparaginowego domeny HD i teoretycznie powinny wykazywać aktywność hydrolazy (p)ppGpp.

### BIAŁKA RSH A ROŚLINNA ODPOWIEDŹ NA STRES

U bakterii odpowiedź ścisła, w którą zaangażowane są białka RelA, SpoT i Rel stanowi jeden z głównych mechanizmów odpowiedzi na warunki stresowe. Akumulacja (p)ppGpp prowadzi do przeprogramowania bakteryjnej aktywności transkrypcyjnej i nastawienie komórkowego metabolizmu na ochronę organizmu przed negatywnymi skutkami stresu [1]. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że podobnie jak u bakterii, roślinne białka RSH związane są z odpowiedzią tych organizmów na stres. Dowodów na potwierdzenie tej teorii dostarczyły doświadczenia: charakterystyka funkcjonalna białka SjRSH w układzie bakteryjnym i drożdżowym, analiza poziomu transkryptyu genu *NtRSH2* w liściach roślin tytoniu poddanych działaniu kwasu jasmonowego i ataku patogenu oraz analiza poziomu (p)ppGpp w chloroplastach roślin poddanych ekspozycji na działanie biotycznych i abiotycznych czynników stresowych oraz ro-

ślinnych hormonów stresowych [7,8,11]. Ponadto sposób identyfikacji kilku roślinnych genów RSH wskazuje na ich udział w odpowiedzi na warunki stresowe [9-11].

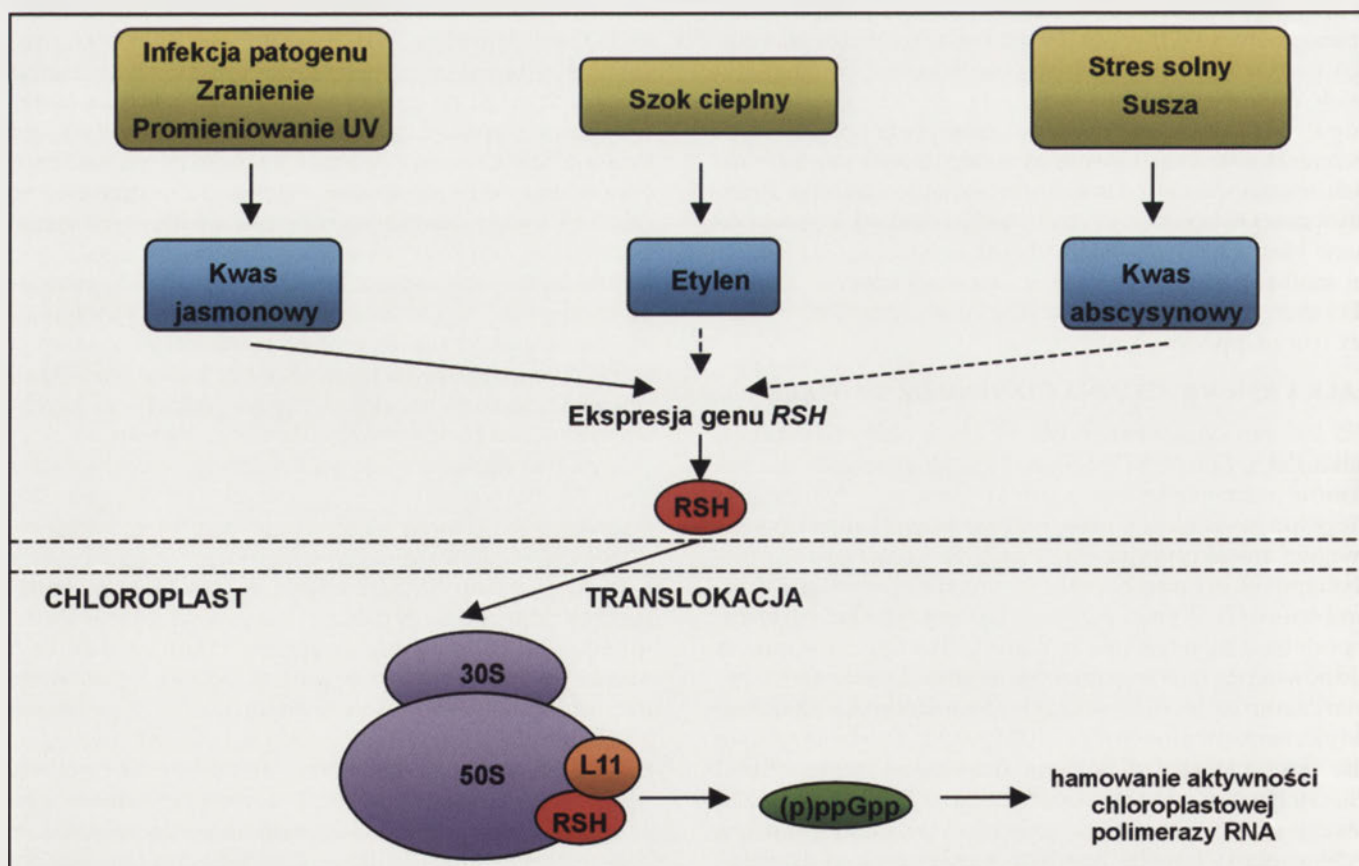
Zaliczane do grupy pierwszej, białko AtRSH1 rzodkiewnika, zidentyfikowano w dwuhybrydowym systemie drożdżowym przy użyciu jako „przynęty” białka RPP5, odpowiedzialnego za odporność na patogeny. Stwierdzono, że do oddziaływania z domeną NB-ARC białka RPP5 wystarczy C-końcowy fragment białka AtRSH1 wielkości około 160 aminokwasów (634-793). Nie obserwowano jednak żadnych zmian w poziomie transkryptyu *AtRSH1* w różnych odstępach czasu po infekcji roślin patogenem *Pseudomonas syringae*, w wyniku działania kleszczy, traktowania 0,5 mM kwasem salicylowym czy 1 mM kwasem jasmonowym [9]. Podobnie jak u rzodkiewnika, ekspozycja roślin tytoniu na działanie kwasu salicylowego nie miała wpływu na poziom transkryptyu *NtRSH2*. Stwierdzono natomiast jego 3- do 4-krotny wzrost w stosunku do kontroli już po 8 godzinach od traktowania roślin kwasem jasmonowym i utrzymanie się tego efektu przez 48 godzin. Jednocześnie zaobserwowano porównywalny wzrost poziomu białka NtRSH2. Co ciekawe, indukcję transkrypcji genu *NtRSH2* zaobserwowano również pod wpływem działania etanolu, który jest rozpuszczalnikiem kwasu jasmonowego i miał stanowić kontrolę dla wariantów traktowanych tym kwasem. Ekspozycja roślin tytoniu na działanie etanolu w końcowym stężeniu 0,5% doprowadziła po 24 godzinach do 2-krotnego wzrostu poziomu *NtRSH2* mRNA w stosunku do kontroli, co prawdopodobnie wynika z faktu, że działanie etanolu imituje warunki związane ze stresem takim jak dehydratacja, szok osmotyczny czy hipoksja (niedobór tlenu). Indukcja transkrypcji *NtRSH2* w wyniku traktowania kwasem jasmonowym, jednym z roślinnych hormonów stresu, sugeruje udział NtRSH2 w reakcji na zranienie, infekcję patogenem czy promieniowanie UV. I rzeczywiście stwierdzono, że infekcja roślin tytoniu bakteryjnym patogenem *E. cartovora cartovora* prowadzi do 10-krotnego wzrostu poziomu białka NtRSH2 [7]. Na udział białek RSH w odpowiedzi na



warunki stresowe, której mediatorem jest kwas jasmonowy wskazuje również fakt, iż w ryżu, jeden z genów *RSH* zidentyfikowano w wyniku funkcjonalnego przeszukiwania biblioteki cDNA przygotowanej z roślin traktowanych właśnie tym fitohormonem [10].

U halofita *Suaeda japonica*, gen *SjRSH* zidentyfikowano na drodze funkcjonalnego przeszukiwania biblioteki cDNA utworzonej z roślin, które rosły w warunkach wysokiego zasolenia (250 mM NaCl). Analiza funkcjonalna białka *SjRSH* w układzie bakteryjnym i drożdżowym wykazała jego udział w odpowiedzi na stres solny i osmotyczny. W warunkach kontrolnych bakterie *E. coli* niosące w wektorze ekspresyjnym cDNA genu *SjRSH* wykazały wzrost tolerancji na stres solny (400 mM NaCl) i osmotyczny (1M sorbitol) w porównaniu z bakteriami kontrolnymi niosącymi pusty wektor. Uzyskane wyniki potwierdzono poprzez ekspresję cDNA genu *SjRSH* w drożdżach *S. cerevisiae*, wykorzystanych z racji ich użyteczności jako organizm modelowy do analizy funkcji genów eukariotycznych. Co więcej, analiza northern wykazała, iż drożdżowe transformanty ekspresujące cDNA genu *SjRSH* charakteryzują się podwyższonym poziomem transkryptów genów kodujących białka zaangażowane w odpowiedź tych organizmów na stres, takie jak: dehydrogenaza 3-fosfoglicerolu (*GPD1*), podjednostka wakuolarniej H<sup>+</sup>-ATPazy (*VMA6*), kinaza MAP stresu osmotycznego (*HOG1*), białko szoku cieplnego 104 (*SED5*), homolog ssaczego białka 14-3-3 (*BMH1*) oraz czynnik inicjacji translacji elf-5A (*HYP2*) [11].

Więcej dowodów na udział białek RSH w odpowiedzi roślin na warunki stresowe dostarczyły analizy poziomu (p)ppGpp – produktów aktywności białek RSH. Stwierdzono wzrost poziomu tych nukleotydów w chloroplastach roślin poddanych działaniu biotycznych i abiotycznych czynników stresowych, takich jak zranienia, szok cieplny, wysokie zasolenie, metale ciężkie, susza, promieniowanie UV, raptowne przejście ze światła do ciemności czy traktowanie roślin stresowymi hormonami roślinnymi – kwasem jasmonowym (JA), abscysynowym (ABA) czy etylenem [8]. W przypadku zranienia czy traktowania roślin kwasem jasmonowym, stwierdzono w chloroplastach stały wzrost poziomu (p)ppGpp, aż do osiągnięcia maksimum po 60 minutach, po których następuje spadek poziomu tych nukleotydów, co wskazuje na obecność u roślin również systemu degradującego (p)ppGpp. Do tej pory jedynie w przypadku białka CrRSH glonu *Ch. reinhardtii* doświadczalnie potwierdzono aktywność hydrolazy (p)ppGpp. U bakterii akumulacja alarmonów odpowiedzi ścisłej jest znacznie szybsza, włączana natychmiast w odpowiedzi na warunki głodu i osiągająca maksimum w ciągu 5-10 minut. Różnica ta wynika prawdopodobnie z większej złożoności mechanizmów obronnych u roślin w porównaniu z bakteryjnymi. Na uwagę zasługuje chociażby fakt, że wzrost poziomu (p)ppGpp w odpowiedzi na działanie kwasu jasmonowego zostaje całkowicie zahamowany w wyniku wcześniejszego traktowania roślin cykloheksimidem, antybiotykiem specyficznym hamującym syntezę białek w komórkach eukariotycznych. Wskazuje to na udział w tej odpowiedzi dodatkowo jednego lub kilku białek mediatorowych, nowo syntetyzowanych



Rysunek 2. Proponowany model roślinnej odpowiedzi na stres, w którą zaangażowane są białka RSH, zmodyfikowane wg [8].



w cytosolu. Co ciekawe, inny roślinny hormon, kwas indolilo-3-octowy (IAA) z grupy auksyn, nie tylko nie powoduje wzrostu poziomu (p)ppGpp, ale wręcz znacząco hamuje wzrost poziomu tych nukleotydów wynikający z działania JA, ABA czy etylenu. Efekt ten tłumaczy się faktem, iż auksyny w przeciwieństwie do innych roślinnych hormonów, zaangażowane są raczej w procesy podziałów komórkowych, elongacji czy różnicowania komórek niż odpowiedzi na stres [8].

## MECHANIZM ODPOWIEDZI ŚCISŁEJ ROŚLIN

Ekspozycja roślin na działanie różnych czynników stresowych prowadzi do zmiany równowagi hormonalnej w ich tkankach. Następuje zmniejszenie stężenia tych hormonów, które uważa się za stymulatory wzrostu (giberelin, cytokinin, czasem kwasu indoliloctowego), natomiast zwiększa się stężenie hormonów hamujących wzrost elongacyjny komórek, przyspieszających dojrzewanie i starzenie się tkanek lub indukujących spoczynek. Do tej grupy, określanej mianem hormonów stresowych, należą kwas abscysynowy, etylen i kwas jasmonowy [26]. Wyniki badań wpływu tych hormonów, jak i czynników indukujących ich akumulację na ekspresję genów *RSH* i akumulację (p)ppGpp, pozwalają przypuszczać, że te nietypowe nukleotydy stanowią jedno z ogniw łańcucha transdukcji aktywowanego w odpowiedzi na warunki stresowe, a roślinny mechanizm kontroli ścisłej związany jest z odpowiedzią roślin na warunki stresowe. Mimo, że białka RSH kodowane są jądrowo, centrum ich działania pozostaje chloroplast (Rys. 2) [5,7,8]. Wykazano, że translokacja białek RSH do tego organellum zależy od światła. Analiza wpływu światła na akumulację (p)ppGpp w grochu, wykazała znaczny jej wzrost krótko po przeniesieniu roślin do ciemności po 12-godzinny okresie nasświetlania. Natomiast 12-godzinny okres ciemności doprowadził do 5-krotnej redukcji poziomu alarmonów odpowiedzi ścisłej. Co więcej, obecności ani ppGpp, ani pppGpp, nie stwierdzono w etiolowanych siewkach grochu [8]. Również efekt zranienia, czyli 5-krotny wzrost poziomu (p)ppGpp w chloroplastach grochu, zostaje zniesiony, gdy nastąpi ono w ciemności. Wyniki te potwierdzają fakt, że światło jest niezbędne dla translokacji białek RSH z cytoplazmy do chloroplastów, co wykazano u *Chlamydomonas* [8,27].

W obrębie samego chloroplastu, mechanizm roślinnej odpowiedzi ścisłej bardzo przypomina pierwotny bakteryjny. Ostatnie badania w grochu dowiodły, że podobnie jak to jest u bakterii, chloroplastowa aktywność syntetazy (p)ppGpp jest zasocjowana z rybosomami [5]. U bakterii wpływ (p)ppGpp na komórkową aktywność transkrypcyjną wynika z bezpośredniego oddziaływania tych nukleotydów z polimerazą RNA [1]. Również u roślin wykazano *in vitro* wiązanie zarówno ppGpp, jak i pppGpp z chloroplastową polimerazą RNA i w konsekwencji hamowanie jej aktywności [8]. Należy pamiętać, że genom chloroplastowy zawiera nie tylko geny kodujące podjednostki polimerazy RNA, białka rybosomalne, rRNA i tRNA, ale również białka zaangażowane w fotosyntezę. Wydaje się więc, że jedną z możliwych funkcji białek RSH mogłaby być regulacja plastydowego metabolizmu w celu przygotowania chloroplastów do odpowiedzi na warunki stresowe [7].

## PODSUMOWANIE

Prawie cztery dekady od odkrycia mechanizmu odpowiedzi ścisłej u bakterii wykazano, iż jest ona charakterystyczna również dla świata roślin. Zidentyfikowano zarówno homologu bakteryjnych białek RelA i SpoT – białka RSH, jak i produkty ich aktywności – tetra- i pentafosforany guanozyny. Ze względu na lokalizację i strukturę białek RSH proponujemy ich podział na trzy, a nie jak do tej pory dwie grupy. Zarówno w grupie RSH1, jak i RSH2 znajdują się białka wykazujące aktywność syntetazy (p)ppGpp i ponadto charakteryzujące się obecnością domeny HD odpowiedzialnej za właściwości hydrolazy (p)ppGpp bakteryjnych białek SpoT i Rel. Jednak tylko dla jednego białka roślinnego, CrRSH, należącego do grupy RSH2, wykazano tę aktywność. Nasza wiedza na temat białek grupy RSH3 ogranicza się jedynie do ich struktury domenowej i przewidywanej lokalizacji subkomórkowej. Porównanie sekwencji domeny HD białek odpowiedzi ścisłej wykazało, że białka grupy RSH3, podobnie jak bakteryjne białka RelA, nie posiadają funkcjonalnej domeny HD. Analiza ich przewidywanych sekwencji aminokwasowych wykazała natomiast obecność dwóch motywów dłoni EF wiążących wapń, niewystępujących u żadnego z bakteryjnych homologów. Prawdopodobnie białka tej grupy przystosowały się na drodze ewolucji do pełnienia dodatkowej funkcji, jaką stanowi percepcja jonów wapniowych, których homeostaza ulega znacznym zmianom w warunkach stresu.

Liczne dowody wskazują, że podobnie jak u bakterii, roślinna odpowiedź ścisła stanowi mechanizm odpowiedzi na warunki stresowe, przy czym jej centrum stanowi chloroplast. Wykazano, że białka RSH transportowane są do chloroplastów, gdzie pod wpływem działania stresu katalizują syntezę (p)ppGpp. Wykazano wzrost poziomu tych nukleotydów w wyniku ekspozycji roślin na różnorodne, biotyczne i abiotyczne, czynniki stresowe. Wydaje się więc, że akumulacja (p)ppGpp, a co za tym idzie mechanizm roślinnej odpowiedzi ścisłej stanowi wspólne podłoże różnych reakcji na warunki stresowe. W samym chloroplaste mechanizm działania (p)ppGpp przypomina bakteryjny. Po pierwsze potwierdzono, że podobnie jak u bakterii, aktywność syntetazy (p)ppGpp zasocjowana jest z rybosomami. Po drugie wykazano, iż wiązanie *in vitro* tych nukleotydów do chloroplastowej polimerazy RNA hamuje jej aktywność. Wydaje się więc, że produkty aktywności białek RSH pełnią konserwowaną oraz uniwersalną rolę w adaptacji roślin do warunków stresowych poprzez regulację ekspresji genów chloroplastowych, a co za tym idzie – plastydowego metabolizmu.

Ze względu na konserwowany charakter oraz uniwersalność roślinnej odpowiedzi ścisłej wydaje się, że stanowi ona jeden z kluczowych mechanizmów odpowiedzi roślin na stres. Wiele pytań pozostaje jednak nadal bez odpowiedzi. Czy wzrost poziomu nukleotydów (p)ppGpp jest wynikiem aktywności wszystkich białek rodziny RSH stanowiących np. elementy jednego uniwersalnego łańcucha transdukcji sygnału, czy indukcji poszczególnych białek, których aktywacja zależy np. od rodzaju, natężenia czy ukierunkowania działającego stresu? Jakie są wzajemne relacje pomiędzy poszczególnymi przedstawicielami rodziny RSH, białkami



grupy pierwszej – cytoplazmatycznymi zakotwiczonymi w błonie komórkowej, białkami grupy drugiej – chloroplastowymi i białkami grupy trzeciej – chloroplastowymi, wiążącymi jony wapnia? Która grupa odpowiedzialna jest za degradację (p)ppGpp i dlaczego do tej pory nie udało się potwierdzić tej aktywności dla białek NtRSH2 i AtRSH1, posiadających funkcjonalną domenę HD? Czy podobnego mechanizmu możemy spodziewać się w mitochondriach, które przecież również wywodzą się od bakterii? Prawdopodobnie najbliższe lata dostarczą odpowiedzi na te i wiele jeszcze innych pytań, które wzbogacą naszą wiedzę na temat odpowiedzi roślin na warunki stresowe i roli, jaką odgrywają w tym procesie białka RSH.

#### PIŚMIENNICTWO:

- Cashel M, Gentry DR, Hernandez VJ, Vinella D (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, str. 1458-1496
- Kvint K, Farawell A, Nystrom T (2000) RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate even in the presence of high levels of  $\sigma^S$ . *J Biol Chem* 275: 14795-14798
- Grossman AD, Taylor WE, Burton ZF, Burgess RR, Gross CA (1985) Stringent response in *Escherichia coli* induces expression of heat shock proteins. *J Mol Biol* 186: 357-365
- Hengge-Aronis R (1996) Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 21: 887-893
- Kasai K, Kanno T, Endo Y, Wakasa K, Tozawa Y (2004) Guanosine tetra- and pentaphosphate synthase activity in chloroplasts of higher plants: association with 70S ribosomes and inhibition by tetracycline. *Nucleic Acids Res* 32: 5732-5741
- Kasai K, Usami S, Yamada T, Endo Y, Ochi K, Tozawa Y (2002) A RelA/SpoT homolog (Cr-RSH) identified in *Chlamydomonas reinhardtii* generates stringent factor *in vivo* and localizes to chloroplasts *in vitro*. *Nucleic Acids Res* 30: 4985-4992
- Givens RM, Lin M, Taylor DJ, Mechold U, Berry JO, Hernandez VJ (2004) Inducible expression, enzymatic activity and origin of higher plant homologues of bacterial RelA/SpoT stress proteins in *Nicotiana tabacum*. *J Biol Chem* 279: 7495-7504
- Takahashi K, Kasai K, Ochi K (2004) Identification of the bacterial alarmone guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4320-4324
- Van der Biezen EA, Sun J, Coleman MJ, Bibb MJ, Jones JDG (2000) *Arabidopsis* RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3747-3752
- Xiong L, Lee M, Qi M, Yang Y (2001) Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 685-692
- Yamada A, Tsutsumi K, Tanimoto S, Ozeki Y (2003) Plant RelA/SpoT homolog confers salt tolerance in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Cell Physiol* 44: 3-9
- Yamaguchi K, Subramanian AR (2000) The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 50S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J Biol Chem* 275: 28466-28482
- Pesaresi P, Varotto C, Meurer J, Jahns P, Salamini F, Leister D (2001) Knock-out of the plastid ribosomal protein L11 in *Arabidopsis*: effects of mRNA translation and photosynthesis. *Plant J* 27: 179-189
- McElwain KB, Boynton JE, Gillham NW (1993) A nuclear mutation conferring thiostrepton resistance in *Chlamydomonas reinhardtii* affects a chloroplast ribosomal protein related to *Escherichia coli* ribosomal protein L11. *Mol Gen Genet* 241: 564-572
- Akkaya MS, Breitenberger CA (1992) Light regulation of protein synthesis factor EF-G in pea chloroplasts. *Plant Mol Biol* 20: 791-800
- Lee JH, Lee JW, Chung YY, Paek KH, Shin JS, Yun CH, Kim JK (1999) Cloning and characterization of the chloroplast elongation factor EF-Tu cDNA of *Oryza sativa* L.. *Mol Cell* 9: 484-490
- Parker J, Watson RJ, Friesen JD (1976) A relaxed mutant with an altered ribosomal protein L11. *Mol Gen Genet* 144: 111-114
- Aravind L, Koonin EV (1998) The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem Sci* 23: 469-472
- Wolf YI, Aravind L, Grishin NV, Koonin EV (1999) Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases-analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events. *Genome Res* 9: 689-710
- Chapman DM, Shaanan B (2001) The ACT domain family. *Curr Opin Struct Biol* 11: 694-700
- Day IS, Reddy VS, Ali GS, Reddy ASN (2002) Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biol* 3: 1-24
- Chakraborty R, White J, Takano E, Bibb M (1996) Cloning, characterization and disruption of a (p)ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3. *Mol Microbiol* 19: 357-368
- Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL, Studholme DJ, Yeats C, Eddy SR (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 32: D138-41
- Uzan M, Danchin A (1976) A rapid test for the *RelA* mutation in *E. coli*. *Bioch Bioph Res Com* 69: 751-758
- Uzan M, Danchin A (1978) Correlation between the serine sensitivity and derepressibility of the *ilv* genes in *Escherichia coli relA*-mutants. *Mol Gen Genet* 165: 21-30
- Kacperska A (2002) Udział hormonów w reakcjach roślin na czynniki stresowe. W: Kopcewicz J, Lewak S (red) Podstawy fizjologii roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 668-673
- Lawrence SD, Kindle KI (1997) Alterations in the *Chlamydomonas* plastocyanin transit peptid have distinct effects on *in vitro* import and *in vivo* protein accumulation. *J Biol Chem* 272: 20357-20366

## Plant mechanism of an adaptive stress response homologous to bacterial stringent response

Grażyna Dąbrowska<sup>✉</sup>, Justyna Prusińska, Anna Goc

Department of Genetics, Institute of General and Molecular Biology, Nicolaus Copernicus University, 9 Gagarina St., 87-100 Toruń, Poland  
✉e-mail: browsk@uni.torun.pl

**Keywords:** stringent response, guanosine tetra- and pentaphosphates

#### ABSTRACT

All living organisms possess adaptive responses to environmental stresses that are essential to ensuring cell survival. One of them is the stringent response, initially discovered forty years ago in the gram-negative model organism *E. coli*. Recently plant homologues to the bacterial *relA/spoT* genes were identified (RSH genes – *RelA/SpoT* Homologues). Also the products of rsh proteins activity – (p)ppGpp were identified in the chloroplasts of plant cells. Levels of ppGpp increased markedly when plants were subjected to some biotic and abiotic stresses. Elevation of ppGpp levels was elicited also by treatment with plant hormones. What is more – *in vitro*, chloroplast RNA polymerase activity was inhibited in the presence of ppGpp. It is supposed that plant stringent response is a conserve stress-response pathway possibly operating via regulation of chloroplast gene expression and, thus, the regulation of plastid metabolism.



# Molekularne mechanizmy odpowiedzi roślin na niedotlenienie

## STRESZCZENIE

**N**iedobór tlenu – hipoksja jest zjawiskiem często spotykanym w środowisku naturalnym. Rośliny dostosowują się do warunków tego stresu uruchamiając szereg mechanizmów adaptacyjnych morfologicznych lub funkcjonalnych. Wiele zmian dostosowujących rośliny do niedoboru tlenu jest poprzedzonych aktywacją lub represją specyficznych genów. Zastosowanie metody mikromacierzy DNA wykazało zróżnicowaną ekspresję genów kodujących nie tylko białka indukowane przez anaerobiozę, ale również czynniki transkrypcyjne, składniki szlaku przekazywania sygnału oraz liczne białka zaangażowane w różnorodne szlaki metaboliczne, także wcześniej nie identyfikowane jako związane z odpowiedzią na niskie stężenia tlenu. Zastosowanie i analiza mutantów charakteryzujących się zróżnicowaną reakcją na niedobór tlenu okazały się pomocne w badaniach szlaków przekazywania sygnału regulujących odpowiedź na hipoksję. Z dotychczasowych badań wynika, że w proces ten zaangażowane są białka Rop oraz  $H_2O_2$  i  $Ca^{2+}$ , pełniące rolę wtórnych przekazników informacji. Hemoglobiny indukowane w warunkach niedoboru tlenu mogą być odpowiedzialne za utrzymywanie statusu energetycznego komórek oraz detoksyfikację NO, którego poziom wzrasta podczas niedotlenienia.

## WPROWADZENIE

Występujące okresowo w środowisku naturalnym powodzie mogą powodować niedotlenienie tkanek roślinnych, głównie kiełkujących nasion i korzeni [1]. Warunki niskiego stężenia tlenu są konsekwencją ograniczonej dyfuzji  $O_2$  w zalanych wodą przestworach między cząsteczkami gleby; dyfuzja tlenu w wodzie jest 10 000 razy wolniejsza niż w powietrzu [2]. W ciągu kilku godzin lub dni, w zależności od temperatury, rodzaju gleby, intensywności oddychania mikroorganizmów glebowych oraz zalanych roślin, może dojść do całkowitego wyczerpania tlenu w glebie [3,4]. Terminem hipoksja określamy takie warunki niedoboru tlenu, gdy ciśnienie parcjale  $O_2$  wynosi 2-4 kPa. W warunkach hipoksji metabolizm tkanek charakteryzuje jednoczesna obecność ograniczonego oddychania i fermentacji. Anoksja (brak tlenu) powoduje całkowite zahamowanie oddychania mitochondrialnego, a jedynym źródłem ATP w tkankach są procesy fermentacyjne. W warunkach ograniczonej dostępności tlenu w tkankach roślinnych uruchamiane są strategie polegające na unikaniu stresu lub aklimatyzacji do warunków niskiego stężenia tlenu. Unikanie stresu polega na rozwoju miękiszu powietrznego – aerenchymy [2,3,5,6], umożliwiającego transport tlenu z części nadziemnej do korzeni oraz wykształceniu korzeni bocznych rosnących pod powierzchnią gleby i mających ułatwiony dostęp do tlenu atmosferycznego [2]. Aklimatyzacja funkcjonalna może polegać na dostosowaniu metabolizmu do czasowego ograniczenia dostępu tlenu. W warunkach stresu może nastąpić aktywacja glikolizy (efekt Pasteura) i indukcja torów fermentacyjnych, co częściowo rekompensuje niedobór energii [1,7-10], bądź też zahamowanie szlaku glikolitycznego w celu ograniczenia metabolizmu do niezbędnego do przetrwania minimum [11,12].

Wiele prac przeglądowych poświęcono zmianom morfologicznym, anatomicznym oraz metabolicznym pojawiającym się w roślinach w warunkach niedoboru tlenu [1-3,7-15]. Znacznie mniej wiadomo na temat molekularnych podstaw odpowiedzi roślin na niskie stężenie tlenu. Warunkiem szybkiej i właściwej reakcji rośliny na zmiany w środowisku jest sprawna percepcja i przekazanie sygnału. Mechanizmy odbioru i szlaki przekazywania sygnału związanego ze spadkiem stężenia tlenu w otoczeniu i/lub tkankach są obecnie przedmiotem licznych badań. W artykule tym podjęto próbę przedstawienia najnowszych wyników badań nad molekularnymi czynnikami regulującymi odpowiedź roślin na niedotlenienie.

## Małgorzata Garnczarska

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań; e-mail: garnczar@amu.edu.pl, tel. (061) 829 45 20

Artykuł otrzymano 11 maja 2005 r.  
Artykuł zaakceptowano 10 czerwca 2005 r.

**Słowa kluczowe:** ekspresja genów, hipoksja, mikromacierze, niedobór tlenu, przekazywanie sygnału

**Wykaz skrótów:** ADH – dehydrogenaza alkoholowa; ANP (ang. *anaerobic polypeptides*) – polipeptydy indukowane przez anaerobiozę; ARE (ang. *anaerobiosis responsive element*) – element odpowiedzi na anaerobiozę; ATERF4 (ang. *ethylene responsive element binding factor 4*) – czynnik 4 wiążący się do elementów odpowiedzi na etylen; DPI (ang. *diphenylene iodonium chloride*) – inhibitor flavoprotein; GLB1 (ang. *class 1 hemoglobin*) – gen kodujący hemoglobinę klasy 1; NO (ang. *nitric oxide*) – tlenek azotu; PRONE (ang. *plant-specific Rop nucleotide exchanger*) – domena białek RopGEF; Rop (ang. *plant-specific monomeric G-protein*) – monomeryczne białko G specyficzne dla roślin; RopGAPs (ang. *Rop GTP-ase activating proteins*) – białka aktywujące Rop GTPazę

Podziękowanie: Praca finansowana przez KBN w ramach grantu Nr 2P06R 085 26



## WYKORZYSTANIE TECHNIKI MIKROMACIERZY DNA DO BADAŃ NAD REGULACJĄ EKSPRESJI GENÓW ROŚLIN W ODPOWIEDZI NA NIEDOBÓR TLENU

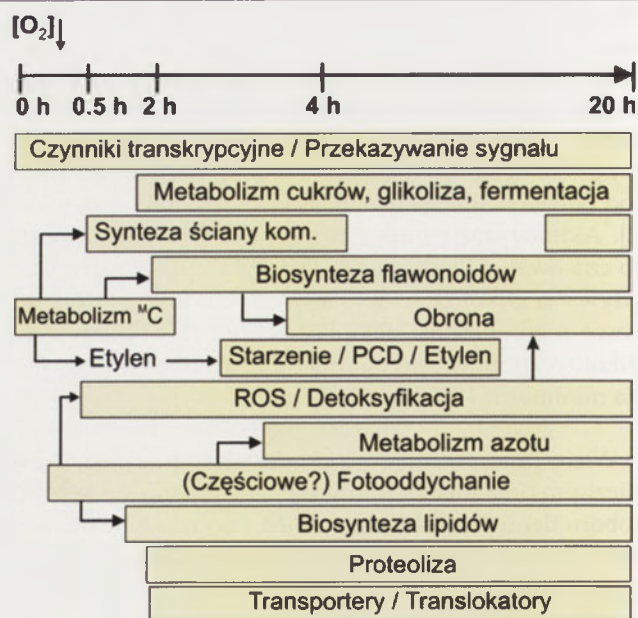
W literaturze światowej znaleziono pojedyncze doniesienie zawierające wyniki wielkoskalowego (3 500 genów) monitorowania zmian profilu ekspresji genów w odpowiedzi roślin na niedotlenienie [16]. Analizowano zmiany w poziomie akumulacji transkryptów genów *A. thaliana* po trwającej 0,5, 2, 4 i 20 godz. ekspozycji kultury korzeniowej na obniżone stężenie tlenu (warianty czasowe wytypowano na podstawie kinetyki ekspresji *ADH1* z *A. thaliana*). Stwierdzono, że odpowiedź na niskie stężenie tlenu obejmuje dwa stadia czasowe. Pierwsze stadium dotyczy zmian zachodzących w ciągu 0,5 godz., drugie stadium obejmuje pozostałe trzy warianty czasowe silnie skorelowane ze sobą. Wśród 210 genów podlegających zróżnicowanej ekspresji podczas niedoboru tlenu wyróżniono 6 profili ekspresji. Profil 1 obejmował geny, których ekspresja ulegała silnemu wzmocnieniu w czasie 0,5 godz. i osłabieniu w pozostałych przedziałach czasowych. Do 2, 3 i 4 profilu zaliczono geny, dla których obserwowano wzrost poziomu akumulacji transkryptów po 2, 4 i 20 godz., odpowiednio. Profil 5 zawierał geny wykazujące silne osłabienie ekspresji w czasie 0,5 godz. ekspozycji na warunki niskiego stężenia tlenu, a w profilu 6 ekspresja genów ulegała nieznaczalnemu wzmocnieniu podczas 0,5 godz. hipoksji i osłabieniu w pozostałych wariantach czasowych.

### GENY KODUJĄCE BIAŁKA ZAANGAŻOWANE W PROCESY METABOLICZNE I ZWIĄZANE Z OGÓLNA ODPOWIEDZIĄ NA STRES

Zastosowanie techniki mikromacierzy wykazało, że w warunkach niedoboru tlenu ekspresja wielu genów jest zredukowana, ale nie stwierdzono masowego zaniku mRNA białek syntetyzowanych w warunkach dobrego zaopatrzenia tkanek w tlen, o którym donoszono wcześniej [17, 18], co oznacza, że poziom mRNA białek nie zmienia się zasadniczo podczas stresu, a mRNA białek indukowanych przez anaerobiozę podlegają preferencyjnej translacji. Po 2 do 4 godz. niedotlenienia wykryto silny wzrost ekspresji genów kodujących białka ANP (ang. *anaerobic polypeptides*), głównie enzymy fermentacyjne: dekarboksylazę pirogronianową (PDC1 i PDC2), dehydrogenazę alkoholową (ADH1), dehydrogenazę mleczanową (LDH1), aminotransferazę alaninową (AlaAT1). Ekspresja genów kodujących PDC została wzmocniona 7-krotnie, natomiast poziom transkryptu *ADH1* wzrósł 13 razy, a po 20 godz. ekspozycji na stres aż 17-krotnie. Wzrost poziomu akumulacji transkryptów zaobserwowano również dla genów kodujących enzymy glikolityczne i zaangażowane w uruchamianie rezerw energetycznych. Poziom transkrypcji genu *SuSy* kodującego syntazę sacharozy wzrósł 7 razy. Odkrycie to koresponduje z opisaną wcześniej masową indukcją genów kodujących ANP dla *A. thaliana* [17]. Doświadczenia Sachs i wsp. [18] wykonane na korzeniach kukurydzy wykazały zmianę profilu białek w warunkach niedoboru tlenu. W pierwszych godzinach stresu obserwowano zanik wielu białek w żelu z dwukierunkowej elektroforezy oraz stwierdzono selektywną syntezę ok. 20 białek indukowanych przez anaerobiozę; większość z nich zidentyfikowano jako enzymy zaangażowane w gli-

kolizę, tory fermentacyjne i przemiany węglowodanów. Chang i wsp. [19] stosując IEF-SDS-PAGE i spektrometrię masową do kompleksowej analizy profilu białkowego zidentyfikowali kolejne 46 białek syntetyzowanych w warunkach niskiego stężenia tlenu, a wśród nich nie tylko białka określane wcześniej jako ANP, ale również szereg białek pełniących różnorodne funkcje w komórce.

Metoda mikromacierzy wykazała, że proces adaptacji metabolicznej do warunków niskiego stężenia tlenu jest bardziej skomplikowany niż wcześniej sądzono i obejmuje zmiany w różnorodnych szlakach metabolicznych (Rys. 1). Już po 0,5 godz. ekspozycji na stres stwierdzono 3-krotną indukcję genów kodujących białka zaangażowane w metabolizm grup metylowych (metyltransferaza, adenozylohomocysteinaza) oraz transport przez błony (białko związane z systemem błon wewnętrznych (ang. *endomembrane-associated protein*). W grupie genów wykazujących taki sam profil ekspresji jak *ADH1* stwierdzono obecność genu *GLB1*, kodującego hemoglobinę indukowaną w warunkach niskiego poziomu tlenu, który wykazywał 11-krotny wzrost poziomu ekspresji po 20 godz. hipoksji. Stwierdzono także 3-krotny wzrost poziomu transkryptów genów kodujących białka uczestniczące w usuwaniu reaktywnych form tlenu (peroksydaza askorbinianowa, reduktaza monodehydroaskorbinianowa, reduktaza glutationowa, dysmutaza ponadtlenkowa). Białka kodowane przez te geny mogą odgrywać kluczową rolę w przewyciężaniu stresu oksydacyjnego w warunkach post-hipoksji [3,20,21]. Ekspresja genów kodujących reduktazę azotanową (NR1 i NR2) oraz dekarboksylazę glutaminianową (GDC1) została wzmocniona 5 i 3-krotnie, odpowiednio. Dekarboksylaza glutaminianowa uczestniczy w przemianach glutaminianu w kwas aminomasłowy i regulacji cytoplazmatycznego pH [22]. Podobny wzrost poziomu ekspresji wykazywały geny kodujące inne białka zaangażowane w metabolizm azotu, mianowicie dehydroge-



Rysunek 1. Schemat procesów biochemicznych indukowanych podczas 20-godzinnej ekspozycji na warunki deficytu tlenowego. Wykorzystano rysunek z artykułu: Klok EJ, Wilson IW, Wilson D, Chapman SC, Ewing RM, Somerville SC, Peacock WJ, Dolferus R, Dennis ES (2002) Expression profile analysis of the low-oxygen response in *Arabidopsis* root culture. *Plant Cell* 14: 2481-2494, za zgodą autorów i wydawnictwa American Society of Plant Biologists.



nazę glutaminianową (GDH2) i aminotransferazę alaninową (AlaAt1), co wyjaśnia obserwowaną wcześniej akumulację alaniny w warunkach niedoboru tlenu [23]. Stwierdzono także 4-krotny wzrost ekspresji genu kodującego oksydazę glikolanową zaangażowaną w fotooddychanie. Szlak ten dostarcza także substratów do biosyntezy lipidów [24]. Niedobór tlenu spowodował 3-krotne wzmocnienie ekspresji genu kodującego białko HAL3A, odgrywające ważną rolę w biosyntezie acetylo-CoA. Wykazano także indukcję genów kodujących białka zaangażowane w glikolizację (alfa-mannozydaza) i transport (apolipoproteina), których ekspresja została wzmocniona 4 i 9-krotnie, odpowiednio. Stwierdzono zwiększony poziom ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w reakcji na etylen, programowanej śmierci komórki (PCD – ang. *programmed cell death*) i rozluźnieniu struktury ściany komórkowej. Poziom transkryptów genów kodujących receptor etylenu ETR2, białko związane ze starzeniem (ang. *senescence-associated protein 1*) oraz celulazę KOR 1 wzrósł około 4-krotnie. Etylen jest cząstką sygnałną indukującą programowaną śmierć komórki i tworzenie lyzogenicznej aerenchymy w korzeniu. Powstanie aerenchymy zmniejsza ogólną aktywność metaboliczną tkanek korzenia poprzez ograniczenie liczby komórek zużywających tlen i polepsza zaopatrzenie tkanek w tlen dzięki powstałym przestworom międzykomórkowym.

#### ANALIZA MOTYWÓW PROMOTOROWYCH WYSTĘPUJĄCYCH W GENACH PODLEGAJĄCYCH REGULACJI EKSPRESJI W ODPOWIEDZI NA NIEDOBÓR TLENU

Dane uzyskane w wyniku analizy zmian profilu ekspresji genów *A. thaliana* pod wpływem hipoksji zostały wykorzystane do identyfikacji motywów sekwencyjnych nadreprezentowanych w grupach genów, których poziom ekspresji zmieniał się w podobny sposób w odpowiedzi na niskie stężenie tlenu. Analizie poddano fragmenty sekwencji o długości 500pz, położone bezpośrednio powyżej kodonu inicjującego transkrypcję. W grupie genów zaliczanych do profilu 2 (obejmującego *ADH1*) najczęściej występującym motywem był element odpowiedzi na anaerobiozę – ARE (ang. *anaerobiosis responsive element*). Potwierdzone zostały wcześniejsze informacje o udziale tego elementu w zależności od niedoboru tlenu mechanizmach adaptacyjnych roślin. Element ARE zidentyfikowano w promotorach *ADH* z *A. thaliana* i kukurydzy oraz w promotorach innych genów wykazujących wzmocnioną ekspresję w warunkach anaerobowych [25]. Statystycznie nadreprezentowane były kasety GC i GT, należące do ARE. Elementy regulatorowe, podobne do motywów GC (GCCCCTAG) i GT (GCAAAACC) występujących w promotorze *ADH1* z *A. thaliana* pomiędzy pozycją -142 i -158, obecne były również w innych genach należących do tego samego profilu ekspresji, ale odległość pomiędzy nimi wynosiła od 26 do 240pz. Wykazano, że do motywu GT przylacza się czynnik transkrypcyjny Myb (AtMYB2) niezbędny do indukcji *ADH1* przez niskie stężenie tlenu [26]. W wielu genach wykazujących taki sam profil ekspresji jak *ADH1* obecne były również sekwencje G-boksy 1 (CCACGTGGAC).

#### GENY KODUJĄCE SPECYFICZNE CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE

Wysoka czułość metody mikromacierzy pozwoliła na zidentyfikowanie czynników transkrypcyjnych oraz składników szlaków przekazywania sygnału występujących w poszczególnych profilach ekspresji wskazując na ich udział w kontroli różnych procesów w odpowiedzi na niskie stężenie tlenu [16]. Stwierdzono, że po 0,5 godz. traktowaniu hipoksją 3-krotnie wzmocniona była ekspresja genów kodujących dwa czynniki transkrypcyjne zawierające motyw palca cynkowego, spadała natomiast akumulacja transkryptu genu kodującego *AtERF4* – czynnik 4 wiążący się do elementów odpowiedzi na etylen (ang. *ethylene responsive element binding factor 4*). Po 2 godz. ekspozycji na niskie stężenie tlenu obserwowano 4-krotny wzrost akumulacji transkryptów genów kodujących czynnik typu WRKY i ZAT12 (niezbędny do ekspresji cytosolowej *APX1*), a po 20 godz. traktowaniu hipoksją 3-krotnie wzmocniona była ekspresja genów kodujących białka zawierające domenę AP2 (*RAP2.2* i *RAP2.3*), natomiast 3 razy zmalała ekspresja genu kodującego czynnik *AtbZIP50*, konieczny do indukcji *ADH1* przez niskie stężenie tlenu. Zmianom w poziomie ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne towarzyszyły zmiany w akumulacji transkryptów genów kodujących składniki szlaków przekazywania sygnału uruchamianych w odpowiedzi na niskie stężenie tlenu. Stwierdzono, że w początkowym okresie traktowania hipoksją 4-krotnemu wzmocnieniu ulegała ekspresja genów kodujących kinazy serynowo-treoninowe oraz receptor etylenu- ETR2, natomiast ekspresja genów kodujących inne kinazy białkowe była osłabiona w początkowym okresie hipoksji i ulegała wzmocnieniu po 20 godz. ekspozycji na warunki niskiego stężenia tlenu.

Zmiany profilu ekspresji genów *A. thaliana* zachodziły przy stężeniu tlenu wynoszącym 5% [16]. Indukcję ekspresji *ADH1* w kulturach komórkowych i protoplastach kukurydzy obserwowano, gdy stężenie tlenu spadało do 5-10% [11]. Fakt, że odpowiedzi te pojawiały się przy stężeniu  $O_2$  znacznie wyższym niż  $K_m$  dla oksydazy cytochromowej, wskazuje na istnienie systemu percepcji stężenia tlenu i szlaku przekazywania sygnału do wnętrza komórki.

#### SZLAKI PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU REGULUJĄCE ODPOWIEDŹ NA NIEDOBÓR TLENU

W komórkach roślinnych występują dwie klasy białek wiążących GTP: wysokocząsteczkowe (heterotrimeryczne) oraz niskocząsteczkowe (monomeryczne) białka G [27,28]. Do grupy monomerycznych białek G należy podrodzina białek Rop zaangażowanych w odpowiedź na niedobór tlenu [29]. W warunkach niedotlenienia następuje aktywacja białek Rop i uruchomienie kaskady sygnałowej. Aktywacja Rop zachodzi pod wpływem białek RopGEF zawierających domenę PRONE (ang. *plant-specific Rop nucleotide exchanger*), katalizującą odłączenie GDP od Rop umożliwiając w ten sposób związanie Rop z GTP [30]. Białka RopGEF mogą stanowić element szlaku przekazywania sygnału z kinaz receptorowych na białka Rop [30]. Powrót białka Rop z formy aktywnej (Rop-GTP) do formy nieaktywnej (Rop-GDP) zachodzi w wyniku stymulacji jego aktywności jako GTPazy przez białka RopGAP (ang. *Rop GTPase activating protein*)



[31] (Rys. 2). Białka Rop regulują między innymi zmiany stężenia  $\text{Ca}^{2+}$ , produkcję nadtlenu wodoru, programowaną śmierć komórki [28].

Rolę białek Rop w odpowiedzi na hipoksję wykazano przy użyciu roślin transgeniczných *A. thaliana* z genem reporterowym *Ds-GUS* specyficznym indukowanym przez niedobór tlenu [32,33]. Wyizolowano mutant *ropgap4-1*, który utracił aktywność białka Rop jako GTPazy i wykazywał podwyższoną akumulację mRNA *ADH* oraz wyższą aktywność enzymatyczną *ADH*. Mutant *35S:DN-rop2*, w którym białko *ROP2* było trwale połączone z GDP, nie wykazywał wzrostu poziomu transkryptu genu kodującego *ADH* w odpowiedzi na niedobór tlenu, natomiast mutant *35S:Ca-rop2*, u którego białko *ROP2* było konstytutywnie związane z GTP miał podwyższoną aktywność *ADH* w warunkach kontrolnych. W roślinach kontrolnych obserwowano istotny wzrost poziomu białka Rop w kompleksie z GTP podczas 1,5 godz. hipoksji i spadek pomiędzy 12 a 24 godz. ekspozycji na niskie stężenie tlenu. Wszystkie analizowane linie mutantów wykazywały nadwrażliwość na niedobór tlenu, co wskazuje, że mechanizm tolerancji na hipoksję może polegać na przejściowej aktywacji Rop i umiarkowanej indukcji *ADH* [32]. W warunkach hipoksji obserwowano także wzrost poziomu nadtlenu wodoru w roślinach kontrolnych. Znacznie wyższy poziom  $\text{H}_2\text{O}_2$  niż w kontroli stwierdzono u mutantu *ropgap4-1*, natomiast u mutantu *35S:DN-rop2* nie obserwowano wzrostu stężenia  $\text{H}_2\text{O}_2$  w odpowiedzi na niedobór tlenu. Traktowanie siewek kontrolnych oraz badanych mutantów *A. thaliana* inhibitorem flawoprotein hamowało produkcję nadtlenu wodoru i aktywność *ADH* w niskim stężeniu tlenu. Wykazano natomiast indukcję aktywności *ADH* w warunkach tlenowych, gdy  $\text{H}_2\text{O}_2$  był syntetyzowany na powierzchni siewek w reakcjach enzymatycznych [32]. Wyniki te stanowią potwierdzenie hipotezy zakładającej udział reaktywnych form tlenu w szlaku przekazywania sygnału odpowiedzialnym za indukcję *ADH* w warunkach niedotlenienia.

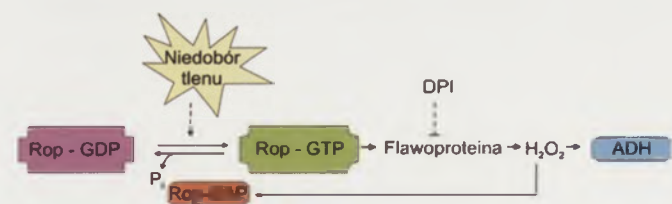
W warunkach niedoboru  $\text{O}_2$  źródłem reaktywnych form tlenu może być mitochondrialny łańcuch oddechowy. Anionorodnik ponadtlenny, powstający w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów w wyniku jednoelektronowej redukcji zachodzącej z udziałem flawin lub ubiquinonu, może ulec spontanicznej dysmutacji lub przekształceniu przez mitochondrialną dysmutazę ponadtlenną do nadtlenu wodoru [34].  $\text{H}_2\text{O}_2$  z mitochondriów może dyfundować do cytoplazmy i pełnić funkcję cząsteczki sygnałowej

lub powodować uszkodzenia komórkowe. Innym źródłem  $\text{H}_2\text{O}_2$  w warunkach niedotlenienia mogą być flawoproteiny [29]. Jak już wcześniej wspomniano inhibitor flawoprotein – DPI (ang. *diphenylene idonium chloride*) zmniejszał produkcję  $\text{H}_2\text{O}_2$  i aktywność *ADH* w siewkach *A. thaliana* w warunkach niedoboru tlenu [32]. DPI hamuje liczne enzymy, między innymi plazmolemową oksydazę *NAD(P)H* zależną od  $\text{Ca}^{2+}$ , dehydrogenazę *NADH* z wewnętrznej błony mitochondrialnej, oksydazę *NAD(P)H* i syntazę tlenku azotu [35, 36]. Analizy przeprowadzone na korzeniach pszenicy i ryżu oraz kłączach kosańca rosnących w warunkach hipoksji wykazały wzrost poziomu nadtlenu wodoru głównie w plazmolemie i w apoplacie [37]. Plazmolemowa oksydaza *NAD(P)H* jest odpowiedzialna za zewnątrzkomórkową produkcję anionorodnika ponadtlennego i tym samym powstawanie  $\text{H}_2\text{O}_2$  z udziałem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  [35]. Kiedy stężenie tlenu jest niskie w cytosolu wzrasta stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  uwalnianego z mitochondriów i napływającego z apoplastu. Wykazano, że wzrost stężenia jonów wapnia jest konieczny do zwiększenia poziomu transkryptu *ADH* [38, 39] i utworzenia aerenchymy [5]. Fukao i Bailey-Serres [29] sugerują, że poziom  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce wzrasta zanim białko Rop w kompleksie z GTP inicjuje sygnał, gdyż oksydazy *NAD(P)H* zlokalizowane w błonie plazmatycznej i mitochondrialnej wymagają jonów wapnia do aktywacji. Aktywacja oksydazy *NAD(P)H* zlokalizowanej w błonie plazmatycznej może prowadzić do otwarcia kanałów wapniowych i dalszego wzrostu stężenia  $\text{Ca}^{2+}$ . Na uwagę zasługuje fakt, że katalaza zależna od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny zmniejszała zakres uszkodzeń powodowanych przez  $\text{H}_2\text{O}_2$  [40].

## ROLA HEMOGLOBIN INDUKOWANYCH HIPOKSJĄ I TLENKU AZOTU W ODPOWIEDZI NA NIEDOTLENIE

Hemoglobiny indukowane w warunkach niedoboru tlenu odkryto 20 lat temu. Początkowo przypisywano im rolę cząsteczek sygnałowych regulujących ekspresję białek w warunkach obniżonego stężenia tlenu lub nośników tlenu ułatwiających dyfuzję  $\text{O}_2$  [41]. Obecnie postuluje się udział hemoglobin indukowanych przez niskie stężenie tlenu (klasa 1) w adaptacji komórek do warunków deficytu tlenowego. Doświadczenia przeprowadzone na transformowanych komórkach kukurydzy [42], w których uzyskano konstytutywną ekspresję genu hemoglobiny z jęczmienia wykazały, że hemoglobiny odpowiedzialne są za utrzymywanie statusu energetycznego komórek w warunkach niskiego stężenia tlenu. Sowa i wsp. [42] sugerują, że hemoglobiny indukowane stresem umożliwiają przebieg glikolizy poprzez reoksydację *NADH* i tym samym syntezę ATP w procesie fosforylacji substratowej (stała dysocjacji dla oksyhemoglobiny z jęczmienia wynosi 3 nM, co wyklucza udział oksyhemoglobiny w dostarczaniu tlenu dla procesu oddychania mitochondrialnego). Podobną rolę hemoglobiny mogą spełniać w komórkach odznaczających się dużym zapotrzebowaniem energetycznym. Wysoki poziom mRNA hemoglobin indukowanych w warunkach obniżonego stężenia tlenu stwierdzono w korzeniach i liściach rozetowych jęczmienia [43], młodych liściach, pędach i korzeniach soi [44], liściach i korzeniach ryżu [45] oraz korzeniach *A. thaliana* [46].

Nowych informacji na temat roli hemoglobin indukowanych w warunkach niskiego poziomu tlenu dostarczyły



**Rysunek 2.** Udział białka Rop w wewnątrzkomórkowej kaskadzie sygnalizacyjnej związanej z odpowiedzią na obniżone stężenie tlenu. Spadek poziomu tlenu w komórce powoduje aktywację białka Rop i produkcję  $\text{H}_2\text{O}_2$  przez flawoproteinę wrażliwą na DPI (inhibitor flawoprotein), co prowadzi do wzrostu poziomu mRNA *ADH* i zwiększenia aktywności *ADH*. Wzrost stężenia  $\text{H}_2\text{O}_2$  powoduje powrót białka Rop z formy aktywnej (Rop-GTP) do formy nieaktywnej (Rop-GDP) w wyniku stymulacji jego aktywności jako GTPazy przez białko RopGAP (zmodyfikowano wg [29]).







sygnalizacyjnych uruchamianych w warunkach obniżonego stężenia tlenu. Konieczne są jednak dalsze badania nad określeniem sposobu percepcji zmian stężenia tlenu oraz kolejnych etapów szlaku przekazywania sygnału. Połączenie danych uzyskanych w wyniku zastosowania techniki mikromacierzy z analizą funkcjonalną produktów ekspresji genów pozwoli na zrozumienie molekularnych mechanizmów odpowiedzi roślin na niedotlenienie.

## PIŚMIENNICTWO

- Ricard B, Couée I, Raymond P, Saglio PH, Saint-Ges V, Pradet A (1994) Plant metabolism under hypoxia and anoxia. *Plant Physiol Biochem* 32: 1-10
- Armstrong W, Brändle R, Jackson MB (1994) Mechanism of flood tolerance in plants. *Acta Bot Neerl* 43: 307-358
- Drew MC (1997) Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 223-250
- Good AG, Paetkau DH (1992) Identification and characterization of a hypoxically induced maize lactate dehydrogenase gene. *Plant Mol Biol* 19: 693-697
- Drew MC, He I, Morgan PW (2000) Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci* 5: 123-127
- Gunavardena AH, Pearce DM, Jackson MB, Hawes CR, Evans DE (2001) Characterization of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta* 212: 205-214
- Kennedy RA, Rumpho ME, Fox TC (1992) Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiol* 100: 1-6
- Perata P, Alpi A (1993) Plant responses to anaerobiosis. *Plant Sci* 93: 1-17
- Vartapetian BB, Jackson MB (1997) Plant adaptation to anaerobic stress. *Ann Bot* 79: 3-20
- de Sousa CAF, Sodek L (2002) The metabolic responses of plants to oxygen deficiency. *Braz J Plant Physiol* 14: 83-94
- Geigenberger P (2003) Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr Opin Plant Biol* 6: 247-256
- Gibbs J, Greenway H (2003) Mechanism of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Funct Plant Biol* 30: 1-47
- Crawford R, Brändle R (1996) Oxygen deprivation stress in a changing environment. *J Exp Bot* 47: 145-159
- Vartapetian BB, Andreeva IN, Generozova IP, Polyakova LI, Maslova IP, Dolgikh YI, Stepanova AYU (2003) Functional electron microscope in studies of plant response and adaptation to anaerobic stress. *Ann Bot* 91: 155-172
- Subbaiah CC, Sachs MM (2003) Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. *Ann Bot* 90: 119-127
- Klok EJ, Wilson IW, Wilson D, Chapman SC, Ewing RM, Somerville SC, Peacock WJ, Dolferus R, Dennis ES (2002) Expression profile analysis of the low-oxygen response in *Arabidopsis* root culture. *Plant Cell* 14: 2481-2494
- Dennis ES, Dolferus R, Ellis M, Rahman M, Wu Y, Hoeren FU, Grover A, Ismond KP, Good AG, Peacock WJ (2000) Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *J Exp Bot* 51: 89-97
- Sachs MM, Subbaiah CC, Saab IN (1996) Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. *J Exp Bot* 47: 1-15
- Chang WWP, Huang L, Shen M, Webster C, Burlingame AL, Roberts JKM (2000) Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. *Plant Physiol* 122: 295-317
- Garnczarska M, Bednarski W, Morkunas I (2004) Re-aeration-induced oxidative stress and antioxidative defenses in hypoxically pretreated lupine roots. *J Plant Physiol* 161: 415-422
- Garnczarska M, Bednarski W (2004) Effect of a short-term hypoxic treatment followed by re-aeration on free radicals level and antioxidative enzymes in lupine roots. *Plant Physiol Biochem* 42: 233-240
- Shelp BJ, Bown AW, McLean MD (1999) Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci* 4: 446-451
- Muench DG, Good AG (1994) Hypoxically inducible barley alanine aminotransferase; cDNA cloning and expression analysis. *Plant Mol Biol* 24: 417-427
- Grace SC, Logan BA (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Phil Trans R Soc Lond* 355: 1499-1510
- Dolferus R, Jacobs M, Peacock WJ, Dennis ES (1994) Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis Adh* gene. *Plant Physiol* 105: 1075-1087
- Hoeren F, Dolferus R, Wu Y, Peacock WJ, Dennis ES (1998) Evidence for a role for AtMYB2 in the induction of the *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase (*Adh1*) gene by low oxygen. *Genetics* 149: 479-490
- Assmann SM (2002) Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. *Plant Cell* 14: 355-373
- Yang Z (2002) Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell* 14: 375-388
- Fukao T, Bailey-Serres J (2004) Plant responses to hypoxia - is survival a balancing act? *Trends Plant Sci* 9: 449-456
- Berken A, Thomas C, Wittinghofer A (2005) A new family of Rho-GEFs activates the Rop molecular switch in plants. *Nature Letters* 03883, published online 26 June 2005
- Wu G, Li H, Yang ZB (2000) *Arabidopsis* RopGAPs are a novel family of Rho GTPase-activating proteins that require the Cdc42/Ras-interacting binding motif for Rop-specific GTPase stimulation. *Plant Physiol* 124: 1625-1636
- Baxter-Burrell A, Yang Z, Springer PS, Bailey-Serres J (2002) RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of *Arabidopsis* oxygen deprivation tolerance. *Science* 296: 2026-2028
- Baxter-Burrell A, Chang R, Spring P, Bailey-Serres J (2003) Gene and enhancer trap transposable elements reveal oxygen deprivation-regulated genes and their complex patterns of expression in *Arabidopsis*. *Ann Bot* 91: 129-141
- Fleury C, Mignotte B, Vayssières JL (2002) Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84: 131-141
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM, Dolan L (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446
- Möller IM (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 561-591
- Blokhina O, Chirkova TV, Fagerstedt KV (2001) Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. *J Exp Bot* 359: 1179-1190
- Tsuji H, Nakazono M, Saisho D, Tsutsumi N, Hirai A (2000) Transcript levels of the nuclear-encoded respiratory genes in rice decrease by oxygen deprivation: evidence for involvement of calcium in expression of the *alternative oxidase 1a* gene. *FEBS Lett* 471: 201-204
- Chung HJ, Ferl RJ (1999) *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase expression in both shoots and roots is conditioned by root growth environment. Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. *Ann Bot* 90: 119-127
- Yang T, Poovaiah BW (2002) Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4097-4102



41. Appelby CA (1992) The origin and functions of haemoglobin in plants. *Sci Prog* 76: 365-398
42. Sowa AW, Duff SMG, Guy PA, Hill RD (1998) Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10317-10321
43. Taylor ER, Nie XZ, MacGregor AW, Hill RD (1994) A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. *Plant Mol Biol* 24: 835-841
44. Andersson CR, Jensen EO, Llewellyn DJ, Dennis ES, Peacock WJ (1996) A new hemoglobin gene from soybean: a role for hemoglobin in all plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5682-5687
45. Arredondo-Peter R, Hargrove MS, Sarath G, Moran JF, Lohrman J, Olson JS, Klucas RV (1997) Rice hemoglobins: gene cloning, analysis and oxygen binding kinetics of a recombinant protein synthesized in *Escherichia coli*. *Plant Physiol* 115: 1259-1266
46. Trevaskis B, Watts RA, Andersson C, Llewellyn D, Hargrove MS, Olson JS, Dennis ES, Peacock WJ (1997) Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: the evolutionary origins of leghemoglobins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12230-12234
47. Hunt PW, Klok EJ, Trevaskis B, Watts RA, Ellis MH, Peacock WJ, Dennis ES (2002) Increased level of hemoglobin 1 enhances survival of hypoxic stress and promotes early growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 17197-17202
48. Dordas C, Rivoal J, Hill RD (2003) Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxic stress. *Ann Bot* 91: 173-178
49. 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
50. Yamasaki H, Sakihama Y (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* 486: 89-92
51. Botrel A, Kaiser WM (1997) Nitrate reductase activation state in barley roots in relation to the energy and carbohydrate status. *Planta* 201: 496-501
52. Wennmalm A, Benthin G, Petersson AS (1992) Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin. *Br J Pharmacol* 106: 507-508
53. Clarke A, Desikan R, Hurst RD, Hancock JT, Neill SJ (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J* 24: 667-677

## Molecular aspects of plant responses to oxygen deprivation stress

Małgorzata Garnczarska 

Department of Plant Physiology, Adam Mickiewicz University, 14 al. Niepodległości, 61-713 Poznań, Poland  
e-mail: garnczar@amu.edu.pl

**Key words:** gene expression, hypoxia, microarrays, oxygen deficiency, signal transduction

### ABSTRACT

Oxygen shortage – hypoxia is a common phenomenon in the environment. Plants response to such stress conditions by developing a number of morphological and metabolic strategies. These changes are usually preceded or accompanied by activation or repression of specific genes. DNA microarray technology showed that differentially expressed genes include the known anaerobic proteins as well as transcription factors, signal transduction components, and genes that encode enzymes of pathways not known previously to be involved in low-oxygen metabolism. Selection and characterization of various mutants with altering tolerance to hypoxia provide information that help in elucidating possible signal transduction pathways that regulate responses to oxygen deficiency. Recently, many studies have been focused on the role of Rop proteins,  $H_2O_2$  and  $Ca^{2+}$ , as second messengers in hypoxia responses. Stress-induced hemoglobins may help maintaining the energy status of cells under low oxygen stress or function as dioxygenases, detoxifying NO produced during hypoxia.

### DO CZŁONKÓW POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego usilnie prosi wszystkich Członków zalegających ze składką członkowską za rok 2005 i za lata wcześniejsze, a także członków „zawieszonych” w prawach członkowskich, o uregulowanie zadłużenia, a także o opłacenie bieżącej składki, ewentualnie o powiadomienie Towarzystwa o rezygnacji z członkostwa. Zarząd Główny od każdego zarejestrowanego członka, niezależnie od tego, czy opłaca on czy też nie roczną składkę, odprowadza część tej składki do FEBS. To także powód, dla którego uporządkowanie spraw członkowskich jest konieczne. O wysokości ewentualnego zadłużenia mogą się Państwo dowiedzieć korespondencyjnie:

e-mail: ptbioch@nencki.gov.pl

lub drogą pocztową: Zarząd Główny PTBioch, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa,  
ewentualnie telefonicznie w biurze Towarzystwa, tylko we wtorki w godz. 12:00 – 18:00,  
tel. 022-5892-352 lub tel./fax. 022-5892-499.

Wpłaty należy dokonać na konto

94 1060 0076 0000 4010 5000 0341

BPH S.A. ODDZIAŁ WARSZAWA, UL. KRUCZA 24/26

Do wszystkich osób zalegających za składkami zostaną wkrótce wysłane monity z ostrzeżeniem skreślenia z listy członków. By oszczędzić sobie i nam tej przykrej i wielce pracochłonnej formalności, jeszcze raz apelujemy o możliwie szybkie uregulowanie sprawy zaległych składek lub zadeklarowanie wystąpienia z Towarzystwa.

Skarbnik Towarzystwa

dr Anna Dygas (adygas@nencki.gov.pl)



### WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

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

Autorzy odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowanego piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienia zilustrowane za pomocą tabel i rycin (wykresy, schematy, reakcje, wzory chemiczne, fotografie), w uzasadnionych przypadkach kolorowych. W przypadku, gdy Autorzy zamierzają włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów cytowanych prac oryginalnych, do czego Redakcja zechęca, 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 odautorskich, Autorzy otrzymują drogą elektroniczną opinię recenzentów i proszeni są o przygotowanie poprawionej wersji manuskryptu i odesłanie go do Redakcji w ciągu 8 tygodni. Ostateczną decyzję o przyjęciu pracy podejmuje Redaktor Naczelny w ciągu 2 tygodni od otrzymania poprawionej wersji manuskryptu.

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

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

#### WSKAZÓWKI SZCZEGÓŁOWE:

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

#### PRZYGOTOWANIE MANUSKRYPTU:

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

#### ORGANIZACJA MANUSKRYPTU:

Wskazany jest podział artykułu na nienumerowane rozdziały i podrozdziały.

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

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

**Kolejno numerowane strony** obejmują streszczenie (do 150 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 DN, MacKinnon R (2004) Electron microscopic analysis of KvAP voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in an open conformation. *Nature* 430: 806-810
2. Toyoshima C, Inesi G (2004) Structural basis of ion pumping by Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73: 269-292
3. Dolowy K, Szewczyk A, Piłkuła S (2003) *Błony biologiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 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. Darżynkiewicz E, Jankowska-Anyszka M (2000) Struktura i funkcja końca 5' (KAPU) mRNA i U snRNA, W: Koroniak H, Barciszewski J (red) *Na pograniczu chemii i biologii*, t IV. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań, str. 143-179

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

**Ilustracje:** ryciny winny być zapisane jako: \*.tif, \*.cdr, \*.psd, lub \*.eps. Ryciny powinny być wykonane w skali 1:1. Wielkość ryciny powinna być dostosowana do szerokości jednego łamu (8,5 cm) lub strony (18 cm). Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Opisy na rysunkach powinny być wykonane czcionką Arial 8. 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).

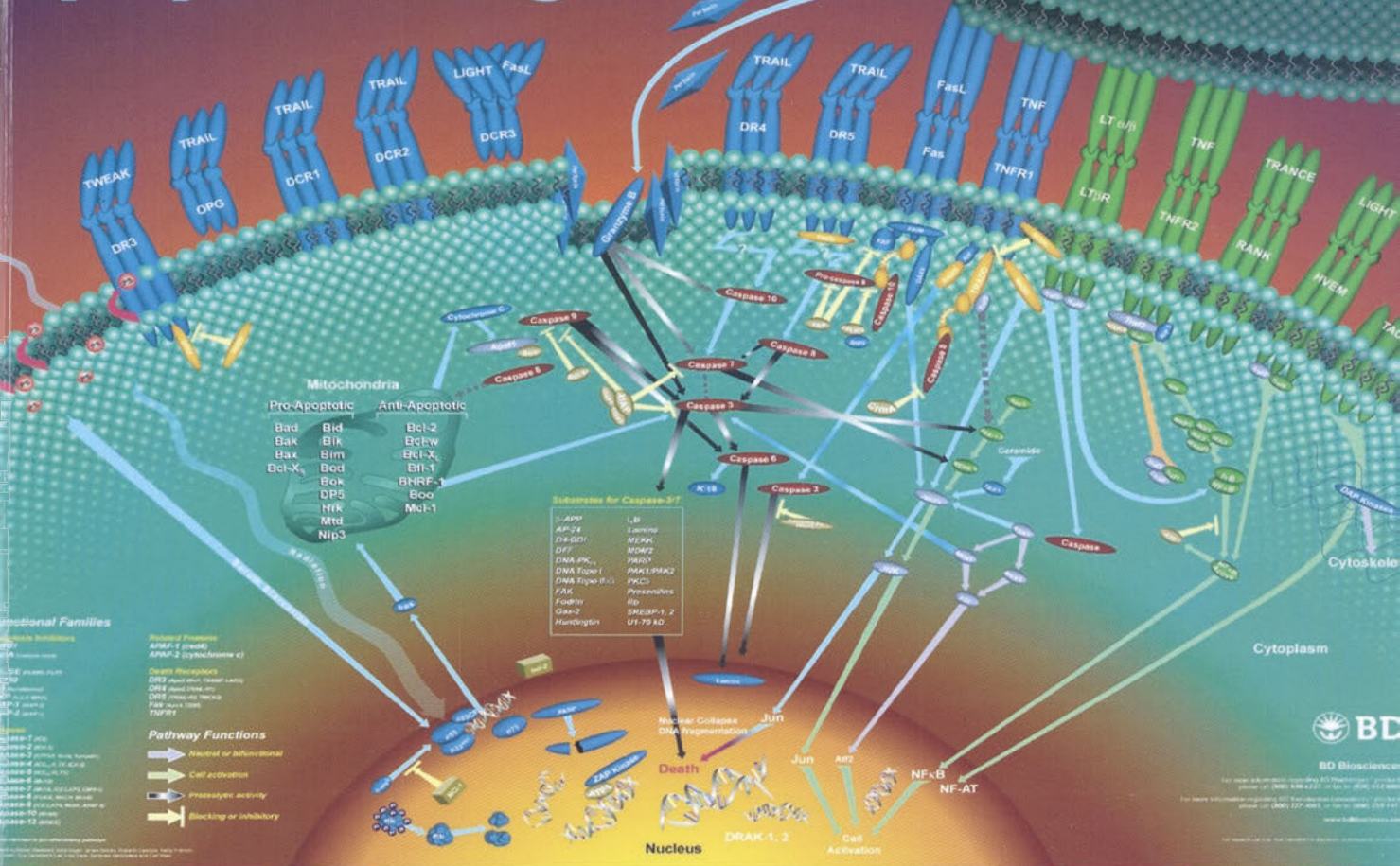
Prace w formie elektronicznej prosimy przysyłać na adres:  
[postepy@nencki.gov.pl](mailto:postepy@nencki.gov.pl)

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

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



## Apoptosis Signals



## W naszej ofercie posiadamy:

- przeciwciała do cytometrii przepływowej, western blot, mikroskopii fluorescencyjnej
- gotowe zestawy do badania apoptozy różnymi technikami np.: Aneksyna V, Tunel, potencjał mitochondrialny, aktywne kaspazy i ich produkty
- badanie sygnałowych białek cytosolowych, cytokin i chemokin na cytometrze przepływowym metodą FlexSet – do kilkudziesięciu białek jednocześnie (tzw. ELISA na cytometr).

**Zapewniamy fachową pomoc przy wdrażaniu pomiarów z naszymi odczynnikami na cytometrze.**

BD Biosciences, ul. Królowej Marysieńki 90, 02-954 Warszawa

tel.: +48 22 651 75 88, faks: +48 22 651 75 89

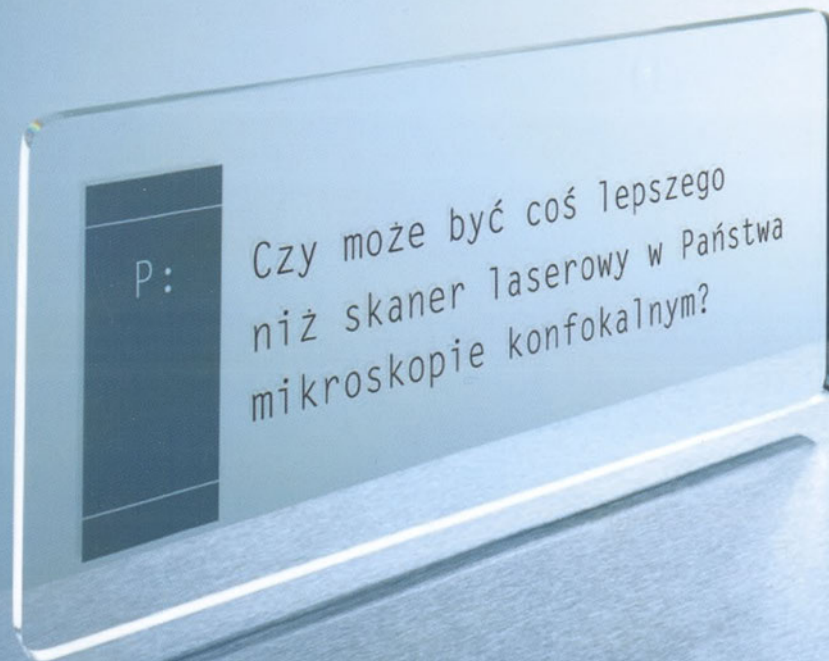
<http://rcin.org.pl>

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



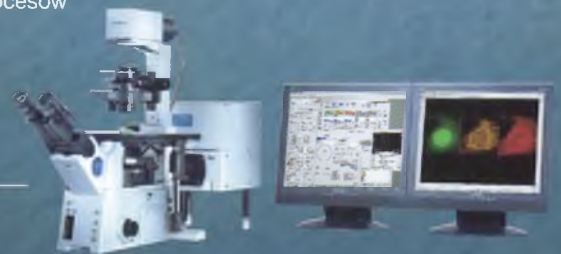
**BD**





## 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. (22) 860 00 77, Faks (22) 831 04 53  
mikroskopy@olympus.pl  
[www.olympus.pl](http://www.olympus.pl)