

POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2007
TOM 53
NUMER 1

Fullereny w biologii
Regulacja biosyntezy etylenu w roślinach
GTPazy mitochondriów
Małe białka szoku termicznego



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

www.postepybiochemii.pl

<http://rcin.org.pl>

NucliSENS™ system

Przełom w ekstrakcji kwasów nukleinowych

AUTOMATYCZNA EKSTRAKCJA MAGNETYCZNA



NucliSENS™
— easyMAG

PÓŁAUTOMATYCZNA EKSTRAKCJA MAGNETYCZNA



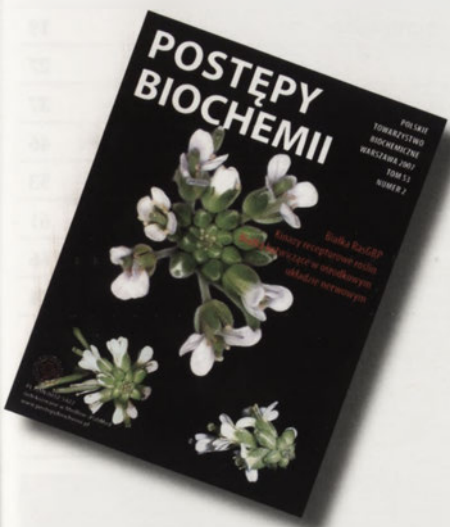
NucliSENS™
— miniMAG

Ekstrakcja NucliSENS

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



B I O M É R I E U X



W NASTĘPNYM NUMERZE:

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Białka RasGRPMateusz Szamałek,
Wanda Baer-Dubowska**Kinazy receptorowe roślin**Anna Jakubowska,
Maciej Ostrowski,
Stanisław Kowalczyk**Białka kotwiczące w ośrodkowym układzie nerwowym**

Małgorzata Beręsewicz

WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

Wiadomości krajowe pod red. Teresy Wesołowskiej	1
--	---

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Rola i znaczenie surwiwiny w przebiegu mitozy Kamila Wolanin, Katarzyna Piwocka	10
Małe białka szoku termicznego - rola w apoptozie, kancerogenezie i chorobach związanych z agregacją białek Ewa Laskowska	19
Charakterystyka białek z rodziny HtrA Dorota Żurawa-Janicka, Joanna Narkiewicz, Barbara Lipińska	27
Kolagenazy typu IV (MMP-2 i MMP-9) i ich substraty - białka macierzy pozakomórkowej, hormony, cytokiny, chemokiny i ich receptory Elżbieta Hrabec, Julia Naduk, Małgorzata Stręć, Zbigniew Hrabec	37
Rola lamin i mutacji genu LMNA w fizjologicznym i przedwczesnym starzeniu Małgorzata Alicja Śliwińska	46
Rola transbłonowych GTPaz w morfologii i aktywności mitochondriów Patrycja Pawlikowska, Arkadiusz Orzechowski	53
Tuftsyna - nowe analogi i właściwości Anna Wardowska, Krystyna Dzierzbicka, Andrzej Myśliwski	60

BIOCHEMIA I BIOLOGIA MOLEKULARNA ROŚLIN

Regulacja biosyntezy etylenu u roślin Kamil Frankowski, Jacek Kęsy, Jan Kopcewicz	66
Nowe spojrzenie na proces degradacji ziaren skrobi w chloroplastach <i>Arabidopsis thaliana</i> L. Dorota Samojedny, Sławomir Orzechowski	74
Różnorodność i regulacja kanałów wodnych w świecie roślin Paweł Mateusz Mordaka, Grażyna Dąbrowska	84

NOWE W BIOCHEMII

Fuleryny w biologii Anita Krokosz	91
--------------------------------------	----

Rysunek na okładce:

Front cover image „DewDrops” by Robbie
K. Burger, <http://customposterworks.com>,
with permission.

REVIEWS

Role of survivin in mitosis	10
Small heat shock proteins – role in apoptosis, cancerogenesis and diseases associated with protein aggregation	19
Characterization of the HtrA family of proteins	27
Substrates of matrix metalloproteinases	37
The role of lamins and mutations of LMNA gene in physiological and premature aging	46
Role of transmembrane GTPases in mitochondrial morphology and activity	53
Tuftsins – new analogues and properties	61
Regulation of ethylene biosynthesis in plants	66
New look at starch degradation in <i>Arabidopsis thaliana</i> L. chloroplasts	74
The high diversity and regulation of plant water channels	84
Fullerenes in biology	91

KILKA SŁÓW OD REDAKTORA

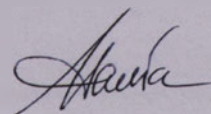
Szanowni Państwo,

Rozpoczynamy nowy rok działalności naszej redakcji i jak zawsze nie mogę, niestety, ustrzec się myśli o zagrożeniach, jakie mogą spotkać czasopismo w przyszłości. Jedno z nich to możliwość, że spadnie liczba prac, które Państwo nadsyłacie do naszej redakcji, a drugie, że „Postępy Biochemii” mogą przeżyć krach finansowy, którego nie udźwignie Polskie Towarzystwo Biochemiczne. Na tego rodzaju myśli jedynym lekarstwem jest analiza ubiegłego roku pod względem sposobów radzenia sobie z tymi zagrożeniami.

W 2006 roku wydrukowaliśmy 47 artykułów przeglądowych i 1 artykuł sponsorowany, z łącznie 64 nadesłanych prac, co stanowi 75 procent artykułów przyjętych do druku. Autorzy większości z wydrukowanych artykułów (79,1 procent) wspólnie pokryli częściowe koszty druku własnych prac. Nie zawiedli też nasi sponsorzy: Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Prezydium Polskiej Akademii Nauk; dzięki pomocy finansowej wspomnianych instytucji ukazał się m. in. numer 4 (specjalny) z 2006 roku, poświęcony szlakom przekazywania sygnałów w komórce i diagnostyce molekularnej. Szczególne podziękowania należą się także firmom biomedycznym oraz firmom oferującym sprzęt badawczy i odczynniki, takim jak Merck Sp. z o.o., Olympus, BD Bioscience, Santa Cruz Biotechnology Inc, Abo Grażyna Boreysza, bioMérieux Polska, oraz wydawnictwu naukowemu PWN za wspieranie działalności wydawniczej Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Mam nadzieję, że z podobną wspaniałomyślnością spotkamy się także w 2007 roku, bo bez takiej pomocy byłoby nasze czasopismo niemożliwe.

Jako redaktor naczelny szczególnie cenię sobie Państwa uwagi, które pomagają mi w codziennej pracy nad udoskonalaniem czasopisma. Dlatego bardzo proszę o kierowanie Państwa opinii na adres poczty elektronicznej s.pikula@nencki.gov.pl. Dziękuję za uwagę i zapraszam jak zwykle do lektury naszego czasopisma oraz do odwiedzania naszej strony internetowej pod adresem www.postepybiochemii.pl.

Sławomir Pikula



PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII

OLYMPUS

Your Vision, Our Future



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

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

Redaktorzy: Joanna Bandorowicz-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 Szkiel, Adam Szewczyk, Tomasz Twardowski, Marek Zembala, Krzysztof Zabłocki, Alicja Żylicz

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

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

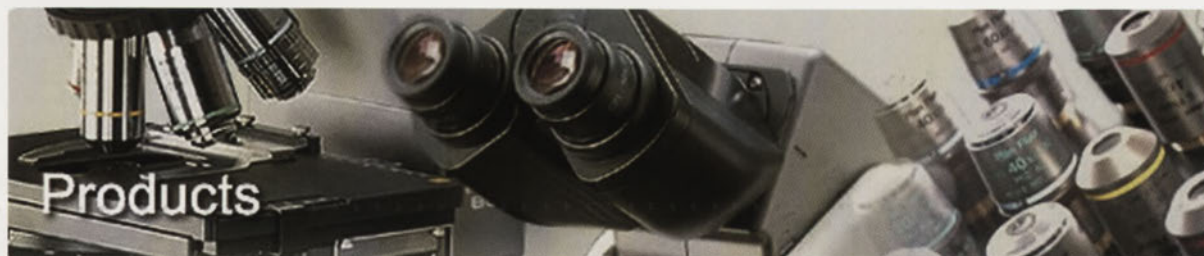
Adres redakcji: „Postępy Biochemii”, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: postepy@nencki.gov.pl; <http://www.postepybiochemii.pl>

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

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

ul. Ractawicka 33/52
02-601 WARSZAWA
E-mail: inlab@inlab.com.pl

TEL/FAX: ++48 22 844 74 63
TEL: ++48 22 844 65 13



MIKROSKOPY NOWEJ GENERACJI

ECLIPSE FIRMY *NIKON*



- Unikalny okład optyczny CFI60 z rewelacyjnymi obiektywami o najwyższych parametrach.
- Orginalne rozwiązania mechaniczno-elektroniczne zapewniające najwyższy komfort pracy.
- Perfekcyjna rejestracja i analiza obrazu przez kolorowe i czarno-białe kamery cyfrowe oraz program NIS.

Imaging Software

Elements

Oferujemy:

- doradztwo techniczne i handlowe
- kompleksową obsługę uwzględniającą dostawę, instalację i szkolenie
- serwis gwarancyjny i pogwarancyjny

Posiadamy liczne referencje

Zapraszamy do współpracy

INLAB BTH dystrybutor mikroskopów firmy



Polimerazy do Hot-Start PCR

Nowości!

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

Zastosowanie:

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

Taq DNA TrueStart™

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

Taq DNA Hot Start

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

abe

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



WIADOMOŚCI KRAJOWE

pod redakcją Teresy Wesolowskiej



Fot. 1. Profesor Michał Kleiber, Prezes PAN

Prof. Michał Kleiber (Fot. 1) w dniu 14 grudnia 2006 r. został wybrany nowym prezesem Polskiej Akademii Nauk przez Zgromadzenie Ogólne PAN. Zastąpił na tym stanowisku prof. Andrzeja Legockiego. Kontrkandydatem prof. Michała Kleibera był prof. Andrzej Kajetan Wróblewski. Profesor Michał Kleiber (ur. 1946 r.) jest specjalistą w zakresie zastosowań nowoczesnych technik komputerowych w badaniach naukowych, technice i medycynie. Ukończył Wydział Inżynierii Lądowej Politechniki Warszawskiej oraz Wydział Matematyki, Informatyki i Mechaniki Uniwersytetu Warszawskiego. W 1995 r. został dyrektorem Instytutu Podstawowych Problemów Techniki PAN, w którym od 1986 roku kieruje Zakładem Metod Komputerowych. Przez wiele lat był wykładowcą na Wydziale Matematyki i Nauk Informacyjnych Politechniki Warszawskiej. Jest także Sekretarzem Generalnym Europejskiego Towarzystwa Metod Komputerowych w Naukach Stosowanych oraz Prezesem Środkowoeuropejskiego Towarzystwa Metod Komputerowych i Mechaniki. Zasiada w radach redakcyjnych

kilkunastu międzynarodowych czasopism naukowych. Jest m.in. redaktorem naczelnym prestiżowego czasopisma o zasięgu międzynarodowym: „Archives of Computational Methods in Engineering”. W latach 2001-2005 był ministrem nauki i informatyzacji oraz przewodniczącym Komitetu Badań Naukowych. Obecnie pełni m.in. funkcję społecznego doradcy Prezydenta RP, jest członkiem Europejskiej Rady Nauki, Rady Programowej Polskiego Forum Strategii Lizbońskiej oraz prezesem organizacji European Materials Forum. W 2001 roku prof. Kleiber otrzymał Nagrodę Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (tzw. Polskiego Nobla) w dziedzinie nauk technicznych (wg PAP - Nauka w Polsce).

Prof. Wojciech Kostowski 1 stycznia 2007 r. został nowym przewodniczącym Wydziału Nauk Medycznych PAN. Zastąpił na tym stanowisku prof. Andrzeja Trzebskiego. Prof. Kostowski będzie pełnił w/w funkcję w latach 2007-2010. Dotychczas był wiceprzewodniczącym Wydziału Nauk Medycznych PAN. Prof. Kostowski specjalizuje się w psychofarmakologii. Prowadził badania między innymi nad przekąźnikami nerwowymi, wpływem noradrenaliny na działanie leków przeciwdepresyjnych. Wykazał, że serotonina i dopamina pełnią rolę w zachowaniach agresywnych mrówek. W ostatnim dziesięcioleciu skupił się na problematyce działania środków uzależniających, w tym alkoholu, morfiny i kokainy. Serotonina, jego zdaniem, może mieć wpływ na to działanie. Opracował własną koncepcję powstawania uzależnień opartą na założeniu, że decydującą rolę w tej kwestii może odgrywać upośledzenie zaspokajania popędów. Prof. Kostowski pracuje między innymi w Instytucie Psychiatrii i Neurologii w Warszawie. Jest członkiem kilku komitetów PAN - Nauk Fizjologicznych, Nauk Neurologicznych oraz Neurobiologii.

Dnia 9 listopada 2006 r. w Ministerstwie Nauki i Szkolnictwa Wyższego odbyło się plenarne posiedze-

nie Rady Nauki z udziałem prezesów PAN i PAU, prezesa Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, przewodniczących Rady Głównej Jednostek Badawczo-Rozwojowych, Rady Głównej Szkolnictwa Wyższego oraz przewodniczącego Komisji do spraw Nauki KRASP. W trakcie obrad Minister Nauki i Szkolnictwa Wyższego, prof. Michał Seweryński, przedstawił tezy programu prac resortu w zakresie polityki naukowej państwa. Projektowane zmiany systemu nauki mają służyć dwóm celom: skuteczniejszemu przełożeniu badań na innowacyjność gospodarki, zautonomizowaniu procesu organizowania, finansowania i wdrażania badań naukowych. Do realizacji tych celów mają być powołane dwie autonomiczne agencje. Rozdział budżetowych środków finansowych na badania naukowe ma być wyłączony spod kompetencji Ministerstwa. Dystrybucja środków ma być niezależna od instytucji politycznych. W pierwszej połowie 2006 r. rozpoczęły się prace nad opracowaniem koncepcji Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBR). Projekt ustawy powołującej Centrum przeszedł już przez fazę uzgodnień międzyresortowych i został skierowany do Komisji Prawnej, a potem zostanie przekazany Radzie Ministrów. Minister Seweryński podziękował przedstawicielom środowiska naukowego za cenne uwagi i sugestie dotyczące Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Zadaniem NCBR będzie organizowanie badań naukowych i prac rozwojowych, podejmowanych w ramach programów o strategicznym znaczeniu dla rozwoju cywilizacyjnego i gospodarczego kraju, zlecanych do realizacji przez ministra nauki oraz za jego zgodą przez inne podmioty. Minister zapewnił, że Centrum będzie instytucją autonomiczną. Jej związek z ministrem nauki będzie porównywalny do relacji między ministrem a szkołami wyższymi. NCBR będzie dysponowało własnym budżetem. Kierowane będzie przez dyrektora powoływane go przez ministra, zaś Rada Centrum,

składająca się z przedstawicieli środowisk nauki, gospodarki i finansów oraz administracji rządowej, będzie pełniła funkcję opiniodawczą. Dyrektor, w zakresie realizacji zadań agencji, będzie mógł zasięgać opinii ekspertów zarówno z kraju, jak i z zagranicy. W ramach otrzymanego budżetu centrum będzie ogłaszać konkursy na projekty badawcze, zawierać umowy ze zwycięzcami konkursów, nadzorować przebieg realizacji projektów, a także odbierać ukończone już prace. Nowym zadaniem NCBR, nie realizo-

wanym dotychczas przez urząd ministra, będzie świadczenie pomocy w komercjalizowaniu wyników badań naukowych. Zdaniem Ministra Seweryńskiego, powstanie NCBR zapewni intensywniejsze „wchłanianie” wyników badań przez gospodarkę. Prace nad drugą agencją nie są jeszcze tak zaawansowane. Będzie ona nosiła nazwę Agencji Badań Poznawczych lub Podstawowych, a jej działalność będzie ograniczała się do finansowania badań, które nie mają bezpośredniego przełożenia na gospodarkę czy inne

dziedziny zastosowań aplikacyjnych. Ta agencja będzie także dysponowała własnym budżetem, choć z pewnością nie tak wysokim jak NCBR. Każda instytucja akademicka, czy pozaakademicka, będzie miała prawo zgłaszać swoje propozycje badawcze do obu agencji, jednak NCBR w znacznej mierze będzie realizować projekty badawcze przyjęte przez Rząd. Obok opracowania koncepcji obu agencji, w Ministerstwie przygotowano także projekt nowelizacji ustawy o jednostkach badawczo-rozwojowych (JBR) oraz zmiany ustawy o prowadzeniu działalności gospodarczej, w tym o ograniczeniu prawa do prowadzenia tej działalności, przez osoby pełniące funkcje publiczne. Rekonstrukcja JBR ma pozwolić na ich lepsze funkcjonowanie w zmodyfikowanym systemie badań naukowych. Minister widzi potrzebę oddzielenia spośród JBR tych jednostek, które są przede wszystkim instytucjami badawczymi od tych, które powinny pełnić funkcję usługową wobec tych instytucji bądź wobec ministra, który je powołał. Narzędziem służącym do takiego wyodrębnienia może być ocena parametryczna. Te z jednostek, które w ocenie parametrycznej wypadną dobrze, zostaną włączone do sektora badań naukowych i będą mogły ubiegać się albo w agencji albo w sektorze przemysłowym o przyznanie środków na badania. Otrzymają także fundusz statutowy, który pozwoli im na zachowanie gotowości badawczej. Minister Seweryński sądzi, że jednostki badawczo-rozwojowe o charakterze czysto naukowym zostaną z czasem podporządkowane ministrowi do spraw nauki. Inni, poza Ministrem Nauki, ministrowie będą mogli utrzymywać podległe ich resortom jednostki badawczo-rozwojowe, o ile przeznaczą na to własne środki budżetowe. Z budżetu nauki będą mogły korzystać jedynie te jednostki, które mają charakter naukowy oraz mają potencjał, który upoważnia je do prowadzenia tego rodzaju badań. Nowelizacja ustawy da JBR możliwość dostosowania się do nowej struktury nauki i pozwoli na zmianę profilu działalności, industrializację lub prywatyzację. Choć Narodowe Centrum Badań i Rozwoju odegra znaczącą rolę w kontaktach nauki z gospodarką, to Ministerstwo nie poprzestanie na tej

O G Ł O S Z E N I E



Farmacja XXI wieku Wyzwania i Nadzieje

Katowice-Spodek
25-28.IX.2007



Szanowni Państwo,

Mam zaszczyt zaprosić Państwa do czynnego udziału w obradach XX Naukowego Jubileuszowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, który odbędzie się w Katowicach, w dniach 25 - 28 września 2007 roku. Organizatorami Zjazdu są Oddział Katowicki Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego oraz Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląskiej Akademii Medycznej. Zjazd będzie okazją do prezentacji prac naukowych, jak również do uczestnictwa w wykładach, sesjach posterowych i kursach z dziedzin farmaceutycznych, medycznych i pokrewnych. Patronat honorowy nad XX Zjazdem Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego objął Minister Zdrowia – prof. dr hab. Zbigniew Religa.

Konferencje i zjazdy farmaceutów - pomimo wszechobecnych, medialnych środków rozpowszechniania informacji naukowej, stwarzają niezastąpioną możliwość osobistych spotkań przedstawicieli całego środowiska. Spotkania te są okazją do zaprezentowania aktualnego stanu badań naukowych, prowadzonych we wszystkich ośrodkach akademickich Polski, stanowiąc także forum dla dyskusji z przedstawicielami innych dziedzin i dyscyplin naukowych. XX Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego będzie sposobnością nie tylko do wymiany wiedzy o postępach nauk farmaceutycznych, ale i omawiania koncepcji realizowania szeroko pojętej opieki farmaceutycznej, czy też dyskusji o dostosowywaniu do unijnych standardów, metod i programu kształcenia przyszłych farmaceutów.

Czerpiąc inspirację z minionych Zjazdów Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, zawsze udanych i wysoko ocenianych przez ich uczestników, organizatorzy XX Naukowego Zjazdu, szczególnie zaszczytzeni honorem organizowania tego przedsięwzięcia jako Zjazdu Jubileuszowego, gorąco zapraszają do udziału w tym Zjeździe wszystkich, którym bliskie są zadania i problematyka polskiej farmacji. Wyrażam głęboką nadzieję, iż XX Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego będzie nie tylko owocnym spotkaniem naukowym, ale i sposobnością do podniesienia kwalifikacji zawodowych, sposobnością do miłego, wspólnego spędzenia czasu, oraz okazją do rozwoju przyjacielskiej współpracy farmaceutów naszego kraju.

Przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego
Prof. dr hab. Krystyna Olczyk
Dziekan Wydziału Farmaceutycznego
Śląskiej Akademii Medycznej

Więcej informacji na temat Zjazdu można uzyskać pod adresem:
<http://www.ptfarmzjazd.pl/>

formie współpracy. Wiceministrowie już teraz nawiązują bezpośrednie kontakty z dużymi przedsiębiorstwami i zachęcają je do finansowania badań naukowych. Planuje się też powołanie regionalnych konsorcjów naukowo-badawczych. Ten typ partnerstwa między nauką a gospodarką powinien przybrać formę sformalizowaną, np. spółki albo fundacji, ewentualnie innego trwałego związku partnerów z pola nauki i gospodarki. Ministerstwo będzie wspierać takie przedsięwzięcia, które dają gwarancję wdrażania wyników badań. Zasadniczym problemem w zacieśnianiu tej współpracy jest niedobór potencjalnych partnerów ze strony gospodarki, gdyż zwłaszcza w sektorze prywatnym dominują małe lub bardzo małe przedsiębiorstwa. Innym problemem, dla którego nie tylko Ministerstwo, ale i Rząd szukają rozwiązania, jest niska atrakcyjność pracy naukowej. W MNiSW rozpoczęto już wdrażanie programów, których celem jest niwelowanie różnic płacowych w sektorze nauki między Polską a zagranicą. W planach są także inne programy Ministra w tym zakresie. Źródłem większych środków jest aktywny udział jednostek i zespołów badawczych w projektach badawczych. W dalszej przyszłości rozważana jest możliwość uwolnienia siatki płac na uczelniach, przy ustawowo zagwarantowanej płacy minimalnej. Minister podkreślił także, że w najbliższych latach finansowanie nauki znacząco wzrośnie, także dzięki środkom z funduszy unijnych. Minister wierzy w sukces jednostek polskich w 7 Programie Ramowym Unii Europejskiej. Aby ten sukces zwiększyć zachęca duże instytucje i uczelnie do tworzenia własnych jednostek do obsługi programów badawczych. Zadaniem tych jednostek byłoby świadczenie pomocy uczonym i zespołom badawczym w pokonywaniu barier administracyjnych. W podsumowaniu Minister Seweryński dodał, że projektowane obecnie zmiany struktury nauki mogą zacząć obowiązywać najwcześniej jesienią 2007 roku. Zależy to przede wszystkim od tempa prac w Sejmie. Modyfikacja systemu w oczywisty sposób wpłynie na zmianę finansowania nauki. Prace nad nowelizacją ustawy o zasadach finansowania nauki są bardzo zaawansowane. Minister podkreślił

Szanowni Państwo,

Dzięki dotacjom Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego oraz II Wydziału PAN Polska bierze udział w programie ESF (European Science Foundation) Genomika Funkcjonalna. W związku z tym młodzi naukowcy przed lub tuż po doktoracie mogą ubiegać się o krótko i długoterminowe (6 miesięcy) stypendia. Szczegółowe informacje o projekcie oraz sposobie ubiegania się o pieniądze można znaleźć pod adresem: www.function-algenomics.org.uk. Pod tym adresem zamieszczane są również bieżące informacje o konferencjach i seminariach organizowanych w ramach projektu Functional Genomics.

Prof. dr hab. Joanna Rytko
Zakład Genetyki IBB PAN
ul. Pawińskiego 5A Warszawa
tel.: (022) 592 12 21
e-mail: rytko@psd.ibb.waw.pl

jednak, że nie wyobraża sobie funkcjonowania nowej struktury nauki bez organu eksperckiego, jakim jest Rada Nauki, przy czym nie wyklucza modyfikacji jej roli. Natomiast z całą pewnością zmieni się rola Ministerstwa, ponieważ część jego zadań zostanie przeniesiona do agencji. W nowej roli Ministerstwo będzie zajmować się trzema kwestiami: kształtowaniem polityki badań naukowych, przygotowaniem regulacji prawnych i nadzorowaniem wykonania prac oraz ewentualnym dokonywaniem w nich korekt.

Mój talent dla Polski. W dniu 18 grudnia ub. roku Prezydent RP Lech Kaczyński, spotkał się w Pałacu Prezydenckim z wybitnymi, młodymi ludźmi, którzy mają na swoim koncie znaczące osiągnięcia w różnych dziedzinach. W grupie tej byli uczniowie liceów – uczestnicy przedmiotowych światowych olimpiad, młodzież uzdolniona artystycznie (muzyka, plastyka, film), sportowo, w tym medaliści paraolimpiad, których zmagania konkursowe w Polsce i poza nią uwieńczyły różne laury. W spotkaniu uczestniczyła, obok uczniów, młodzież akademicka, w tym: **dr Daniel Gackowski**, adiunkt Katedry i Zakładu Biochemii Klinicznej Collegium Medium im. Ludwiga Rydygiera w Bydgoszczy, stypendysta Szpitala Królewskiego w Kopenhadze oraz Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej; **dr Jarogniew Jacek Łuszczki**, adiunkt w Katedrze i Zakładzie Patofizjologii AM w Lublinie, stypendysta Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, wielokrotny

laureat nagrody Ministra Zdrowia; **dr Paweł Surowiak**, adiunkt Katedry Histologii i Embriologii AM we Wrocławiu, stypendysta Uniwersytetu Humbolta, laureat licznych nagród i wyróżnień; **Tomasz Wdowik**, student I roku na Wydziale Chemii Politechniki Warszawskiej, zdobywca I nagrody w Konkursie Prac Młodych Naukowców Unii Europejskiej, Sztokholm 2006 – za opracowanie metody syntezy związku chemicznego, który mógłby być nieznanym dotychczas lekiem na choroby serca, z grupy tzw. beta-blokerów; **Michał Marcinkowski**, laureat II nagrody w Konkursie Prac Młodych Naukowców UE, Sztokholm 2006 – zyskał uznanie jurorów swoją pracą na temat geometrii trójkąta; **Piotr Mikulski**, laureat I nagrody w Konkursie Informatycznym Imagine Cup 2006 w Indiach; **Eryk Kopczyński**, słuchacz II roku studiów doktoranckich z informatyki na Wydziale Matematyki, Informatyki i Mechaniki Uniwersytetu Warszawskiego – wygrał prestiżowy konkurs algorytmiczny Top Coder Open 2005 Algorithm Competition; **Marcin Michalski**, **Paweł Parys**, **Arkadiusz Pawlik**, **Bartłomiej Romański**, **Bartosz Walczak** – laureaci nagród w VII Konkursie Informatycznym The 2005 ACM Central European Programming Contest Budapeszt 2005 i na 30-tych Akademickich Mistrzostwach Świata w Programowaniu Zespołowym w San Antonio 2006; **Maciej Kulesza**, doktorant Wydziału Elektroniki, Telekomunikacji i Informatyki Politechniki Gdańskiej i **Paweł Żwan**, laureaci dwóch pierwszych miejsc w konkursie na

najlepszy projekt studencki z dziedziny cyfrowego przetwarzania sygnału, podczas zakończonego niedawno 121-ego Międzynarodowego Kongresu Audio Engineering Society w San Francisco; **Agata Karska**, studentka II roku astronomii na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, zdobywczyni nagrody specjalnej XVII Konkursu Prac Młodych Naukowców Unii Europejskiej, Moskwa 2005. Prezydent RP, gratulując utalentowanej i pracowitej młodzieży, powiedział "nam rzeczywiście niezwykle zależy na tym, żeby nasz kraj odnosił sukcesy w sferze, która jest związana z wiedzą, sztuką, także sportem. Dlaczego? Dlatego, że to przyspiesza rozwój, to podnosi prestiż państwa, to podnosi prestiż kraju".

Tuż przed 14 listopada 2006 r., kiedy obchodzony jest Światowy Dzień Walki z Cukrzycą, w mediach krajowych ukazała się informacja pt. **Polski sukces w leczeniu „cukrzycy**

noworodków”. Klinicyści z Krakowa, wraz z międzynarodową grupą uczonych, ustalili jako pierwsi na świecie, że podając osobom chorym na genetycznie uwarunkowaną „cukrzycę noworodków” doustne leki, popularne w leczeniu innego typu cukrzycy, można wyeliminować konieczność podawania insuliny w iniekcjach. Według informacji udzielonych przekazanych PAP przez doc. Macieja Małeckiego z Katedry i Kliniki Chorób Metabolicznych CM UJ, „cukrzyca noworodków” pojawia się przed upływem szóstego miesiąca życia, ale trwa całe życie. „Cukrzyca noworodków” to choroba rzadka, dotyka jedno dziecko na milion. Choroba ta jest inną odmianą cukrzycy niż cukrzyca typu 1 lub 2. Należy do grupy cukrzyc monogenowych czyli uwarunkowanych jedną mutacją w konkretnym genie. W przypadku „cukrzycy noworodków”, mutacja w jednym z genów powoduje poważne zaburzenia w funkcjonowaniu białek,

które występują w komórkach wydzielających insulinę. Cukrzyca typu 1 wywołana jest zniszczeniem komórek beta trzustki, odpowiedzialnych za produkcję insuliny, która obniża poziom cukru we krwi. W cukrzycy typu 2, która rozpoczyna się w wieku średnim lub późnym, powodem podwyższonego poziomu cukru nie jest całkowity brak insuliny, lecz jej nieprawidłowe działanie w organizmie. Bardzo często cukrzyca typu 2 towarzyszy otyłość i nadciśnienie. Badacze z UJ przypuszczają, że w Polsce jest około 100 osób z „cukrzycą noworodków”. Polscy naukowcy przebadali jedną z największych na świecie grup chorych na tę odmianę cukrzycy. Naukowcy zidentyfikowali i opisali już 40 przypadków, co według doc. Małeckiego, prowadzącego badania, jest jednym z najwyższych wskaźników na świecie. W grupie tej znalazły się zarówno dzieci, jak i dorośli. Znalezienie metody łatwiejszego leczenia tej odmiany cukrzycy jest dla pacjentów bardzo istotne. Leki doustne, które według badań krakowskiej grupy, można podawać osobom chorym na „cukrzycę noworodków”, należą do grupy pochodnych sulfonilomocznika i są stosowane w formie tabletek od wielu lat wyłącznie w leczeniu cukrzycy typu 2. Naukowcy prowadzą już z powodzeniem leczenie „cukrzycy noworodków” pochodnymi sulfonilomoczników u 15 osób. Powolne uwalnianie zawartej w tabletkach, przyjętej raz dziennie, substancji chemicznej może wystarczyć dla wyrównania poziomu glukozy we krwi. W takiej sytuacji chory nie będzie musiał brać zastrzyków z insuliny. Zastąpienie tabletką zastrzyków robionych kilka razy dziennie zrewolucjonizuje życie chorych. Osiągnięcia w badaniach na ten temat, prowadzonych przez grupę naukowców, w której skład weszli Polacy, opisano niedawno w prestiżowym piśmie medycznym, *New England Journal of Medicine*. Najnowszy, już wyłącznie polski artykuł na temat tych badań ma się ukazać na przełomie grudnia i stycznia w znanym międzynarodowym piśmie poświęconym cukrzycy – *Diabetes Care*. Grupa badawcza doc. Małeckiego z Katedry i Kliniki Chorób Metabolicznych CM UJ, kierowanej przez prof. Jacka Sieradzkiego, rozpoczęła badania nad nowymi metodami leczenia „cukrzy-

O G Ł O S Z E N I E

II EDYCJA KONKURSU NA NAJLEPSZĄ PRACĘ DOKTORSKĄ Z BIOCHEMII W 2006 ROKU

Polskie Towarzystwo Biochemiczne i firma Merck Sp. z o.o. ogłasza drugą edycję konkursu na najlepszą pracę doktorską z biochemii wykonaną w polskiej instytucji naukowej. Warunkiem uczestnictwa jest przyznanie w 2006 roku autorowi pracy tytułu doktora przez właściwą radę naukową lub radę wydziału. Nagroda obejmuje premię pieniężną dla autora w wysokości 4 000 zł, ufundowaną przez firmę Merck, oraz opublikowanie w 2007 roku tez doktoratu w 4 numerze kwartalnika „Postępy Biochemii”. Nagrodę przyznaje Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w porozumieniu w firmą Merck.

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

Zgłoszenia w formie listu przewodniego z dołączonym jednym egzemplarzem pracy doktorskiej należy przesyłać pocztą w nieprzekraczalnym terminie do 31 maja 2007 roku z dopiskiem „Doktoraty 2006”, na adres:

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

Jednocześnie prosimy przesłać list przewodni wraz pracą doktorską w formacie pdf drogą elektroniczną na adres: s.pikula@nencki.gov.pl.

Rozstrzygnięcie konkursu nastąpi do 31 sierpnia 2007 roku, a uroczyste wręczenie Nagrody odbędzie się na dorocznym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Szczecinie, we wrześniu 2007 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.

cy noworodków” przed dwoma laty. Właśnie wtedy prof. Andrew Hattersley z Uniwersytetu Exeter (Wielka Brytania) odkrył, że za rozwój cukrzycy u niektórych dzieci poniżej szóstego miesiąca życia odpowiedzialna jest mutacja w genie Kir6.2. Krakowscy naukowcy dołączyli wówczas do zespołu badawczego, kierowanego przez Hattersleya. Badania prowadzili wspólnie między innymi z Brytyjczykami, Francuzami i Słowakami (na podstawie informacji PAP – Nauka w Polsce, 26 listopada 2006 r.).

Stwardnienie boczne zanikowe (SLA, ang. *sclerosis lateralis amyotrophica*) jest najczęstszym schorzeniem paralitycznym rozpoznawanym u osób dorosłych. SLA jest rzadkim schorzeniem. Co roku chorobę diagnozuje się u 4-5 osób na 100 tysięcy ludzi, zwykle w 5-6 dekadzie życia. W Polsce rozpoznaje się ją u 2-3 tys. osób rocznie. Statystycznie jest przyczyną co osiemsetnego zgonu. Już w 1869 roku francuski lekarz, Jean Martin Charcot, opisał charakterystyczną dla SLA postępującą dysfunkcję neuronów ruchowych, unerwiających mięśnie, dzięki którym poruszamy się. Stwardnienie boczne zanikowe prowadzi do paraliżu, zarówno mięśni kończyn, jak i tych odpowiedzialnych za najbardziej podstawowe funkcje życiowe – jedzenie (mięśnie gardła) i oddychanie (przepona, mięśnie międzyżebrowe). Dostępne (bardzo drogie) leki jedynie łagodzą objawy choroby i nieznacznie wydłużają okres przeżycia chorych. Osoby, które zachorują na SLA w przeszłości mają jednak szanse na wyleczenie, ale pod warunkiem, że do tego czasu uda się chorobę zrozumieć i opracować skuteczną terapię. **Prof. Hubert Kwieciński, kierownik Kliniki Neurologii AM w Warszawie jest koordynatorem polsko-niemieckich badań “Genetyka molekularna i terapia eksperymentalna chorób neurodegeneracyjnych: stwardnienia bocznego zanikowego (SLA), zaniku wieloukładowego (MSA) i postępującego porażenia nadjądrowego (PSP)”.** Na podstawie wyników badań epidemiologicznych (obserwacji rodzin) przyjmuje się, że około 10% przypadków choroby może mieć charakter dziedziczny. Poza nielicznymi wyjątkami nie wiadomo jednak, jakie mutacje genetyczne są przyczyną choroby. U kilku procent chorych wykryto mutację

w genie dysmutazy nadadtlenkowej, „zmiatającej” nadmiar reaktywnych form tlenu. Zespół badawczy poszukuje innych markerów genetycznych związanych z SLA i ma nadzieję, że znajdując kolejne mutacje naukowcy zrozumią ogólny mechanizm powstawania choroby, choć pewnie nie wyjaśnią przyczyn wszystkich przypadków SLA. Wśród „sprawców” choroby mogą być geny odpowiedzialne za detoksykację komórek (np. dysmutaza nadadtlenkowa), za usuwanie zbędnych białek z komórki i ich odkładanie się w tkankach w postaci toksycznych złogów oraz za transport wewnątrzkomórkowy w komórkach nerwowych. Rozważany jest także udział czynników zapalnych, infekcyjnych, a także innych środowiskowych (tytoń, pestycydy) w etiologii choroby. Przyczyn choroby, a zatem i mechanizmów degeneracji komórek nerwowych, może być bardzo dużo. We współpracy z zespołem prof. Alberta Ludolpha z Kliniki Neurologii Uniwersytetu w Ulm badano, jaki związek ze stwardnieniem mają aberracje genetyczne dwóch białek – tau i dynaktyny – zaangażowanych w transport wewnątrzkomórkowy. Nie stwierdzono pozytywnych korelacji pomiędzy częstością występowania mutacji białka tau a zapadalnością na SLA, ale nie oznacza to jednak, że ich nie ma. W przypadku dynaktyny potwierdzono, iż niektóre mutacje kodującego białko genu, u osób chorych występują częściej niż u zdrowych. Nie jest to równoznaczne z ustaleniem przyczyny choroby. Poszukiwanie przyczyn choroby to nie jedyne zainteresowanie polsko-niemieckiego konsorcjum badawczego. Naukowcy z Ulm prowadzą badania nad tzw. mezenchymalnymi komórkami macierzystymi, różnicującymi się w komórki nerwowe. Prof. Kwieciński nawiązał współpracę z prof. Krystyną Domańską-Janik z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie, której Zespół od lat bada podobne komórki macierzyste, ale pozyskiwane z ludzkiej krwi pępownikowej. Współpraca ma doprowadzić do porównania potencjału terapeutycznego obu rodzajów komórek w ewentualnej terapii stwardnienia bocznego zanikowego. Mają je dostać zwierzęta ze schorzeniem spowodowanym laboratoryjnie, podobnym do SLA.

Samo podanie zawiesiny komórek nie jest łatwe technicznie. W SLA degenerują się neurony we wszystkich odcinkach rdzenia kręgowego oraz w niektórych strukturach mózgu. Chcąc zastąpić je komórkami macierzystymi, podać je należy prawie wszędzie, a nie tylko w chore miejsce, jak to czynili naukowcy w Korei i Chinach, wykorzystując zawiesinę komórek macierzystych do regeneracji uszkodzonych struktur centralnego układu nerwowego. Naukowcy z Warszawy zdecydowali się zawiesinę komórek podać do tzw. zbiornika wielkiego mózgu, skąd wraz z płynem mózgowo-rdzeniowym migrowałyby po całym centralnym układzie nerwowym. Wynik doświadczenia, zdaniem prof. Kwiecińskiego, jest bardzo dobry, bo po 24 godzinach komórki były praktycznie wszędzie, i wydaje się, że ten sposób wprowadzenia do ustroju komórek macierzystych jest najwłaściwszy dla chorych z SLA. Pozostaje nadal otwartym pytanie, czy komórki wprowadzone do ustroju przekształcają się w neurony i zastępują te zdegenerowane. Wydaje się raczej, że podawanie zawiesiny komórek macierzystych chorym z SLA będzie zapobiegać postępowi choroby. Bez badań i wielu lat pracy nie osiągnie się bardziej precyzyjnego i optymistycznego wnioskowania. Według określenia prof. Kwiecińskiego SLA jest typową „chorobę sierocą”. Jest na tyle rzadka i tak szybko prowadzi do tragicznego końca, że nie ma szans, by powstało silne lobby dbające o postęp w badaniach nad tym schorzeniem. Pewien postęp oczywiście jest, ale stanowczo zbyt powolny (wg PAP – Nauka w Polsce).

Pięć młodych kobiet-naukowców, które prowadzą badania dotyczące raka płuc i krwi, udaru mózgu, choroby Alzheimera i wirusowego zapalenie wątroby typu C otrzymało **stypendia naukowe L’Oréal Polska dla Kobiet i Nauki** (Fot. 2). Uroczystość rozstrzygnięcia Konkursu odbyła się 4 grudnia 2006 r. w Warszawie. Konkurs, organizowany przez firmę L’Oréal przy wsparciu Polskiego Komitetu ds. UNESCO, ma na celu promocję młodych utalentowanych Polek i wspieranie ich w pracy naukowej. Jak powiedział podczas ceremonii prof. Jerzy Kłoczkowski, przewodniczący Polskiego Komitetu ds.

UNESCO, „wszystkie laureatki prowadzą w wyspecjalizowanych instytucjach i zespołach badawczych prace nad tematami ważnymi, o wielkiej użyteczności społecznej, w zakresie ludzkiego zdrowia i postępu współczesnej medycyny”. Stypendia habilitacyjne otrzymały dwie badaczki. W dziedzinie neurologii i genetyki wy-



Fot. 2. Stypendia naukowe L'Oréal Polska dla Kobiet i Nauki. Od lewej: dr Agnieszka Słowik, prof. Ewa Łojkowska (przewodnicząca jury), dr Anna M. Boguszewska-Chachulska, mgr Joanna Skommer, mgr Katarzyna Sipa

różniono **dr Agnieszkę Słowik** (Fot. 3) z Kliniki Neurologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, a w dziedzinie biochemii **dr Annę Marię Boguszewską-**



Fot. 3. Dr Agnieszka Słowik

Chachulską (Fot. 4) z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Dr Agnieszka Słowik prowadzi badania dotyczące genetycznych czynników ryzyka udaru mózgu o różnej etiologii. Dr Anna Maria Boguszewska-Chachulska została nagrodzona za pracę z dziedziny biochemii, pt. „Helikazy RNA jako potencjalny cel terapii antywirusowej”. **Doktorantkę Joannę Skommer** z University of Kuopio w Finlandii nagrodzono za pracę z dziedziny biotechnologii pt. „Analiza farmakologiczna i molekularna nowych induktorów apoptozy w ludzkich liniach komórkowych

chłoniaka grudkowego limfocytów B”. W dziedzinie biologii molekularnej wyróżniono **mgr Katarzynę Siłę**, doktorantkę z Zakładu Chemii Bioor-



Fot. 4. Dr Anna M. Boguszewska-Chachulska

ganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Prowadzi ona badania dotyczące modulacji zdolności krótkich interferujących RNA do wyciszenia ekspresji genów. W dziedzinie immunologii stypendium otrzymała **mgr Kamila Wojas-Krawczyk** (Fot. 5) z Katedry i Zakładu Immunologii Klinicznej Akademii Medycznej im. prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie. Bada ona wpływ wybranych czynników uwalnianych przez komórki nowotworowe na proces różnicowania, dojrzewania i funkcję autologicznych komórek dendrytycznych. Na konkurs wpłynęło 70 prac. Oceniało je jury, w którym pracowali wybitni przedstawiciele świata nauki. Trzy doktorantki otrzymają roczne stypendia w wysokości 18 tys. zł, a dwie habilitantki roczne stypendia w wysokości 22 tys.

Fot. 5. Mgr Kamila Wojas-Krawczyk



zł, wypłacane w miesięcznych ratach. Jak informuje Maria Majdrowicz z L'Oréal Polska, o stypendia ubiegać się mogą kobiety prowadzące badania naukowe w zakresie medycyny i nauk biologicznych, których prace mają charakter aplikacyjny, tzn. mogą być zastosowane w praktyce. Ich prace muszą być już w końcowym etapie realizacji. Doktorantki przystępujące do

konkursu nie mogą mieć więcej niż 35 lat, a habilitantki nie więcej niż 45. Na liście stypendystek L'Oréal Polska/ UNESCO znajduje się 30 badaczek z różnych ośrodków naukowych z całej Polski. Źródłem inspiracji dla konkursu była międzynarodowa umowa, zawarta w Paryżu między Grupą L'Oréal i UNESCO „For Women In Science”. W jej ramach każdego roku w paryskiej siedzibie UNESCO wybitne przedstawicielki świata nauki oraz młode doktorantki z pięciu kontynentów otrzymują stypendia i nagrody pieniężne (wg informacji uzyskanej od Marii Majdrowicz). Po lekturze, zresztą szalenie ciekawie, barwnie, niejednokrotnie z humorem napisanych życiorysów naukowych, Stypendystki jawią się czytelnikowi jako nie tylko bardzo młode, co zrozumiałe, ale cieszące się aktywnym życiem kobiety, entuzjastki i uczestniczki dalekich podróży, wypraw wysokogórskich, żeglowania, także o zacięciu społecznikowskim. Zakładają rodziny, związki partnerskie, mają, bądź oczekują dziecka. Optymistyczne.

Trzej Polacy, **dr Andrzej Dziembowski** z Instytutu Genetyki i Biotechnologii Uniwersytetu Warszawskiego (UW), **dr Krzysztof Ginalski** z Zakładu Biofizyki UW i **dr Marcin Nowotny** z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie **otrzymali prestiżowe granty** Europejskiej Organizacji Biologii Molekularnej (EMBO). EMBO to międzynarodowa instytucja naukowa. Wśród jej członków znajduje się 43-ech laureatów nagrody Nobla oraz zdobywcy innych ważnych wyróżnień. EMBO zrzesza około 1200 osób z Europy (w tym pięciu Polaków), oraz 70-ciu przedstawicieli innych części świata. W skład organizacji wchodzi kraje europejskie: Austria, Belgia, Chorwacja, Czechy, Dania, Estonia, Finlandia, Francja, Niemcy, Grecja, Węgry, Islandia, Irlandia, Izrael, Włochy, Holandia, Norwegia, Polska, Portugalia, Słowenia, Hiszpania, Szwecja, Turcja i Wielka Brytania. Celem grantów jest umocnienie poziomu badań naukowych w Chorwacji, Czechach, Estonii, Portugalii, Turcji i w Polsce. Głównym założeniem twórców programu przyznawania grantów jest przeniesienie wybitnych talentów naukowych z państw bardziej rozwiniętych do tych, w których

nauka stoi na nieco niższym poziomie (głównie ze względów finansowych). Takie działanie przyczynić się ma do ujednoczenia nauki we wszystkich europejskich krajach. Granty będą w całości finansowane przez kraje członkowskie EMBO. Każdy wyróżniony otrzyma 50 tys. euro rocznie przez okres trzech do pięciu lat. Środki te mają umożliwić zwycięzcom stworzenie własnych zespołów badawczych i umocnienie ich pozycji w naukowej społeczności europejskiej. Granty ułatwiają stworzenie własnego dobrze wyposażonego laboratorium i realizację projektu badawczego. Dr Nowotny w ramach grantu będzie badał białka zaangażowane w naprawę DNA. Dr Andrzej Dziembowski, ostatnio pracujący w National Center for Scientific Research (CNRS) we Francji, w ramach grantu poprowadzi w Instytucie Genetyki i Biotechnologii Uniwersytetu Warszawskiego prace dotyczące białek biorących udział w procesach obróbki RNA. Dr Krzysztof Ginalski, przebywający dotychczas na University of Texas w USA, w swoim macierzystym Zakładzie Biofizyki Uniwersytetu Warszawskiego zajmie się procedurami obliczeniowymi wykorzystywanymi do klasyfikacji białek. Naukowcy, którym przyznano granty, stają się członkami prestiżowej sieci Young Investigator (programu EMBO dla młodych naukowców). Umożliwia to podjęcie współpracy ze znakomitymi naukowcami z Europy i USA oraz udział w różnych warsztatach. EMBO utworzono w 1964 roku w Szwajcarii. Zadaniem Organizacji jest określenie kierunku rozwoju oraz podniesienie poziomu europejskich badań naukowych w zakresie biologii molekularnej. Od 1970 r. działa przy niej Europejska Konferencja Biologii Molekularnej (EMBC), która wspiera i finansuje działalność EMBO. W ramach swojej działalności organizacja prowadzi dwuletnie stypendia doktoranckie, stypendia krótkoterminowe, wspiera kursy praktyczne i warsztaty, organizuje wykłady w nowych krajach członkowskich. Konferencja EMBC wydaje też czasopismo „EMBO Journal”, prowadzi badania nad wpływem biologii molekularnej na społeczeństwo, wspomaga proces oceny poszczególnych instytutów badawczych w krajach członkowskich i organizuje stypendia dla naukowców

z krajów Europy Wschodniej (wg PAP – Nauka w Polsce).

Prof. Halina Abramczyk z Politechniki Łódzkiej objęła od 1 stycznia prestiżowe stanowisko kierownika Katedry Marii Curie Unii Europejskiej w Berlinie. Będzie pierwszym polskim naukowcem kierującym tą katedrą. W oparciu o Katedrę prof. Abramczyk stworzy Europejski Uniwersytet Wirtualny, który zajmie się laserami oraz będzie budować europejską sieć narodowych laboratoriów i centrów uniwersyteckich. W Polsce, Prof. Abramczyk kieruje Laboratorium Laserowej Spektroskopii Molekularnej w Międzyresortowym Instytucie Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej. Jest to pierwsza Katedra Unii Europejskiej dla polskiego uczonego w kilkunastoletniej historii tego programu. Katedra została stworzona w Max Born Institute for Nonlinear Optics and Short Pulse Spectroscopy (MBI) w Berlinie, który jest wiodącym centrum laserowym w Europie. Unia Europejska powierzyła temu Instytutowi koordynowanie prac konsorcjum laserowego, LASERLAB EUROPA, składającego się z 17 europejskich centrów laserowych z 9 krajów. Jednym z najważniejszych celów Katedry Marie Curie jest stworzenie Europejskiego Uniwersytetu Wirtualnego – European Virtual University on Lasers. Katedra Marie Curie będzie budować infrastrukturę techniczną, administracyjną i merytoryczną platformy internetowej Europejskiego Uniwersytetu Wirtualnego oraz będzie organizować sieć integrującą narodowe centra laserowe w Europie i uniwersyteckie laboratoria laserowe. Katedra zorganizuje kilka konferencji międzynarodowych na temat technologii laserowych i telekomunikacji światłowodowej.

Nagrody „Kryształowej Brukselki” 2006 dla najlepszych i najbardziej aktywnych uczestników 6-ego Programu Ramowego (2002-2006) zostały ogłoszone i wręczone w Warszawie, w listopadzie 2006 r. Laureatów wyłoniła Kapituła „Kryształowej Brukselki”, powołana przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego. W kategorii Szkoły Wyższe nagrodę otrzymał **Uniwersytet Jagielloński**, a w kategorii Nagroda Indywidualna nagrodę otrzymał dr Tomasz Golec. UJ jest zaangażowany w 44 mię-

dzynarodowe projekty z dziedziny nauk biomedycznych, chemicznych i humanistycznych. Łączna kwota projektów realizowanych w ramach 6-ego PR wyniosła prawie dziewięć milionów euro. Dr Tomasz Golec z Zakładu Procesów Ciepłych Instytutu Energetyki w Warszawie, wraz ze swoim zespołem prowadzi prace badawcze w zakresie procesów spalania w urządzeniach takich jak kotły i palniki pyłowe. Cztery pozostałe nagrody trafiły: w kategorii Polska Akademia Nauk do Instytutu Fizyki Jądrowej im. H. Niewodniczańskiego z Krakowa (w ramach 6-ego PR zrealizował 17 projektów), w kategorii Jednostki Badawczo-Rozwojowe do Instytutu Medycyny Pracy im. J. Nofera z Łodzi (zrealizował kilkadziesiąt projektów sfinansowanych przez UE na kwotę 14 mln euro). W kategorii „Duże Przedsiębiorstwa” nagrodę uzyskał ComArch S.A. (za udział w projektach telekomunikacyjnych i wspieranie mobilności osób starszych i niepełnosprawnych), w kategorii Małe i Średnie Przedsiębiorstwa nagrodzony został Instytut Technik Telekomunikacyjnych i Informatycznych Sp. z o.o. (za prowadzenie badań z zakresu aplikacji mobilnych, e-biznesu i społeczeństwa informacyjnego). W poszczególnych kategoriach nominowane były również, m.in. Politechnika Warszawska, Politechnika Wrocławska, Uniwersytet Warszawski, Instytut Chemii Bioorganicznej, Instytut Oceanologii, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych, BioinfoBank Institute, Innowacja Polska Sp. z o.o., a w kategorii Nagroda Indywidualna – Aldona Dembińska-Kieć z UJ.

Marek Pawłowski i Jacek Rozynek, naukowcy z Instytutu Problemów Jądrowych, **reprezentowali Polskę na I Europejskim Festiwalu Nauki WONDERS** w Helsinkach. Jury festiwalowe przyznało im pierwsze wyróżnienie za najlepszy pokaz popularnonaukowy. Laureaci prezentowali własny pokaz „Fizyczna Piaskownica” (Fot. 6), demonstrując kilkadziesiąt zjawisk fizycznych, przygotowanych w sposób nie wymagający żadnych specjalnych przyrządów, a tylko tego, co każdy ma w kuchennej szufladzie lub w kredensie. Adresem pokazu są dzieci. W ubiegłym

roku pokaz dzisiejszych laureatów był nominowany w kategorii najlepsza prezentacja festiwalowa w konkursie „Popularyzator Nauki”, organizowanym przez Polską Agencję Prasową i ówczesne Ministerstwo Nauki i Informatyzacji. Wyróżnienie festiwalowej publiczności odebrał Michał Surma, naukowiec z Uniwersytetu Wrocławskiego, za pokaz izolowania DNA metodą domową (Home made DNA).



Fot. 6. „Fizyczna piaskownica”

Pokaz prezentowany podczas Dolnośląskiego Festiwalu Nauki realizowali członkowie Studenckiego Koła Naukowego Biotechnologów „Przybysz” z Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Europejski Festiwal Nauki odbywa się w ramach unijnego programu WONDERS, realizowanego przy współpracy trzech Europejskich stowarzyszeń EUSCEA (stowarzyszenie Festiwalu Nauki), ECSITE (stowarzyszenie Centrów Nauki) i EUSJA (stowarzyszenie naukowych dziennikarzy). W jego pierwszej edycji wzięło udział 21 zespołów popularyzujących naukę, które reprezentowały 19 europejskich krajów. II Europejski Festiwal Nauki odbędzie się w 2007 roku. Wezmą w nim udział także organizacje z Rosji i Turcji (wg PAP – Nauka w Polsce).

W drugiej edycji konkursu „Popularyzator nauki”, zorganizowanego wspólnie w minionym roku przez serwis Nauka w Polsce, PAP oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego – laureatami zostali: dr Jerzy Jarosz – fizyk, w kategorii Naukowiec lub Instytucja Naukowa; red. Wiktor Niedzicki – dziennikarz TVP oraz Szkoła Festiwalu Nauki w Warszawie w kategorii: Dziennikarz, Redakcja lub Instytucja Nienaukowa; Wyróżnienie za najbardziej efektowne i przystępne prezentacje podczas tegorocznego warszawskie-

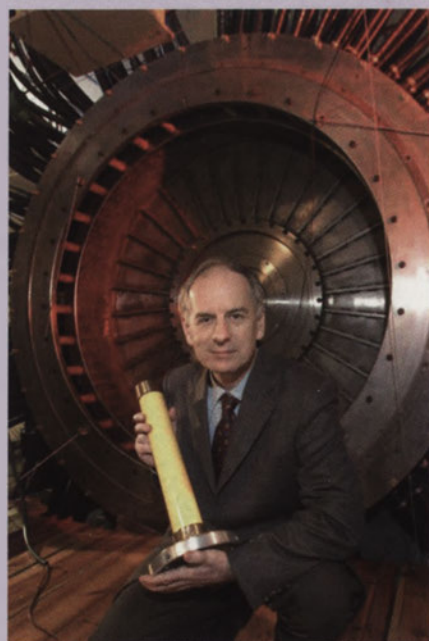
go Festiwalu Nauki otrzymał zespół naukowców z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Jury doceniło zorganizowany przez nich, w ramach festiwalowej „Nocy Badaczy”, happening naukowy poświęcony drożdżom. Przyznano też trzy wyróżnienia Serwisu Nauka w Polsce PAP dla: prof. Ireny Celejowej z Warszawskiej Szkoły Zdrowia, dla British Council oraz portalu internetowego Astronomia.pl. Prof. Celejową, która prowadzi WSZ od 19 lat, wyróżniono „za całokształt długoletniej działalności popularyzatorskiej”. British Council otrzymało wyróżnienie „za szerokie wykraczanie pod względem popularyzacji nauki poza standard obowiązujący wśród podobnych instytucji”, zaś portal Astronomia.pl „za propagowanie trudnej dziedziny wśród młodzieży szkolnej i umożliwienie młodzieży dostępu do najnowocześniejszych instrumentów badawczych”. Szkoła Festiwalu Nauki to inicjatywa naukowców – popularyzatorów i pasjonatów biologii. Jej celem jest przybliżenie współczesnej wiedzy biologicznej uczniom, nauczycielom i innym osobom zainteresowanym tą dziedziną nauki. Z oferty edukacyjnej i dydaktycznej Szkoły Festiwalu Nauki skorzystało od 2002 roku ponad 3 tys. uczniów gimnazjów i liceów oraz 1000 nauczycieli z całej Polski. Inicjatorami powołania Szkoły byli młodzi absolwenci biologii, których wsparło następnie kilka instytutów naukowych, tj. Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN oraz Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, a także warszawski Festiwal Nauki, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego i Fundacja BioEdukacji. Decyzję jury ogłoszono w siedzibie PAP w Warszawie, w dniu 15 grudnia 2006 r. Aktywność serwisu Nauka w Polsce PAP jest wkładem PAP w proces popularyzowania wiedzy w kraju. Wiceminister nauki i szkolnictwa wyższego, Krzysztof Jan Kurzydłowski, powiedział, że konkurs „Popularyzator nauki” pozwolił uhonorować osoby, które na co dzień wykonują jedno z najważniejszych zadań świata nauki. Dr Jerzy Jarosz (Fot. 7), fizyk z Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, kieruje Pracownią Dydaktyki Fizyki.

Laureat prowadzi zajęcia z metodyki nauczania fizyki i przyrody oraz technologii informacyjnej, a od ponad 20 lat popularyzuje fizykę wśród



Fot. 7. Dr Jerzy Jarosz (z prawej)

uczniów, studentów i osób starszych. Prowadzi cotygodniowy program „Cogito” w TVP3 i współpracuje z Radiem Katowice. Redaktor Wiktor Niedzicki (Fot. 8), dziennikarz TVP i wykładowca akademicki, ma za sobą trzydziestoletnią działalność popularyzującą osiągnięcia polskiej nauki. Jest autorem ponad 700 programów popularnonaukowych. Stworzył między innymi nadawany od 1985 roku przez TVP cykl programów „Laboratorium”, a ostatnio nowy program pt. „Dzień nauki”, prezentujący osiągnięcia nauki polskiej od poszukiwań życia w kosmosie, poprzez wykorzystanie odpadów, po biotechnologię. Na konkurs zgłoszono ponad 60 kandydatur. W kategorii Naukowiec lub Instytucja Naukowa, oprócz Jarosza,



Fot. 8. Redaktor Wiktor Niedzicki

nominacje do nagrody uzyskali: dr Stanisław Bajtlik z Centrum Astronomicznego PAN w Warszawie razem z dr hab. inż. Arkadiuszem Orłowskim z Instytutu Fizyki PAN i SGGW, prof. Jerzy J. Langer z UAM w Poznaniu, dr Ryszard Kowalski z Akademii Podlaskiej w Siedlcach, prof. dr hab. Tomasz Twardowski – Instytut Chemii Bioorganicznej PAN oraz Instytut Problemów Jądrowych w Świerku. Wśród nominowanych w kategorii Dziennikarz, Redakcja lub Instytucja Nienaukowa, oprócz Niedzickiego i Szkoły Festiwalu Nauki, znaleźli się: Anna Mioduszevska – dziennikarka i politolog z Olsztyna, Marian Nowy – redaktor „Dziennika Polskiego”, Polska Fundacja Upowszechniania Nauki oraz Dział Nauki „Rzeczpospolitej”. W kategorii Prezentacja podczas Festiwalu Nauki, oprócz zespołu naukowców z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, nominowani byli: dr Stanisław Bajtlik z Centrum Astronomicznego PAN w Warszawie razem z prof. Józefem Kaźmierczakiem z Instytutu Paleobiologii PAN, prof. Krzysztof Dołowy ze Szkoły Głównej

Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie oraz Takao Ishikawa – doktorant Wydziału Biologii Uniwersytetu (wg PAP, Nauka w Polsce).

Medale Creativity Award przyznawane są przez światową Organizację Własności intelektualnej (WIPO) instytucjom zasłużonym dla promowania idei własności intelektualnej. W Polsce **wręczono je po raz pierwszy**, a otrzymały je cztery uczelnie, na których w latach 2003-2005 powstało najwięcej nagrodzonych przez Urząd Patentowy prac. Uroczystość odbyła się 18 grudnia 2006 r. w siedzibie Urzędu Patentowego RP w Warszawie. Laureatami medali Creativity Award są: Uniwersytet Warszawski, Katolicki Uniwersytet Lubelski, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz Akademia Sztuk Pięknych w Warszawie. Podczas uroczystości przedstawiciel WIPO Michał Svanter wyraził zadowolenie, że Polska, kraj poszerzonej Unii Europejskiej, aktywnie zaangażowała się w ochronę własności intelektualnej. Zachęcał też do aktywnej współpracy z WIPO

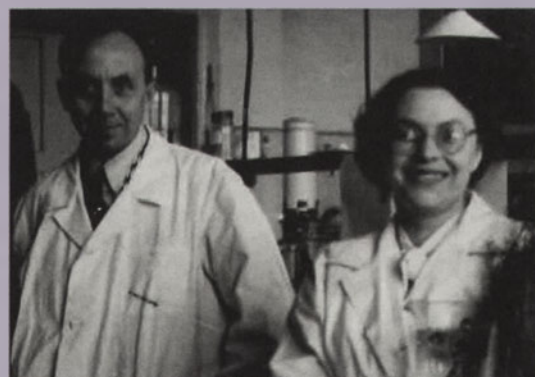
w dziedzinie ochrony własności intelektualnej.

Nagrody dla najlepszych prac naukowych i plakatów z zakresu ochrony własności przemysłowej przyznał też prezes Urzędu Patentowego RP. Konkurs odbył się w trzech kategoriach: studenckiej, uczniowskiej i otwartej. Wśród laureatów znajdują się między innymi: studenci Politechniki Warszawskiej, Politechniki Radomskiej, Akademii Sztuk Pięknych w Warszawie, Gdańsku, Wrocławiu, Krakowie i Poznaniu oraz uczniowie Zespołu Szkół Plastycznych w Gdyni, Gorzowie Wlkp. i Łodzi. Światowa Organizacja Własności Intelektualnej (WIPO) została utworzona w Sztokholmie w 1967 roku, a siedzibą WIPO jest Genewa. Jej celem jest pogłębianie wiedzy na temat ochrony praw własności intelektualnej na arenie międzynarodowej, zapewnianie współpracy administracyjnej w zakresie egzekwowania praw autorskich, czuwanie nad przestrzeganiem umów międzynarodowych (na podstawie PAP – Nauka w Polsce).

ZMARŁA PROFESOR PAULINA WŁODAWER, W LATACH SZEŚCIEDZIESIĄTYCH KIEROWNIK PRACOWNI BIOCHEMII LIPIDÓW W INSTYTUCIE BIOLOGII DOŚWIADCZALANEJ IM. M. NENCKIEGO PAN W WARSZAWIE

Paulina Włodawer ukończyła studia biologiczne na Uniwersytecie Warszawskim w 1939 roku. Pracę magisterską wykonywała pod kierunkiem prof. Włodzimierza Niemierki, częściowo w przedwojennym Instytucie im. M. Nenckiego. Początek wojny 1939 r. zastał ją na wschodzie Polski, na terenach okupowanych przez armię radziecką. Stamtąd w 1940 r. została wywieziona w głąb ZSRR, skąd powróciła do Polski dopiero w 1946 r. Pod koniec 1948 r. rozpoczęła pracę w Instytucie im. Marcelego Nenckiego, który wznowił swą działalność w Łodzi. Była najbliższą współpracownicą prof. W. Niemierki, zajmując się wraz z nim, a później samodzielnie, metabolizmem lipidów. W krótkim czasie uzyskała stopień doktora, a następnie (w 1960 r.) – docenta. W 1966 r. została profesorem. W 1963 w Zakładzie Biochemii Instytutu Nenckiego utworzyła Pracownię Biochemii Lipidów, którą kierowała aż do wyjazdu z Polski w 1969 r. Pracownia ta zajmowała się metabolizmem lipidów, głównie w aspekcie porównawczym, najpierw u owadów, a w późniejszym okresie także u kręgowców. Prof. Włodawer wykształciła grono współpracowników, z których w Instytucie pracuje jeszcze Jej pierwsza doktorantka, prof. Jolanta Barańska. Współpracowała także z Pracownią Bioenergetyki, kierowaną przez prof. Lecha Wojtczaka. Wydarzenia 1968 roku skłoniły prof. Włodawer i Jej rodzinę do wyjazdu z Polski. Osiedlała w Sztokholmie, gdzie wkrótce rozpoczęła pracę w Karolinska Institutet w pracowni kierowanej przez prof. B. I. Samuelssona. Pracownia ta znana była już wówczas z osiągnięć w dziedzinie prostaglandyn. Za badania te, w których uczestniczyła również prof. Włodawer, Samuelsson otrzymał w 1982 r. nagrodę Nobla.

Profesor Włodawer zmarła w Sztokholmie 26 grudnia 2006 r. w wieku 92 lat.



Fotografia. Paulina Włodawer wraz z profesorem Włodzimierzem Niemierko w dniu Jej promocji doktorskiej, 1951 rok.

prof. Lech Wojtczak
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN

Kamila Wolanin 

Katarzyna Piwocka

Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego

Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: k.wolanin@nencki.gov.pl, tel.: (022) 589 22 50

Artykuł otrzymano 6 listopada 2006

Artykuł zaakceptowano 20 grudnia 2006

Słowa kluczowe: surwiwina, mitoza, mitotyczny punkt kontroli cyklu komórkowego, apoptoza, cykl komórkowy

Wykaz skrótów: APC/C (ang. *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) – kompleks o aktywności ligazy ubikwitynowej regulujący przejście komórek z metafazy do anafazy; BIR (ang. *Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat*) – domena białkowa charakterystyczna dla białek z rodziny IAP; CPC (ang. *Chromosomal Passenger Complex*) – kompleks wędrujący po chromosomach w czasie mitozy; HBXIP (ang. *hepatitis B X-interacting protein*) – białko oddziałujące z białkiem X wirusa *Hepatitis B*; IAP (ang. *Inhibitors of Apoptosis*) – rodzina białek o właściwościach antyapoptotycznych; INCENP (ang. *Inner Centromere Protein*) – jedno z białek kompleksu CPC; MCAK (ang. *mitotic centromere-associated kinesin*) – białko depolimeryzujące mikrotubule w czasie procesu umocowywania chromosomów do wrzeciona podziałowego; MSAC (ang. *mitotic spindle assembly checkpoint*) – punkt kontroli poprawności złożenia wrzeciona mitotycznego

Podziękowanie: Autorki dziękują Pani Profesor Ewie Sikorze za dyskusje i cenne uwagi w czasie pisania tej pracy

STRESZCZENIE

Surwiwina należy do rodziny antyapoptotycznych białek IAP (ang. *Inhibitors of Apoptosis*). Wysoką ekspresję tego białka wykazano w wielu typach nowotworów i jest ona związana ze wzrostem oporności na chemioterapię, zaostreniem się objawów i progresją choroby. Surwiwina, oprócz udziału w hamowaniu procesu śmierci komórek na drodze apoptozy, jest zaangażowana w regulację przebiegu podziału komórki. Białko to jest składnikiem kompleksu CPC (ang. *Chromosomal Passenger Complex*), odpowiedzialnego za prawidłowy przebieg segregacji chromatyd potomnych w czasie mitozy. Surwiwina reguluje również funkcjonowanie mechanizmu kontrolnego na etapie przejścia z metafazy do anafazy, zwanego mitotycznym punktem kontroli cyklu komórkowego (ang. *mitotic spindle assembly checkpoint*). W połączeniu z innymi białkami, uczestniczy w regulacji przebiegu cytokinezy. Niniejsza praca jest z jednej strony próbą podsumowania roli surwiwiny w komórkach prawidłowych i nowotworowych, ze szczególnym naciskiem na jej udział w mitozie, z drugiej zaś wstępem do dyskusji o terapii skierowanej przeciw surwiwinie w walce z nowotworami.

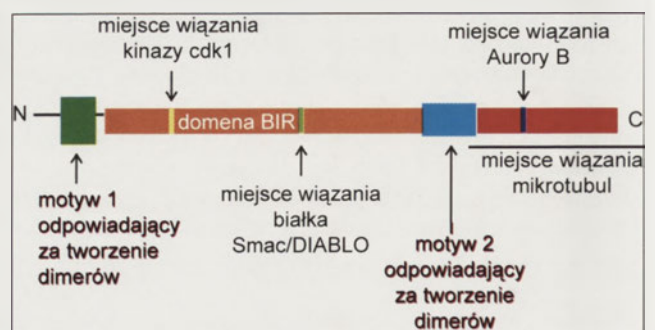
WPROWADZENIE

Surwiwina komórek człowieka jest niewielkim białkiem (ok. 16.5 kDa), należącym do rodziny IAP (ang. *Inhibitors of Apoptosis*). Odkryta stosunkowo niedawno [1], stanowi obecnie przedmiot badań wielu zespołów na całym świecie. Zainteresowanie tym białkiem związane jest z jego niezwykle „podwójną” rolą w życiu komórki: jako inhibitora apoptozy z jednej strony, a regulatora przebiegu podziału komórki z drugiej. Badania dotyczące roli surwiwiny w życiu komórki zyskują dodatkowe znaczenie, gdyż wykazano, że jej nadekspresja jest cechą wielu typów nowotworów [1].

Pierwsze badania dotyczące funkcji tego białka w komórce, związane były z jego rolą w regulacji procesu apoptozy, co miało ścisły związek z dość szybko ustaloną przynależnością surwiwiny do rodziny antyapoptotycznych białek IAP [1]. Warto zaznaczyć, iż surwiwina, pod względem strukturalnym nie jest typowym przedstawicielem tej grupy. Podstawowym elementem struktury wyróżniającym białka należące do tej rodziny jest występowanie w cząsteczce 2 lub 3 ok. 70-aminkowasowych, tzw. domen BIR (ang. *Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat*), których obecność jest związana z antyapoptotycznymi właściwościami tych białek [2]; surwiwina, w odróżnieniu od typowych przedstawicieli tej rodziny u ssaków, posiada tylko jedną domenę BIR [3] (Ryc. 1). Następną cechą, wyróżniającą surwiwinę (i liwinę ML-IAP) spośród pozostałych białek człowieka należących do rodziny IAP, są duże różnice w jej ekspresji w komórkach prawidłowych, w porównaniu z nowotworowymi [3]. Z unikalnych właściwości surwiwiny, warto wspomnieć jeszcze o jej zdolności do tworzenia homodimerów, obserwowanych również *in vivo*; jednakże żadne z dotychczas przeprowadzonych badań nie wyjaśniają fizjologicznej roli dimerów [4]. Ostatnie lata wskazały na niezwykle istotną rolę surwiwiny w regulacji mitozy, otwierając tym samym nowy rozdział w badaniach dotyczących jej funkcji. Co więcej, w świetle najnowszych odkryć wydaje się, że regulacja mitozy może być wręcz nadrzędną, w stosunku do regulacji apoptozy, funkcją surwiwiny.

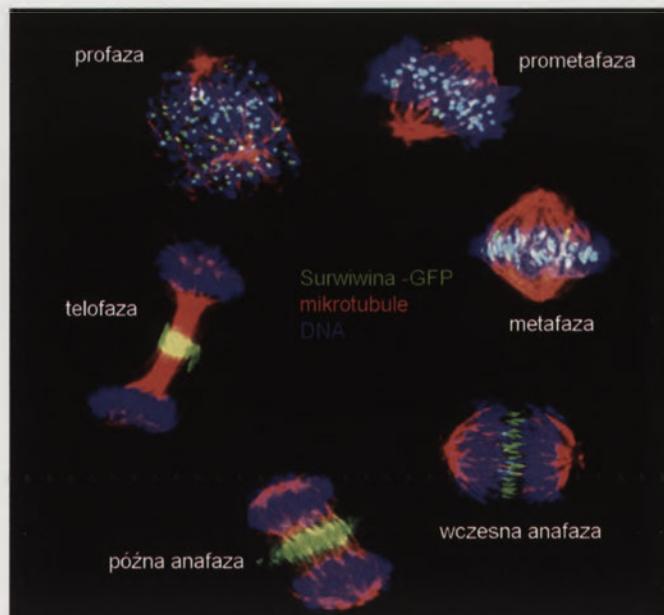
ROLA SURWIWINY W APOPTOZIE

Wykazaną wkrótce po jej odkryciu, jed-



Rycina 1. Struktura domenowa surwiwiny.

nakże dziś podważaną przez część badaczy właściwością surwiwiny jest zdolność do hamowania apoptozy na drodze wiązania i blokowania kaspaz efektorowych 3 i 7 [5]. Przebieg apoptozy nie jest zasadniczym tematem tej pracy, pracę przeglądową dotyczącą mechanizmów i regulacji programowanej śmierci komórek można znaleźć w jednym z poprzednich numerów „Postępów biochemii” [6]. Mechanizmom hamowania aktywności kaspaz przez surwiwinę poświęcono wiele uwagi, aczkolwiek wyniki otrzymywane przez niezależne zespoły badawcze, często wykluczają się wzajemnie i w dalszym ciągu budzą gorące dyskusje. Wątpliwości dotyczą samej możliwości wiązania kaspaz przez surwiwinę, w nawiązaniu do jej struktury, porównywanej z innymi antyapoptotycznymi białkami z rodziny IAP. Surwiwina nie posiada bowiem obecnej w wielu białkach IAP i uważanej za niezbędną do wiązania kaspaz domeny CARD (ang. *caspase recruitment domain*) [3]. Obecność pojedynczej domeny BIR wyklucza również mechanizm, w którym blokowane są kaspazy w przypadku XIAP, najlepiej poznanego ludzkiego białka z rodziny IAP; gdzie zasadnicze znaczenie w hamowaniu aktywnej kaspazy 3 i 7 odgrywa region łączący domeny BIR1 i BIR2 [7]. Wykazano natomiast, że surwiwina w kompleksie ze swoim kofaktorem, białkiem HBXIP (ang. *hepatitis B X-interacting protein*) wiąże się z prokaspazą 9, hamując wewnętrzny szlak apoptotyczny, zależny od mitochondriów [8]. Część badaczy sugeruje, iż hamowanie apoptozy z udziałem surwiwiny jest skutkiem jej oddziaływań z proapoptotycznym białkiem Smac/DIABLO. Białko to, uwalniane z mitochondriów pod wpływem sygnałów proapoptotycznych, wiąże się z typowymi przedstawicielami rodziny IAP. Uniemożliwia w ten sposób ich oddziaływanie z kaspazami, co prowadzi do aktywacji tych enzymów, a w konsekwencji do apoptozy zależnej od kaspaz. Wiązanie Smac/DIABLO przez surwiwinę obniża jego poziom w cytoplazmie, a tym samym ogranicza dostęp tego białka do pozostałych przedstawicieli rodziny IAP, które bez zakłóceń mogą pełnić funkcje antyapoptotyczne [9]. Spór wokół antyapoptotycznych właściwości surwiwiny i dywagacje dotyczące ich charakteru trwają nadal. W jego tle prowadzone są doświadczenia, które mimo tego, że nie wskazują na dokładny mechanizm tego procesu, bezspornie wskazują na zdolność surwiwiny do hamowania programowanej śmierci komórki. Wykazano, że obecność zmutowanej formy surwiwiny, np. surwiwiny^{C84A} ekspresyjowanej w komórkach linii HeLa, powoduje wzrost aktywności kaspazy 3 [10], a wygaszenie jej ekspresji w komórkach raka płuc za pomocą antysensownych oligonukleotydów, ich podwyższoną śmiertelność oraz wzrost wrażliwości



Rycina 3. Lokalizacja kompleksu CPC w czasie mitozy na przykładzie surwiwiny. Rysunek przedrukowano z Wheatley SP, McNeish A (2005) Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *Int Rev Cytol* 247: 35-88, za zgodą autorów i wydawnictwa Elsevier.

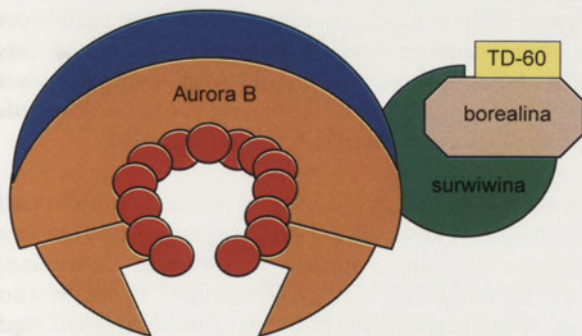
ści na chemioterapię [11]. Ponadto, doświadczenia z siRNA skierowanym przeciw mRNA surwiwiny, wykazały spadek przeżywalności komórek ludzkich mięsaków [12], wzrost wrażliwości na apoptozę indukowaną poprzez aktywację receptora TRAIL w komórkach czerniaka złośliwego [13] i spontaniczną apoptozę w komórkach linii HeLa [14]. Reasumując, nadekspresja surwiwiny spotykana w wielu typach nowotworów koreluje z podwyższoną opornością komórek na szereg bodźców proapoptotycznych, podczas gdy zaburzenia ekspresji lub funkcji tego białka, skutkują wzrostem podatności na apoptozę [15].

ROLA SURWIWINY W MITOZIE

Wykazanie zależności pomiędzy ekspresją surwiwiny a fazą cyklu komórkowego (nie dotyczy to żadnego innego białka należącego do rodziny IAP) [16] doprowadziło do konkluzji, iż ekspresja tego białka w fazie G2/M może być powiązana z przebiegiem podziału komórki, co z kolei mogłoby wskazywać na inną, niż dotychczas znana, rolę surwiwiny. Do podobnych przypuszczeń doprowadziły badacze spostrzeżenia, że wysoka ekspresja surwiwiny ma miejsce w wielu liniach nowotworowych, wykazujących wysoce podwyższoną aktywność proliferacyjną; a białka tego praktycznie nie spotyka się w komórkach nie ulegających podziałom, tj. terminalnie zróżnicowanych i starych. Dane te zapoczątkowały nowy etap badań związanych z rolą surwiwiny w mitozie.

SURWIWINA JAKO ELEMENT KOMPLEKSU WĘDRUJĄCEGO PO CHROMOSOMACH

Badania immunofluorescencyjne jednoznacznie wykazały, że surwiwina jest elementem kompleksu CPC (ang. *Chromosomal Passenger Complex*) – kompleksu wędrującego po chromosomach [17]. Kompleks ten odgrywa zasadniczą rolę w segregacji chromatyd siostrzanych w czasie mitozy,



Rycina 2. Schemat ideowy budowy kompleksu CPC.

regulacji funkcjonowania punktu kontroli poprawności złożenia wrzeciona mitotycznego i cytokinezie. W jego skład wchodzi ponadto białka: INCENP (ang. *Inner Centromere Protein*), Aurora B, posiadająca aktywność kinazy serynowo-treoninowej, borealina oraz białko TD-60 [18] (Ryc. 2). Wymienione białka w literaturze angielskiej określane są terminem „*chromosomal passengers*”, przez wzgląd na ich charakterystyczną lokalizację w czasie mitozy (Ryc. 3). W późnej fazie G2 i w profazie zlokalizowane są w postaci wielu rozproszonych punktów na chromosomach; w czasie prometafazy i metafazy przemieszczają się do wewnętrznego regionu centromerowego chromosomów. Podczas gdy w anafazie chromatydy siostrzane przemieszczają się w kierunku przeciwnych biegunów wrzeciona podziałowego, białka wchodzące w skład kompleksu CPC zostają w obszarze środkowym między biegunami wrzeciona podziałowego, by ostatecznie w czasie telofazy i cytokinezy znaleźć się w budowanych przez mikrotubule strukturach o zasadniczym znaczeniu dla przebiegu cytokinezy, określanych w piśmiennictwie angielskimi terminami: midbody i midzone [18]. Wygaszenie ekspresji któregośkolwiek ze składników kompleksu CPC powoduje zaburzenia lokalizacji i funkcjonowania pozostałych jego elementów, co dodatkowo potwierdza fakt istnienia wzajemnych oddziaływań i powiązań pomiędzy poszczególnymi białkami wędrującymi po chromosomach w czasie mitozy [18,19]. Wykazano, że w dzielących się komórkach, pozbawionych któregoś z białek budujących kompleks CPC lub posiadających zmutowane formy tych białek, występują liczne zaburzenia w przebiegu mitozy [18]. Wygaszenie lub obniżenie ekspresji surwiwiny wywołuje zaburzenia w segregacji chromosomów, tworzenie nieprawidłowych jedno i wielobiegunowych wrzecion podziałowych (ang. odpowiednio: *monopolar* i *multipolar spindles*), mikronukleację, nieprawidłowości w przebiegu cytokinezy oraz poliploidyzację w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej [19], komórkach limfoidalnej linii HCW-2 [20] oraz HeLa [21].

Jednym z lepiej poznanych i opisanych w literaturze elementów kompleksu CPC jest białko Aurora B. Duże zainteresowanie tym białkiem wynika m.in. z mnogości funkcji, jakie Aurora B pełni w czasie podziału komórki. Jako jedyny spośród składników kompleksu CPC wykazuje aktywność enzymatyczną, przez co część badaczy podkreśla jej szczególną rolę w funkcjonowaniu kompleksu CPC. We wczesnych etapach mitozy Aurora B fosforyluje histon H3 na serynie 10. Uważa się, że ta modyfikacja jest niezbędna do prawidłowego przebiegu kondensacji chromatyny, poprzedzającej podział komórki [22].

Aurora B kontroluje również proces wiązania mikrotubul do kinetochorów. Właściwa segregacja chromatyd siostrzanych w anafazie możliwa jest wówczas, gdy do kinetochorów każdej z nich zostaną dołączone mikrotubule pochodzące z przeciwnych biegunów wrzeciona podziałowego (konfiguracja amfitelemiczna), co określane jest mianem bioorientacji [23]. Błędy w tym procesie mogą skutkować konfiguracją meroteliczną (mikrotubule pochodzące z obu biegunów wrzeciona zostają przyłączone do kinetochoru jednej chromatyd siostrzanej), syntelelemiczną (kinetochory obu chromatyd zostają połączone z mikrotubulami biegnącymi od tego samego bieguna wrzeciona) czy monotelelemiczną

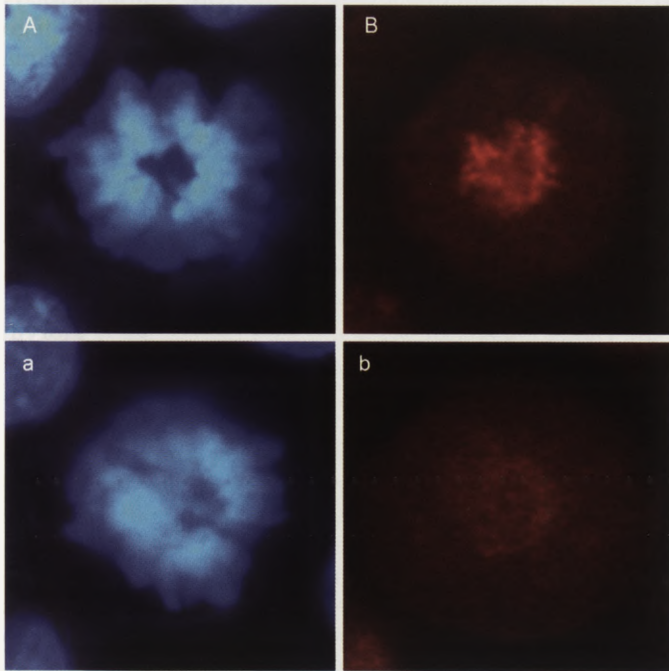
(tylko jeden z kinetochorów chromatyd siostrzanych uzyskuje połączenie z mikrotubulami biegnącymi od jednego z biegunów wrzeciona) [23]. Niesymetryczne rozcięcie się chromatyd siostrzanych do jąder potomnych w anafazie, wywołane niewłaściwą bioorientacją mikrotubul na kinetochorach, może prowadzić do powstania niestabilnych genetycznie komórek aneuploidalnych [22]. Udział Aurory B w kontrolowaniu procesu wiązania mikrotubul do kinetochorów ma charakter pośredni i polega na regulacji aktywności białka MCAK (ang. *mitotic centromere-associated kinesin*) [24]. Białko to, w formie ufosforylowanej ma zdolność depolimeryzowania mikrotubul. Natomiast ufosforylowane przez Aurorę B białko MCAK traci tę aktywność i jest kierowane w obszar kinetochorów, gdzie ponownie aktywowane przez fosfatazy, odpowiada za depolimeryzację mikrotubul w nieprawidłowy sposób przyłączonych do kinetochorów. W komórkach pozbawionych Aurory B, białko MCAK nie jest obecne w obrębie kinetochorów, a ich niewłaściwe połączenia z mikrotubulami nie są usuwane [24].

Kompleks CPC pełni również funkcje regulacyjne na etapie cytokinezy. Aurora B, enzymatyczny rdzeń kompleksu, fosforyluje m. in. wimentynę i białko MgcRacGAP. Białka te w formie ufosforylowanej są niezbędne do prawidłowego przebiegu tego procesu. W przypadku braku regulacji aktywności tych białek przez Aurorę B, obserwuje się zaburzenia przebiegu cytokinezy, łącznie z niedokończeniem tego procesu, mogące prowadzić do śmierci komórki [22].

Należy wyraźnie zaznaczyć, iż surwiwina jest niezbędna w procesie powstawania kompleksu. Badania, w tym również prowadzone przez nasz zespół na liniach komórkowych przewlekłej białaczki szpikowej wykazały, że w komórkach pozbawionych surwiwiny metodą siRNA, kompleks CPC nie zostaje w ogóle utworzony, a pozostałe białka wchodzące w jego skład, w tym Aurora B, wykazują „rozproszoną” lokalizację w komórce [19] (Ryc. 4). Tego typu obserwacje wskazują na rolę surwiwiny zarówno w formowaniu kompleksu wędrującego po chromosomach, jak i kierowaniu go do miejsca jego działania w czasie mitozy – kinetochorów. Należy jednak zaznaczyć, że inaktywacja któregośkolwiek ze składników kompleksu CPC prowadzi do zaburzeń lokalizacji pozostałych białek budujących ten kompleks, a tym samym do problemów z tworzeniem kompleksu CPC.

Oprócz funkcji strukturalnych, surwiwina pełni również funkcje regulatorowe; jej obecność w kompleksie CPC istotnie wpływa na aktywność Aurory B. Stwierdzono, że w drodze bezpośrednich oddziaływań między tymi dwoma białkami dochodzi do stymulacji aktywności kinazowej Aurory B. W badaniach *in vivo* wykazano, że nadekspresja genu kodującego surwiwinę znacząco wzmacnia tę aktywność, podczas gdy obniżeniu ekspresji genu surwiwiny, poprzez zastosowanie antysensownych oligonukleotydów, towarzyszy silne obniżenie tej aktywności [25].

O zasadniczej roli surwiwiny w regulacji prawidłowego podziału i życia komórki świadczy również fakt, że myszy z uszkodzonym genem surwiwiny umierają we wczesnych stadiach rozwoju [26]. Należy wspomnieć, iż ostatnio sugeruje się istnienie więcej niż jednego typu kompleksu wędrującego po chromosomach: prócz „klasycznego” holokom-



Rycina 4. Zaburzenia lokalizacji Aurory B w komórkach pozbawionych surwiwiny metodą siRNA (wyniki własne). Morfologia jądra komórki prawidłowej barwionej DAPI (A) oraz komórki, w której wygaszono ekspresję surwiwiny (a). Lokalizacja Aurory B w czasie mitozy w komórce prawidłowej (B) i pozbawionej surwiwiny metodą siRNA (b).

pleksu budowanego przez INCENP, surwiwinę, Aurorę B, borealinę i TD-60, postuluje się istnienie mniejszych typu Aurora B/ INCENP, przeprowadzającego wyłącznie fosforylację seryny 10 na histonie H3 [18].

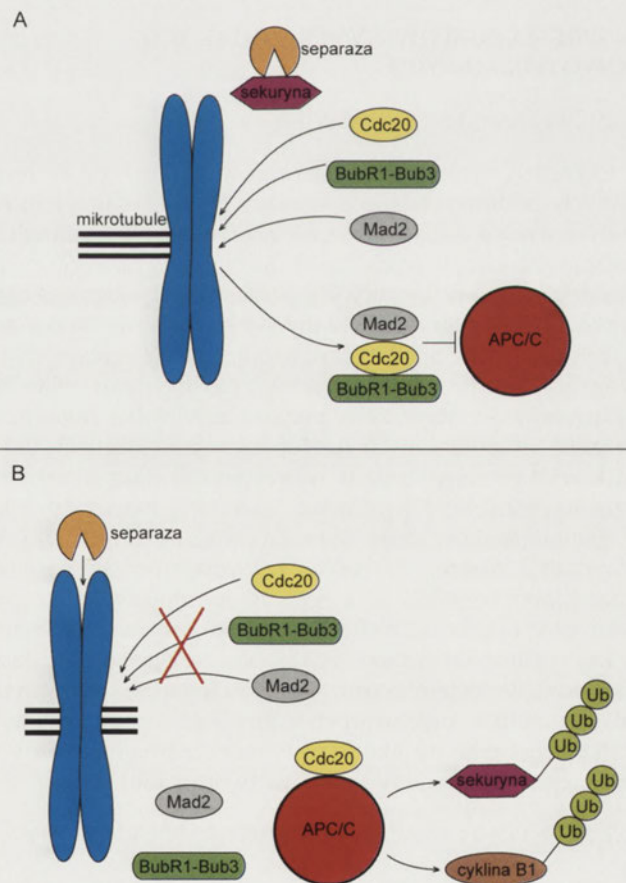
UDZIAŁ SURWIWINY W REGULACJI FUNKCJONOWANIA PUNKTU KONTROLI POPRAWNOŚCI ZŁOŻENIA WRZECIONA MITOTYCZNEGO

Punkt kontroli poprawności złożenia wrzeciona mitotycznego (ang. *mitotic spindle assembly checkpoint*; MSAC), zwany również mitotycznym punktem kontroli cyklu komórkowego, punktem kontrolnym powstawania wrzeciona czy po prostu punktem kontrolnym wrzeciona jest kluczowym mechanizmem kontrolującym proces segregacji chromosomów w komórkach eukariotycznych. Aktywowany w czasie prometafazy, opóźnia zajście anafazy do momentu, aż wszystkie chromatydy potomne, poprzez połączenia z mikrotubulami, zostaną właściwie zorientowane względem biegunów wrzeciona podziałowego w tzw. płycie metafazalnej [27]. W funkcjonowanie tego mechanizmu zaangażowane są białka: Bub (Bub1-3), Mad (Mad1, Mad2, BubR1), CENP-E, kinaza MPS1 i oddziałujące z dyneiną białka Zw10 i Rod [28]. W sytuacji, gdy nie wszystkie chromatydy, mające ulec rozdzieleniu do komórek potomnych, posiadają właściwe połączenie z mikrotubulami (ang. *attachment*) lub też układ tych połączeń jest niestabilny i jest źródłem nieprawidłowych napięć (ang. *tensions*), wymienione wyżej białka generują sygnał hamujący rozpoczęcie anafazy i segregację chromatyd siostrzanych [29]. „Sercem” układu są białka Mad2 i BubR1 wiążące i hamujące aktywność białka regulatorowego Cdc20. Białko to pełni funkcje aktywatora kompleksu APC/C (ang. *Anaphase Promoting Complex / Cyclosome*), który wykazuje aktywność ligazy ubikwitylowej

[30] (Ryc. 5). Zachodząca przy udziale tego kompleksu ubikwitylacja cykliny B i sekuryny, a w konsekwencji degradacja tych białek, prowadzi do uwolnienia i aktywacji związanej z sekuryną separazy. Separaza jest enzymem proteolitycznym, który niszczy białkowe połączenia między chromatydami siostrzanymi, przez co inicjuje ich segregację do przeciwnych biegunów wrzeciona podziałowego [31].

Na pierwszy rzut oka wydawać by się mogło, że procesy, przebiegające z udziałem kompleksu CPC oraz białek zaangażowanych w funkcjonowanie mitotycznego punktu kontroli cyklu komórkowego, przebiegają niezależnie od siebie. Do niedawna uważano, że ewentualna aktywacja mechanizmu kontroli MSAC jest zależna od efektów działania kompleksu CPC, nie zaś od udziału w tym procesie samych białek wędrujących po chromosomach. Wykazano jednak, że prawidłowe funkcjonowanie MSAC wymaga udziału 3 znanych już nam białek: surwiwiny, Aurory B i INCENP [32,33]. Można więc powiedzieć, że stanowią one swoisty „łącznik” spajający oba mechanizmy regulacji przebiegu mitozy w funkcjonalną całość, we wspólny system regulacji organizacji i rozdziału materiału genetycznego w dzielącej się komórce.

Problemy sygnału generowanego przez zaktywowany mitotyczny punkt kontroli cyklu komórkowego jest przedmiotem licznych sporów wśród badaczy. Część z nich uważa, że białka sensorowe BubR1 i Mad2 działają niezależnie i



Rycina 5. Uproszczony schemat funkcjonowania mitotycznego punktu kontroli (MSAC). Aktywacja MSAC i uruchomienie sygnału prowadzącego do zahamowania anafazy w sytuacji braku połączenia kinetochoru z mikrotubulami (A); aktywacja APC/C i przejście z metafazy do anafazy w komórkach z chromosomami w konfiguracji amfiteicznej (B).

generują sygnały płynące odpowiednio od: niewłaściwych napięć w układzie mikrotubul i braku połączenia z mikrotubulami [34]. Druga część zaś uważa, że dwie „gałęzie sygnałowe” nie istnieją, a oba białka ze sobą współdziałają, wysyłając wspólny sygnał do zatrzymania wejścia w anafazę [35]. Badacze opowiadający się za słusznością pierwszej tezy, wskazują na doświadczenia z nokodazolem i taksolem – związkami zaburzającymi prawidłową dynamikę mikrotubul w komórce. Wykazano, że kompleks tworzony przez surwiwinę, białko INCENP i Aurorę B jest niezbędny do uruchomienia odpowiedzi, wynikającej z braku odpowiednich napięć między mikrotubulami a kinetochorem, generowanej z udziałem białka BubR1. Okazało się, że surwiwina, Aurora B oraz białko INCENP uczestniczą w procesie lokalizacji białka BubR1 na kinetochorach, jak również wpływają na jego stabilność i czas pozostawania na kinetochorach w sytuacji przedłużonej aktywacji MSAC. Mechanizmy tych procesów pozostają niewyjaśnione. Z kolei, odpowiedź komórki na brak przyłączenia mikrotubul do kinetochorów, w której pośredniczy białko sensorowe Mad2, odbywa się bez udziału surwiwiny i jej partnerów [32,33]. Udział surwiwiny, Aurory B i białka INCENP w odpowiedzi komórki na wystąpienie nieprawidłowych napięć na kinetochorach, wynika najprawdopodobniej z wpływu surwiwiny na mikrotubule. W badaniach *in vivo* wykazano, że surwiwina stabilizując układ mikrotubul oraz wpływając na proces nukleacji, reguluje dynamikę tych struktur w komórce [36, 37].

EKSPRESJA SURWIWINY W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

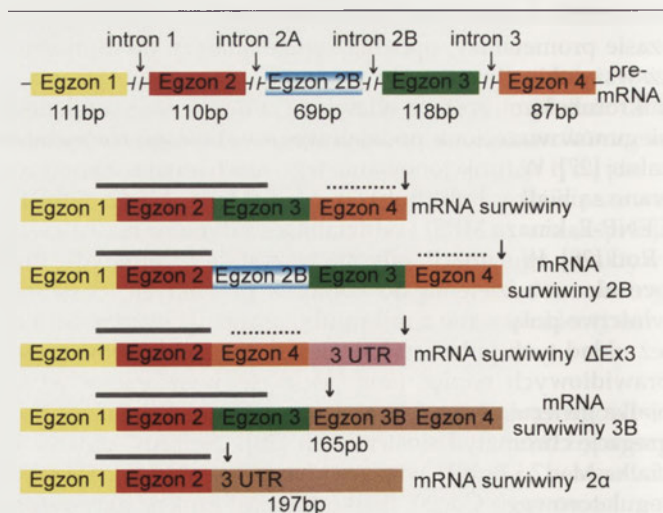
POZIOM EKSPRESJI SURWIWINY

Ekspresję surwiwiny wykazano w komórkach embrionalnych, płodowych, silnie dzielących się oraz w wielu typach nowotworów, w odróżnieniu od komórek terminalnie zróżnicowanych, starych czy też komórek w fazie G0 cyklu komórkowego, w których nie stwierdzono ekspresji tego białka. Nadekspresja surwiwiny jest cechą wielu typów nowotworów, może też dotyczyć komórek z faz agresywnych, związanych z progresją choroby i zaostreniem objawów u pacjentów. Podwyższony poziom tego białka stwierdzono m.in. w zmienionych nowotworowo komórkach układu krwiotwórczego oraz w nowotworach płuc, okrężnicy, trzustki, wątroby [1], żołądka, przelyku, macicy, prostaty, piersi, jajników, nowotworach mózgu i innych [38]. W przypadku niektórych typów nowotworów jak nerwiak (zarodkowy współczulny), nowotwory złośliwe jelita grubego, płuc i pęcherza moczowego, rak okrężnicy i odbytnicy czy niedrobnokomórkowy rak płuc, wykazano korelację pomiędzy wzrostem ekspresji surwiwiny a niekorzystnymi rokowaniami w przebiegu choroby. Stąd też, poziom tego białka proponuje się jako swoisty marker prognostyczny w przebiegu niektórych typów nowotworów [38].

FUNKCJE POSZCZEGÓLNYCH IZOFORM SURWIWINY

W komórkach ludzkich, oprócz formy dzikiej (142 aminokwasy) stwierdzono jak dotąd obecność czterech innych izoform tego białka: tzw. surwiwiny-2 β (165 aminokwasów), surwiwiny- Δ Ex3 (137 aminokwasów) [39], surwiwiny-3 β

(120 aminokwasów) [40] i surwiwiny-2 α (74 aminokwasy) [41] (Ryc. 6). Wykazano, że wszystkie spotykane formy tego białka powstają w drodze różnicowego cięcia i składania (ang. *splicing*) pre-mRNA genu, zlokalizowanego na chromosomie 17 (17q25). Przypuszcza się, że ekspresja poszczególnych izoform surwiwiny zależy od stanu, w jakim w danym momencie znajduje się komórka, jak również rodzaju tkanki, w której się ten proces odbywa, a tym samym, od dostępności czynników edycyjnych (ang. *splicing factors*), regulujących powstawanie alternatywnych form surwiwiny, czy różnic w stabilności poszczególnych rodzajów mRNA [42]. Dokładne zależności między typem tkanki, w którym ma miejsce ekspresja a izoformą, są obecnie przedmiotem licznych badań. Obecność formy dzikiej, surwiwiny-2 β i surwiwiny- Δ Ex3 wykazano m.in. w ludzkich nowotworach pochodzenia nabłonkowego oraz w liniach komórkowych HeLa, U2OS, MCF7. Jednakże we wszystkich badanych przypadkach, w ogólnej puli dominuje dzika forma surwiwiny [39]. Wykazano, że surwiwina- Δ Ex3 posiada właściwości antyapoptotyczne, podczas gdy w przypadku formy 2 β są one mocno zredukowane. Sugeruje się, iż surwiwina 2 β może pełnić rolę naturalnego, endogennego antagonisty form o właściwościach antyapoptotycznych, tj. dzikiej i surwiwiny- Δ Ex3 i w sposób kompetycyjny wiązać ich partnerów białkowych [42]. Ostatnio odkryta i jeszcze dość słabo scharakteryzowana na tle innych surwiwina-2 α , również oddziałuje z dziką formą surwiwiny, osłabiając jej antyapoptotyczne właściwości [41]. Wydaje się, że mamy tu do czynienia ze zjawiskiem znanym już wcześniej w kontekście innych białek regulujących proces apoptozy: Bcl-X_L czy Bcl-X_S, czyli funkcjonalnym antagonizmem między antyapoptotycznymi a pozbawionymi takich właściwości izoformami [42]. Stwierdzono kolokalizację formy dzikiej i surwiwiny 2 β w cytoplazmie, podczas gdy surwiwina- Δ Ex3 obecna jest w jądrze komórkowym. W przypadku izoform Δ Ex3 i 2 β nie wykazano tak charakterystycznej dla formy dzikiej lokalizacji na centromerach i oddziaływań z mikrotubulami w czasie mitozy. Jednakże nagromadzenie surwiwiny- Δ Ex3 w jądrze w późnej fazie G1, S, G2, może dodatkowo wskazywać na jej nieznaną dotąd rolę w regulacji cyklu komórkowego [42].



Rycina 6. Porównanie struktury poszczególnych izoform surwiwiny. Rysunek zmodyfikowany na podstawie [41].

Jak już wspomniano, obecność surwiwiny uznawana jest za swoisty marker komórek embrionalnych, płodowych i wielu typów komórek nowotworowych. Poziom tego białka w prawidłowych, dzielących się komórkach somatycznych jest nieporównywalnie niższy (często na granicy detekcji), zaś w komórkach terminalnie zróżnicowanych i starych nie stwierdza się obecności surwiwiny. Próby wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za tak istotne różnice w poziomie ekspresji tego białka między różnymi komórkami, w połączeniu z regulacją na poziomie cyklu komórkowego, podejmowane są od lat.

Jedno z pierwszych pytań jakie postawiono, dotyczyło mechanizmów odpowiadających za przywrócenie poziomu ekspresji surwiwiny typowego dla komórek embrionalnych/płodowych w komórkach nowotworowych lub, patrząc na zagadnienie od drugiej strony, jakie mechanizmy odpowiadają za zahamowanie ekspresji surwiwiny w prawidłowych komórkach somatycznych. Mimo intensywnych badań, wiedza na ten temat jest wciąż niewystarczająca. Wydaje się, że tak jak w przypadku wielu innych genów, których wzorzec ekspresji zmienia się w komórkach nowotworowych, istotną rolę mogą tu odgrywać związane z aktywnością demetylaz różnice w poziomie i wzorze metylacji w obrębie promotora genu surwiwiny w komórkach prawidłowych i nowotworowych [16,43].

Uważa się, że regulację transkrypcji genu surwiwiny, która wykazuje znaczne zróżnicowanie w różnych typach tkanek czy stadiach nowotworów, zaangażowane muszą być sygnały płynące z różnych szlaków sygnałowych w komórce. Wykazano, że w regulacji ekspresji surwiwiny w ludzkich komórkach raka okrężnicy uczestniczą białka szlaku sygnałowego TCF/ β -katenina i czynnik transkrypcyjny CBP (ang. *Creb-binding protein*) [44]. Farmakologiczne zahamowanie białka Stat3 lub obecność jego zmutowanej formy w komórkach nowotworowych linii PEL, w których szlak z udziałem tego białka jest ciągle aktywny, prowadzi do zahamowania ekspresji surwiwiny na etapie transkrypcji i indukcji apoptozy [45]. Wykazano również, że ekspresja surwiwiny może być regulowana m.in. poprzez czynniki wzrostowe/cytokiny hormony czy inhibitory kinaz [38].

Równie ciekawym zagadnieniem jest regulacja ekspresji surwiwiny w cyklu komórkowym. Silna ekspresja tego białka w fazie G2/M cyklu komórkowego (40-krotny wzrost ilości mRNA w porównaniu z fazą G1) [16], a jej brak w fazie G1 i S, jest wypadkową kilku procesów zachodzących na etapie transkrypcji, modyfikacji potranslacyjnych, jak i proteasomalnej degradacji.

Analiza sekwencji w obrębie promotora genu surwiwiny wykazała obecność charakterystycznych sekwencji spotykanych w obrębie promotorów innych genów ekspresyjnych w fazie G2/M cyklu komórkowego, tj.: trzech sekwencji CDE (ang. *cycle dependent elements*) i jednej sekwencji CHR (ang. *cell cycle homology region*) [16]. Obecność sekwencji CDE koreluje z nasileniem transkrypcji w fazie G2/M, a sekwencji CHR z hamowaniem ekspresji w fazie G1 cyklu komórkowego [46]. W obrębie promotora znajdują się

również miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego Sp1, a mutacje w nich prowadzą do obniżenia ekspresji surwiwiny o 60-80% [47]. Czynniki transkrypcyjne z rodziny Sp1 należą do kluczowych modulatorów ekspresji wielu genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego w drodze rekrutacji do promotora RNA polimerazy II, generowania lokalnych zmian struktury/organizacji chromatyny i utrzymania regionów bogatych w reszty CpG w stanie hypometylacji [47].

W obrębie promotora genu surwiwiny wykazano również obecność miejsca wiązania białka p53, które częściowo zachodzi na miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych z rodziny E2F. Udowodniono, że związanie dzikiej formy białka p53 do promotora, hamuje transkrypcję genu surwiwiny, a efekt ten tłumaczy się współistnieniem kilku zjawisk. Pierwsze z nich to fakt, że związanie p53 do promotora upośledza przyłączanie białek z rodziny E2F, znanych transaktywatorów genu surwiwiny. Drugie ma nieco bardziej złożony charakter i dotyczy przyłączania do związanej już z promotorem białka p53, represorowego białka Sin3 i dalszej rekrutacji do tworzącego się kompleksu deacetylaz histonów (HDACs) [48]. Deacetylacja reszt lizynowych na N-końcowych ogonach histonów rdzeniowych, zachodząca przy udziale wspomnianych deacetylaz, zmienia strukturę chromatyny w obrębie promotora genu, przez co, staje się ona mniej dostępna dla innych białek niezbędnych do zajścia procesu transkrypcji [49].

Regulację poziomu ekspresji surwiwiny na poziomie białka należy rozpatrywać również w kategoriach jej stabilności i procesów degradacji. Wykazano, że surwiwina wiąże się z białkiem opiekuńczym Hsp90, co wpływa na jej stabilność w komórce. Zniszczenie oddziaływań między tymi białkami powoduje proteasomalną degradację surwiwiny oraz zaburzenia w przebiegu mitozy lub apoptozę [50]. Rola tego typu oddziaływań z udziałem białek opiekuńczych nabiera dodatkowego znaczenia w kontekście nadekspresji białek z rodziny Hsp w wielu typach nowotworów [51].

Degradacja z udziałem proteasomu jest niezwykle istotnym mechanizmem regulującym poziom białek w komórce; znaczenie tego procesu jest szczególnie istotne w odniesieniu do białek zaangażowanych w przebieg cyklu komórkowego. W drodze ubiquitylacji regulowane są m.in. cykliny A, B, D, E, inhibitory cyklinozależnych kinaz, tj. białka p21, p27 i p57 [52] oraz szereg czynników transkrypcyjnych. Wykazano, że również surwiwina jest ubiquitylowana w obrębie kilku reszt lizynowych i ulega proteasomalnej degradacji w warunkach *in vivo*. Aktywność proteasomu w tym kierunku zmienia się w czasie cyklu komórkowego, osiągając maksimum w fazie G1, w czasie której poziom surwiwiny w komórce drastycznie spada [52]. Ta sama grupa badawcza, analizując zmutowane w obrębie domeny BIR lub C-końcowej sekwencji formy surwiwiny ustaliła, że zarówno zlokalizowana na N-końcu domena BIR, jak i fragment C-końcowy istotnie wpływają na stabilność surwiwiny w fazie G2/M cyklu komórkowego [52].

UWAGI KOŃCOWE

Surwiwina jest białkiem łączącym w sobie niesłychanie istotne funkcje hamowania apoptozy i regulacji przebiegu podziału komórki. Podwyższona oporność na śmierć i „usprawnienie” podziałów komórkowych promują przeżycie i ekspansję komórek, w których wykazano podwyższoną ekspresję surwiwiny, w tym komórek wielu typów nowotworów [53].

Wyjątkowe zainteresowanie tym białkiem wynika również z faktu, że wydaje się ono być swoistym „molekularnym ogniwem” łączącym ze sobą procesy życia i śmierci w komórce. Antyapoptotyczne właściwości surwiwiny ujawniają się w przebiegu samej mitozy. Wykazano bowiem, że białko to chroni komórki dzielące się przed śmiercią w czasie podziału. Pewna część puli surwiwiny zlokalizowanej w obrębie aparatu mitotycznego w czasie podziału komórki jest fosforylowana na treoninie 34 przez kompleks p34^{cdc2}-cyklina B i w takiej formie wiąże się z kaspazą 9. Mutacja tego miejsca w genie surwiwiny, wyrażająca się zamianą treoniny na alaninę i wynikający z niej brak fosforylacji, powoduje utratę powinowactwa do kaspazy 9 i zależną od niej apoptozę w komórkach dzielących się [54].

Ze względu na silną ekspresję surwiwiny w wielu typach nowotworów, stosunkowo szybko uznano ją za potencjalny cel w terapii przeciwnowotworowej. Terapie z zastosowaniem antysensownych oligonukleotydów, skierowanych przeciw surwiwinie, obecnie znajdują się w fazie badań klinicznych. Ich wprowadzenie do leczenia wydaje się być kwestią niedalekiej przyszłości. W kontekście tego typu przedsięwzięć warto jednak mieć na uwadze, że ingerencja w ekspresję białek na poziomie komórkowym jest procesem niezwykle skomplikowanym, a jego konsekwencje nie zawsze dają się przewidzieć. W szeregu badań (w tym również prowadzonych przez nasz zespół) wykazano, że wygaszenie ekspresji surwiwiny, może prowadzić do powstania komórek poliploidalnych i aneuploidalnych [19,21,55]. Zjawisko to, mimo tego, że dotyczy zwykle niewielkiej części komórek, może mieć ogromne znaczenie w dalszym przebiegu choroby. W świetle najnowszych teorii dotyczących genetyki nowotworów, niestabilne genetycznie komórki poliploidalne i aneuploidalne mogą stać się źródłem nowych klonów, inicjując odnowę nowotworu. Powstałe w ten sposób klony stanowią „nową jakość” pod względem genetycznym. Znikoma wiedza w zakresie tej problematyki nie pozwala na udzielenie odpowiedzi na pytanie o to, czy przypadkiem te nowe klony nie okażą się dla pacjenta groźniejsze i bardziej odporne na leczenie niż komórki, z których się wywodzą.

W bieżącym roku minie 10 lat od odkrycia surwiwiny i 10 lat intensywnych badań nad jej właściwościami i rolą w komórce. Mimo tego, że badania te dostarczyły szeregu fascynujących wyników, pozwoliły na zrozumienie pewnych zagadnień, wiele pytań czeka jeszcze na odpowiedź. Na przykład, ciągle nie ma pewności czy surwiwina jest właściwym celem terapeutycznym w leczeniu nowotworów. Poza wątpliwościami opisanymi powyżej (poliploidia, aneuploidia, niestabilność genetyczna), istnieje obawa wystąpienia efektów ubocznych związanych z zahamowaniem proliferacji limfocytów. Wykazano bowiem, że surwiwina

jest ekspresjonowana w komórkach progenitorowych układu krwiotwórczego [56] i prawidłowych limfocytach [57]. Wiadomo, że ich proliferacja jest niezbędna do prawidłowej odpowiedzi układu odpornościowego na patogen. Tak więc, czy wygaszenie ekspresji surwiwiny nie spowoduje efektów ubocznych w postaci osłabienia układu odpornościowego, tak typowego przy radio- i chemioterapii? Nie bez znaczenia pozostaje również fakt, że surwiwina jest ekspresjonowana w komórkach macierzystych [58]. Czy zahamowanie jej ekspresji w tych komórkach, jako skutek uboczny terapii antysurwiwinowej nie okaże się brzemienne w skutkach dla całego organizmu? Jak widać, pomimo ciągle rosnącej ilości danych na temat mechanizmów związanych z hamowaniem proliferacji i indukcją apoptozy komórek nowotworowych, w których znaczący udział ma surwiwina, ciągle jesteśmy dalecy od udzielenia odpowiedzi na zasadnicze pytanie, dotyczące strategii terapeutycznych w walce z nowotworami, mianowicie czy broń, po którą chcemy sięgnąć w „walce z surwiwiną” (terapię antysurwiwinową) nie okaże się bronią obosieczną.

PIŚMIENNICTWO

1. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3: 917-921
2. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE (1998) The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17: 3247-3259
3. Deveraux QL, Reed JC (1999) IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13: 239-252
4. Song Z, Liu S, He H, Hoti N, Wang Y, Feng S, Wu M (2004) A single amino acid change (Asp 53 → Ala53) converts Survivin from anti-apoptotic to pro-apoptotic. *Mol Biol Cell* 15: 1287-1296
5. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC (1998) IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 58: 5315-5320
6. Grądzka I (2006) Mechanizmy i regulacja programowanej śmierci komórek. *Postepy Biochem* 52: 157-165
7. Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Datta P, Alnemri ES, Shi Y (2001) Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 104: 769-780
8. Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC (2003) HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 22: 2729-2740
9. Song Z, Yao X, Wu M (2003) Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem* 278: 23130-23140
10. Xu X, Gerard AL, Huang BC, Anderson DC, Payan DG, Luo Y (1998) Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer. *Nucleic Acids Res* 26: 2034-2035
11. Olie RA, Simoes-Wüst AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U (2000) A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res* 60: 2805-2809
12. Kappler M, Bache M, Bartel F, Kotsch M, Panian M, Wurl P, Blumke K, Schmidt H, Meyer A, Taubert H (2004) Knockdown of survivin expression by small interfering RNA reduces the clonogenic survival of human sarcoma cell lines independently of p53. *Cancer Gene Ther* 11: 186-193
13. Chawla-Sarkar M, Bae SI, Reu FJ, Jacobs BS, Lindner DJ, Borden EC (2004) Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 11: 915-923

14. Ling X, Li F (2004) Silencing of antiapoptotic survivin gene by multiple approaches of RNA interference technology. *Biotechniques* 36: 450-454, 456-460
15. Altieri DC (2003) Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 3: 46-54
16. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC (1998) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396: 580-584
17. Skoufias DA, Mollinari C, Lacroix FB, Margolis RL (2000) Human survivin is a kinetochore-associated passenger protein. *J Cell Biol* 151: 1575-1582
18. Vagnarelli P, Earnshaw WC (2004) Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* 113: 211-222
19. Wolanin K, Magalska A, Mosieniak G, Klinger R, McKenna S, Vejda S, Sikora E, Piwocka K (2006) Curcumin affects components of the chromosomal passenger complex and induces mitotic catastrophe in apoptosis-resistant Bcr-Abl-expressing cells. *Mol Cancer Res* 4: 457-469
20. Magalska A, Sliwinska M, Szczepanowska J, Salvioli S, Franceschi C, Sikora E (2006) Resistance to apoptosis of HCW-2 cells can be overcome by curcumin- or vincristine-induced mitotic catastrophe. *Int J Cancer* 119: 1811-1818
21. Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tognin S, Villa A, Marchisio PC, Altieri DC (1999) Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol* 1: 461-466
22. Giet R, Petretti C, Prigent C (2005) Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol* 15: 241-250
23. Andrews PD, Knatko E, Moore WJ, Swedlow JR (2003) Mitotic mechanics: the auroras come into view. *Curr Opin Cell Biol* 15: 672-683
24. Lan W, Zhang X, Kline-Smith SL, Rosasco SE, Barrett-Wilt GA, Shabanowitz J, Hunt DF, Walczak CE, Stukenberg PT (2004) Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol* 14: 273-86
25. Chen J, Jin S, Tahir SK, Zhang H, Liu X, Sarthy AV, McGonigal TP, Liu Z, Rosenberg SH, Ng SC (2003) Survivin enhances Aurora-B kinase activity and localizes Aurora B in human cells. *J Biol Chem* 278: 486-490
26. Uren AG, Wong L, Pakusch M, Fowler KJ, Burrows FJ, Vaux DL, Choo KH (2000) Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol* 10: 1319-1328
27. Nicklas RB (1997) How cells get the right chromosomes. *Science* 275: 632-637
28. Lens SM, Medema RH (2003) The survivin/Aurora B complex: its role in coordinating tension and attachment. *Cell Cycle* 2: 507-510
29. Musacchio A, Hardwick KG (2002) The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 731-741
30. Sudakin V, Chan GK, Yen TJ (2001) Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* 154: 925-936
31. Wasch R, Engelbert D (2005) Anaphase-promoting complex-dependent proteolysis of cell cycle regulators and genomic instability of cancer cells. *Oncogene* 24: 1-10
32. Carvalho A, Carmena M, Sambade C, Earnshaw WC, Wheatley SP (2003) Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J Cell Sci* 116: 2987-2998
33. Lens SM, Wolthuis RM, Klompmaaker R, Kaw J, Agami R, Brummelkamp T, Kops G, Medema RH (2003) Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *EMBO J* 22: 2934-2947
34. Waters JC, Chen RH, Murray AW, Salmon ED (1998) Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *J Cell Biol* 141: 1181-1191
35. Shannon KB, Canman JC, Salmon ED (2002) Mad2 and BubR1 function in a single checkpoint pathway that responds to a loss of tension. *Mol Biol Cell* 13: 3706-3719
36. Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbsky GJ, Tognin S, Marchisio PC, Symons M, Altieri DC (2002) Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res* 62: 2462-2467
37. Rosa J, Canovas P, Islam A, Altieri DC, Doxsey SJ (2006) Survivin modulates microtubule dynamics and nucleation throughout the cell cycle. *Mol Biol Cell* 17: 1483-1493
38. Li F (2003) Survivin study; what is the next wave? *J Cell Physiol* 197: 8-29
39. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD (1999) Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res* 59: 6097-6102
40. Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, Inuzuka M (2004) Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 902-907
41. Caldas H, Honsey LE, Altura RA (2005) Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol Cancer* 4: 11
42. Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek CV, Schmitt M, Gabbert HE, Gerharz CD (2002) Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death Differ* 9: 1334-1342
43. Hattori M, Sakamoto H, Satoh K, Yamamoto T (2001) DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes. *Cancer Lett* 169: 155-164
44. Ma H, Nguyen C, Lee KS, Kahn M (2005) Differential roles for the coactivators CBP and p300 on TCF/beta-catenin-mediated survivin gene expression. *Oncogene* 24: 3619-3631
45. Aoki Y, Feldman GM, Tosato G (2003) Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood* 101: 1535-1542
46. Zwicker J, Lucibello FC, Wolfram LA, Gross C, Truss M, Engeland K, Muller R (1995) Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. *EMBO J* 14: 4514-4522
47. Li F, Altieri DC (1999) Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem J* 344: 305-311
48. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M (2002) Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 277: 3247-3257
49. Murphy M, Ahn J, Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ, George DL (1999) Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* 13: 2490-2501
50. Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, Fontana J, Pradhan D, Marchisio PC, Sessa WC, Altieri DC (2003) Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 13791-13796
51. Ciocca DR, Calderwood SK (2005) Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10: 86-103
52. Zhao J, Tenev T, Martins LM, Downward J, Lemoine NR (2000) The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci* 113: 4363-4371
53. Wheatley SP, McNeish A (2005) Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *Int Rev Cytol* 247: 35-8853
54. O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC (2000) Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13103-13107
55. Nquygen HG, Ravid K (2006) Tetraploidy/aneuploidy and stem cells in cancer promotion: the role of chromosome passenger proteins. *J Cell Physiol* 208: 12-22
56. Fukuda S, Pelus LM (2006) Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* 5: 1087-1098

57. Xing Z, Conway EM, Kang C, Winoto A (2004) Essential role of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in T cell development, maturation, and homeostasis. *J Exp Med* 199: 69-80

58. Zangemeister-Wittke U, Simon HU (2004) An IAP in action: the multiple roles of survivin in differentiation, immunity and malignancy. *Cell Cycle* 3: 1121-1123

Role of survivin in mitosis

Kamila Wolanin[✉], Katarzyna Piwocka

Laboratory of Molecular Bases of Aging, Department of Biochemistry, The Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur St., 02-093 Warsaw, Poland

[✉]e-mail: k.wolanin@nencki.gov.pl

Key words: survivin, mitosis, mitotic spindle assembly checkpoint, apoptosis, cell cycle

ABSTRACT

Human survivin is a member of the IAP (Inhibitor of Apoptosis) family. It was reported that survivin expression is associated with drug resistance, cancer progression and low patient survival rate in many cancers. Survivin is implicated in both: inhibition of apoptosis and regulation of cell division. As a member of Chromosomal Passenger Complex (CPC) it is involved in sister chromatids segregation during mitosis. On the other hand, survivin plays an important role in the surveillance mechanism called mitotic spindle assembly checkpoint (MSAC) which regulates metaphase to anaphase transition during mitosis. Additionally, survivin is necessary for cytokinesis progression. The present review is a summary of survivin's functions, focused on its role in cell division in normal and cancer cells, as well as introduction to discussion about anticancer therapies based on survivin depletion.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

SKŁADKI CZŁONKOWSKIE I PRENUMERATA „POSTĘPÓW BIOCHEMII” W 2007 ROKU

W roku 2007 pełna składka członkowska wynosi 80 zł rocznie. Dotychczasowi członkowie-studenci oraz członkowie zwyczajni, którym przyznano prawo do ulgowej składki, płacą składkę w wysokości 40 zł rocznie. Małżeństwa opłacają składki w wysokości 80 + 40 zł. Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską do 31 marca 2007 roku, mają zapewnioną bezpłatną prenumeratę kwartalnika „Postępy Biochemii”. Członkowie, którzy opłacą składkę po tym terminie, będą otrzymywać kwartalnik do czasu wyczerpania zapasów magazynowych. Członkowie honorowi zwolnieni są z opłacania składek członkowskich. Członkowie honorowi otrzymują bezpłatnie „Postępy Biochemii”. Członkowie emeryci nie płacą składek członkowskich. Członkowie emeryci mogą zaprenumerować „Postępy Biochemii”, płacąc za nie 30 zł rocznie. Osoby, które nie są członkami Towarzystwa mogą zaprenumerować „Postępy Biochemii” w cenie 100 zł rocznie. Studenci mogą zaprenumerować „Postępy Biochemii” po ulgowej cenie 40 zł. Konieczne jest przy tym udokumentowanie statusu studenta odpowiednim zaświadczeniem z Dziekanatu lub kopią ważnej legitymacji studenckiej. Biblioteki i inne instytucje płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” 150 zł. Wyjaśniamy, że ulgowa składka przysługuje studentom i uczestnikom studiów doktoranckich. Uprawnienia do ulgowej składki przyznaje Zarząd Główny lub jego Prezydium na podstawie indywidualnego wystąpienia członka, udokumentowanego odpowiednim zaświadczeniem lub oświadczeniem. Uprawnienie ważne jest tylko na dany rok i wymaga ponownego wystąpienia w roku następnym, z tym że ulgowa składka może przysługiwać nie dłużej niż przez okres 5 kolejnych lat, łącznie z rokiem jej przyznania. Osoby, które zostały zawieszony w prawach członka z powodu niepłacenia składek więcej niż dwa lata, lecz nie zostały jeszcze formalnie skreślone z listy członków, mają prawo stać się ponownie pełnoprawnymi członkami PTBioch po uregulowaniu wszystkich zaległych składek. Przypominamy, że w roku 2006 r. składki wynosiły 80 zł (ulgowa 40 zł). W latach 2002-2005 składki wynosiły 80 zł dla członka zwyczajnego i 40 zł dla członka studenta. W roku 2002 r. składki wynosiły: 70 zł dla członka zwyczajnego i 35 zł dla członka studenta. Wszelkie wątpliwości związane z opłacaniem składek prosimy wyjaśniać w każdy wtorek w godzinach 12:00 – 17:00 w biurze Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, tel.: 022 58 92 352 lub 022 58 92 499, faks: 022 658 20 99, e-mail: ptbioch@nencki.gov.pl lub ze skarbnikiem Towarzystwa, dr Anną Dygas, tel. 022 58 92 225, faks: 022 822 53 42, e-mail: adygas@nencki.gov.pl.

Opłaty należy wносить do banku:

BPH S.A. Oddział Warszawa, ul. Krucza 24-26
na konto: 94 1060 0076 0000 4010 5000 0341

Opłaty z zagranicy: IBAN: PL94 1060 0076 0000 4010 5000 0341

SWIFT Code: BPHKPLPK (Koszty przekazu i zamiany waluty obciążają wplacającego)

Przypominamy, że zmianie uległa deklaracja członkowska Towarzystwa. Informacje na ten temat można znaleźć na stronie internetowej pod adresem: <http://www.ptbioch.edu.pl/>. Jednocześnie prosimy osoby, których adres poczty elektronicznej uległ zmianie, by poinformowały o tym fakcie dr Annę Dygas.

Małe białka szoku termicznego – rola w apoptozie, kancerogenezie i chorobach związanych z agregacją białek

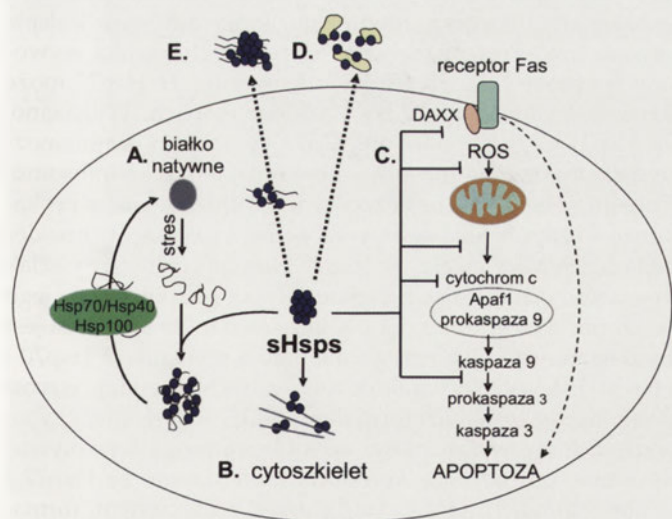
STRESZCZENIE

Małe białka szoku termicznego (sHsps, ang. *small heat shock proteins*) należą do białek opiekuńczych, które chronią komórki prokariotyczne i eukariotyczne przed szkodliwymi skutkami stresu. sHsps zapobiegają indukowanej przez stres, nieodwracalnej agregacji uszkodzonych białek i umożliwiają renaturację związanych substratów, współpracując z innymi białkami opiekuńczymi. W niniejszej pracy podsumowano ostatnie badania dotyczące głównie udziału sHsps w chorobach związanych z agregacją białek. sHsps są często składnikiem agregatów białkowych, które powstają w trakcie rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Zidentyfikowano szereg mutacji w genach sHsps, które są odpowiedzialne za rozwój zaćmy, desminopatii i neuropatii. sHsps chronią komórki przed stresem oksydacyjnym, który jest wynikiem niedokrwienia/reperfuzji wywołanej udarem serca lub mózgu. Liczne badania wskazują, że sHsps uczestniczą w regulacji apoptozy i są zaangażowane w proces kancerogenezy. Poznanie roli sHsps w procesach chorobotwórczych umożliwi opracowanie nowych strategii terapeutycznych.

WPROWADZENIE – STRUKTURA I FUNKCJA SHSPS JAKO BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH

Małe białka szoku termicznego (sHsps) należą do grupy białek opiekuńczych (ang. *molecular chaperones*) występujących w większości zbadanych do tej pory organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Rolą sHsps jest zapobieganie nieodwracalnej denaturacji i agregacji białek uszkodzonych w warunkach stresowych. Kompleksy sHsp z substratami są stabilne. Szereg doświadczeń *in vitro* wykazało, że związane polipeptydy mogą być uwolnione i reaktywowane przez zależny od ATP system białek opiekuńczych Hsp70/Hsp100 (Ryc. 1A) [1-4]. W komórkach *E. coli* wydajność renaturacji substratów przez białka opiekuńcze Hsp70-Hsp100 (DnaK/DnaJ/GrpE – ClpB) znacznie spada przy braku sHsps (IbpA i IbpB), zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [4,5].

Ilość produkowanych sHsps jest różna w zależności od organizmu: w komórkach *E. coli* i *Saccharomyces cerevisiae* zidentyfikowano dwa sHsps, u *Drosophila melanogaster* cztery [2]. Najliczniejszą grupę, zawierającą ponad 30 różnych białek,



Rycina 1. Rola sHsps w komórce. (A) sHsps zapobiegają nieodwracalnej agregacji uszkodzonych białek. Zdenaturowane w warunkach stresowych polipeptydy są wiązane przez sHsps, a następnie renaturowane z udziałem zależnych od ATP białek opiekuńczych Hsp100-Hsp70/Hsp40. Brak sHsps w komórce utrudnia usuwanie agregatów i może prowadzić do rozwoju chorób agregacyjnych. (B) sHsps stabilizują strukturę cytoszkieletu, (C) hamują proces apoptozy i obniżają poziom reaktywnych form tlenu oraz (D) hamują agregację płytek krwi. (E) sHsps mogą być składnikiem agregatów towarzyszących chorobom neurodegeneracyjnym.

Ewa Laskowska

Katedra Biochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet Gdański, Gdańsk

Katedra Biochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-952 Gdańsk; e-mail: lasko@biotech.univ.gda.pl, tel.: (058) 301 57 41

Artykuł otrzymano 14 czerwca 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 20 września 2006 r.

Słowa kluczowe: agregacja białek, białka opiekuńcze, choroby neurodegeneracyjne, α -kryształiny, małe białka szoku termicznego

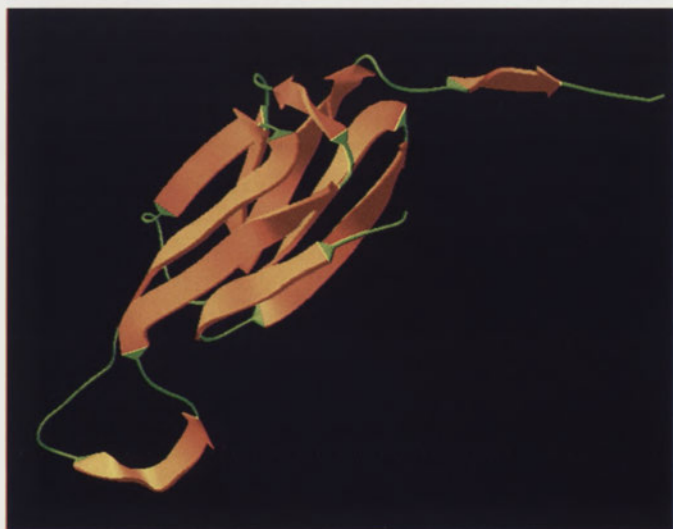
Wykaz skrótów: Apaf-1 (ang. *apoptosis protease activating factor*) – czynnik aktywujący proteazy; CMT (ang. *Charcot –Marie-Tooth disease*) – choroba Charcota-Marie-Tootha; DRM (ang. *desmin related myopathy*) – desminopatia; Hsps (ang. *heat shock proteins*) – białka szoku termicznego; ROS (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu; sHsps (ang. *small heat shock proteins*) – małe białka szoku termicznego

Podziękowanie: Praca powstała w trakcie realizacji grantu MNiSW 0401/P04/2005/28

stanowią roślinne sHsp obecne w cytosolu, jądrze i organellach komórkowych. sHsps charakteryzują się niską masą od 15 do 40 kDa (stąd nazwa tej grupy białek), oligomeryczną strukturą i obecnością domeny α -kryształiny zawierającą około 90 reszt aminokwasowych w części karboksylowej sHsps. α -kryształiny są jednymi z głównych białek soczewki oka ssaków, ich rola w zapobieganiu agregacji białek soczewki zostanie opisana

w dalszej części tej pracy. Obecność domeny α -krystaliny jest głównym kryterium przynależności do sHsps, dlatego zaproponowano drugą nazwę dla tej grupy białek – α -Hsps [6]. W przypadku wielu sHsps struktura oligomerów jest dynamiczna. sHsps tworzą homo- i heterooligomery, których podjednostki mogą ulegać ciągłej wymianie. Wielkość oligomerów może być zmienna, przy czym podwyższenie temperatury powoduje tworzenie większych struktur (np. Hsp25 u myszy) lub rozpad oligomerów na mniejsze kompleksy lub dimery, które wiążą rozwinięte łańcuchy polipeptydowe substratów (Hsp26 z drożdży) [2,6]. Z zastosowaniem metody krystalografii lub mikroskopii elektronowej poznano, do tej pory, strukturę jedynie kilku oligomerów sHsps, które posiadają stałą ilość podjednostek: Hsp16,5 z archea *Methanococcus jannaschii*, Hsp16,9 z pszenicy *T. aestivum*, Hsp26 z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i Hsp16,3 z *Mycobacterium tuberculosis* [2,7,8]. Wszystkie wymienione sHsps mają kształt sferyczny. W Hsp16,5 dwadzieścia cztery podjednostki tworzą strukturę sferyczną o oktagonalnej symetrii, z czternastoma otworami. W Hsp16,5 i innych sHsps o znanej konformacji domena α -krystaliny jest zwinęta w dwa równoległe arkusze β (Ryc. 2). Dzięki oddziaływaniom domen α -krystaliny powstają dimery, które są podstawowymi elementami strukturalnymi oligomerów. Za tworzenie większych kompleksów odpowiedzialne są końce karboksylowe i/lub aminowe otaczające domenę α -krystaliny sHsps. Fragmenty poza domeną α -krystaliny mogą również wiązać substraty [2].

W genomie człowieka znajduje się 10 genów kodujących sHsps [9]. Krótką charakterystykę ich funkcji przedstawiono w tabeli 1. Większość sHsps człowieka jest produkowana konstytutywnie w tkance mięśniowej i jako białka opiekuńcze zapobiegają agregacji modelowych substratów w reakcjach *in vitro*. Najlepiej poznane pod względem funkcji i struktury są α -krystaliny, Hsp27 i Hsp22. W ciągu ostatnich kilku lat zidentyfikowano szereg mutacji w genach sHsps, które odpowiedzialne są za rozwój zaćmy, desminopatii i neuropatii. Wiele badań wskazuje na to, że sHsps działają nie tylko jako typowe białka opiekuńcze, ale są również odpowiedzialne za równowagę wewnątrzkomórkowego potencjału redoks, regulację złożonych procesów apoptozy



Rycina 2. Struktura monomeru Hsp16.5 *M. jannaschii* (1SHS, baza danych PDB). Zachowana w ewolucji domena α -krystaliny tworzy dwa arkusze β .

i transformacji nowotworowej oraz stabilizację cytoszkieletu (Ryc. 1). Wykazano, że Hsp27, Hsp20 i α -krystaliny człowieka stabilizują mikrofilamenty aktyny w warunkach stresu termicznego i oksydacyjnego [11]. W odpowiedzi na stres dochodzi do dezorganizacji cytoszkieletu i do fosforylacji sHsps, które oddziałują pośrednio lub bezpośrednio z filamentami aktyny ułatwiając ich reorganizację. HspB2 i HspB3 uczestniczą w stabilizacji miofibrili w komórkach mięśniowych [11], natomiast HspB10 wchodzi w skład gęstych włókien zewnętrznych (ang. *outer dense fibers*) otaczających aksonemy w witkach plemników [12]. Ostatnie badania wskazują, że sHsps mogą również działać poza komórką. Kozawa i wsp. stwierdzili, że w wyniku stresu mechanicznego α B-krystalina i Hsp20 są uwalniane z mięśni gładkich naczyń krwionośnych i zapobiegają agregacji płytek krwi [13]. Prezentowana praca przedstawia najnowsze informacje dotyczące udziału sHsps, m. in. w regulacji apoptozy, kancerogenezy i rozwoju chorób związanych z agregacją białek.

ROLA sHsps W REGULACJI APOPTOZY I KANCEROGENEZY

Istnieje wiele danych wskazujących, że sHsps uczestniczą w procesach różnicowania i proliferacji komórek. Hsp27 chroni komórki przed czynnikami, które wywołują apoptozę (programowaną śmierć komórki): cytokinami, lekami cytotoksycznymi, stresem oksydacyjnym i promieniowaniem jonizującym [14]. Apoptoza może być regulowana dwoma szlakami, w których jedną z kluczowych ról odgrywają kaspazy – proteazy cysteinowe syntetyzowane w formie nieaktywnych zymogenów. Na tzw. drodze zewnętrznej następuje wiązanie liganda do receptora (ang. *death receptor*) znajdującego się na powierzchni komórki i aktywacji prokaspazy 8, a następnie prokaspazy 3. Droga wewnętrzna jest inicjowana przez uwolnienie cytochromu c z mitochondriów. Cytochrom c wraz z czynnikiem aktywującym proteazę Apaf-1 (ang. *apoptosis protease activating factor*) i prokaspazą 9 tworzy apoptosom, który aktywuje kolejne prokaspazy. Proteoliza białek docelowych kaspaz wywołuje apoptozę [14]. Szereg badań sugeruje, że Hsp27 może hamować proces apoptozy na kilku etapach. Wykazano, że Hsp27 prawdopodobnie wiąże cytochrom c, uniemożliwiając tworzenie lub prawidłowe działanie apoptosomu. Ponadto, Hsp27 może bezpośrednio oddziaływać z prokaspazą 3 i zapobiegać jej aktywacji przez kaspazę 9. Inne doświadczenia wykazały, że Hsp27 hamuje zewnętrzny szlak apoptozy, oddziałując z białkiem Daxx i zapobiegając jego wiązaniu z receptorem Fas. Należy dodać, że apoptoza jest hamowana również przez inne białka opiekuńcze Hsp70 i Hsp90 [14]. Wiele czynników toksycznych powoduje wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*), które w zależności od stężenia mogą wywoływać apoptozę lub nekrozę komórki. Stwierdzono, że Hsp27 i α B-krystalina chronią komórki przed reaktywnymi formami tlenu indukowanymi TNF α (ang. *tumor necrosis factor*, czynnik martwicy nowotworu) nadtlenkiem wodoru lub menadionem. Przypuszcza się, że sHsps utrzymują wysoki poziom zredukowanego glutationu, umożliwiając detoksyfikację reaktywnych form tlenu. Do redukcji utlenionego glutationu wykorzystywany jest NADPH, który powstaje w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę glukozo-6

fosforanu [15]. Autorzy sugerują, że sHsps mogą chronić dehydrogenazę przed inaktywacją. Interesującym przykładem działania Hsp27 jest ochrona komórek podstawnych nabłonka oskrzeli u chorych na astmę. Towarzyszący astmie stan zapalny wywołuje stres oksydacyjny w nabłonku oskrzeli, prowadząc do selektywnej apoptozy komórek nabłonka walcowatego, które pozbawione są Hsp27. Komórki podstawne, dzięki którym następuje odbudowa uszkodzonego nabłonka są chronione przed apoptozą dzięki podwyższonemu poziomowi Hsp27 [16].

Towarzyszący udarowi serca lub mózgu proces niedokrwienia (ischemii)/reperfuzji również wywołuje stres oksydacyjny. W wyniku ischemii/reperfuzji następuje uszkodzenie tkanek na drodze apoptozy lub nekrozy: wiele białek jest denaturowanych, cytoszkielet i mitochondria ulegają uszkodzeniu, a lipidy błon utlenieniu [17]. Nadprodukcja sHsps u zwierząt transgenicznym lub w hodowlach kardiomiocytów chroni komórki serca przed skutkami nie-

dokrwienia/reperfuzji, prawdopodobnie przez oddziaływanie z miofibrilami. W komórkach serca i mięśni szkieletowych niedokrwienie powoduje przemieszczenie pięciu sHsps: α B-krystaliny, HspB2, Hsp27, Hsp20 i HspB7 z cytosolu do miofibrilli [18]. Morrison i wsp. stwierdzili, że w warunkach fizjologicznych u myszy pozbawionych α B-krystaliny i HspB2 morfologia i praca serca były prawidłowe. Natomiast po indukcji niedokrwienia obserwowano nieprawidłową kurczliwość serca, objawy apoptozy i nekrozy oraz znaczne obniżenie poziomu glutationu w kardiomiocytach [19].

Zaburzenia regulacji apoptozy, w której uczestniczą sHsps mogą wywołać transformację nowotworową. W wielu tkankach nowotworowych stwierdzono podwyższony poziom Hsp27 i innych białek opiekuńczych (Hsp70, Hsp90, Hsp60) [20]. Wyraźny wzrost ilości Hsp27 obserwowano, m.in. w raku piersi, jajnika, przelyku, wątrobowo-komórkowym, płuc (drobno- i niedrobnokomórkowym),

Tabela 1. Lokalizacja i funkcja sHsps człowieka.

NAZWA*	LOKALIZACJA	FUNKCJE		obecność w płytkach starszych [52]	Choroby wywołane przez mutacje w genie sHsps
		ochrona cytoszkieletu	inne		
HspB1/Hsp27	mięśnie, serce [18]	stabilizuje mikrofilamenty aktyny [10] i neurofilamenty [44], wiąże się do pasma I miofibrilli [18]	hamuje powstawanie amyloidu A β <i>in vitro</i> [50], śmierć komórek indukowaną poliQ [57] i apoptozę [14,15]	+	CMT i dziedziczna neuropatia ruchowa [44,47,48]
HspB2/MKBP (ang. <i>myotonic dystrophy kinase binding protein</i>)	mięśnie, serce [11]	chroni strukturę miofibrilli [11,18]	wiąże i aktywuje kinazę białek (ang. <i>myotonic dystrophy kinase</i> ; brak aktywnej kinazy wywołuje dystrofię miotoniczną) [66]	+	
HspB3	mięśnie, serce [11]	chroni strukturę miofibrilli [11]			
HspB4/ α A-krystalina	soczewka [21]		zapobieganie agregacji białek w soczewce oka [21]		zaćma [17,30]
HspB5/ α B-krystalina	soczewka, mięśnie, serce, śledziona [27]	stabilizuje mikrofilamenty aktyny [10], wiąże się do pasma I miofibrilli [18] stabilizuje filamenty pośrednie desminy [40,41]	hamuje apoptozę i agregację płytek krwi [13], opóźnia powstawanie agregatów A β [17], wiąże PrP ^{Sc} [60]	+	zaćma [31,32] desminopatia [37,39]
HspB6/Hsp20	mięśnie, serce [11]	stabilizuje mikrofilamenty aktyny [10], wiąże się do pasma I miofibrilli [18]	hamuje agregację płytek krwi [13]	+	
HspB7/cvHsp	serce, mięśnie szkieletowe, tkanka tłuszczowa [67]	wiąże α -filaminę (białko inicjujące polimeryzację aktyny) [67] oraz pasmo I miofibrilli [18]			
HspB8/H11/Hsp22	mięśnie, serce, łożysko, śledziona [68]		rozpuszcza fragment huntingtyny Htt43Q [55], hamuje agregację i toksyczność A β E22Q [53]	+	CMT [46] i dziedziczna neuropatia ruchowa [45]
HspB9	plemniki [69]		oddziałuje z łańcuchem lekkim dyneiny [69]		
HspB10/ODFP (ang. <i>outer dense fibers protein</i>)	plemniki [12]		składnik gęstych włókien zewnętrznych otaczających aksonemy w witce plemnika [12], wiąże lekki łańcuch kinezy [70]		

* Pogrubioną czcionką zaznaczono nazwy sHsps używane w tekście

podstawnokomórkowym skóry i niektórych nowotworach ośrodkowego układu nerwowego (glejaku wielopostaciowym, gwiaździaku, nerwiaku zarodkowym). Podwyższenie poziomu α B-krystaliny jest charakterystyczne dla raka jasnokomórkowego nerki i ośrodkowego układu nerwowego (szyszyniaka, nerwiaka osłonkowego, struniaka) [20]. W przypadku ostrej białaczki szpikowej i raka piersi, Hsp27 może być przyczyną oporności na chemioterapię [20]. Niektóre leki stosowane w terapii nowotworów, np. doksorubicyna i lowastatyna, indukują syntezę Hsp27, powodując w ten sposób dodatkowe obniżenie wrażliwości na leki [14]. Hsp27 (i inne Hsps) mogą chronić komórki nowotworowe, hamując apoptozę lub, jako białka opiekuńcze, renaturując polipeptydy uszkodzone czynnikami cytotoksycznymi stosowanymi w terapii. Obecność Hsp27 wykryto w komórkach śródbłonna, co sugeruje, że Hsp27 może również chronić łożysko naczyniowe guza nowotworowego. Wyniki te wskazują, że w niektórych przypadkach terapia antynowotworowa powinna być uzupełniona czynnikami obniżającymi poziom Hsp27. Takim czynnikiem w leczeniu raka płaskokomórkowego jamy ustnej może być interferon γ , który hamując syntezę Hsp27 powodował wzrost wrażliwości komórek nowotworowych na lek [17]. Inną strategią może być zastosowanie oligonukleotydów *antisens*. Wykazano, że użycie oligonukleotydu blokującego syntezę Hsp27 indukowało apoptozę komórek raka gruczołu krokowego [20].

α -KRYSTALINY – BIAŁKA OPIEKUŃCZE W SOCZEWCE OKA SSAKÓW

W soczewce oka ssaków obecne są dwa rodzaje sHsps: α A-krystaliny i α B-krystaliny, które wykazują 57% podobieństwo sekwencji aminokwasowej i stanowią aż 35% wszystkich białek w soczewce [21]. α A-krystalina występuje prawie wyłącznie w soczewce, natomiast α B-krystalina również w mięśniach szkieletowych, sercu i śledzionie. *In vitro* α A-krystaliny i α B-krystaliny mogą tworzyć zarówno homo- jak i heterooligomery, które różnią się właściwościami, np. wiązaniem do błony plazmatycznej [22], aktywnością opiekuńczą zależną od temperatury [23,24]. Masa oligomerów α -krystalin jest zmienna (300-1000 kDa, przy masie monomeru 20 kDa) i zależy od wielu czynników: stężenia białka, temperatury, pH i siły jonowej. Stopień oligomeryzacji i aktywność α -krystalin zmienia się wraz z wiekiem, co może mieć związek z licznymi modyfikacjami potranslacyjnymi tych białek: fosforylacją, utlenianiem, usuwaniem grup amidowych, glikacją (nieenzymatyczną glikozylacją) i skracaniem łańcucha polipeptydowego [19,25]. Pojawiające się wraz z wiekiem modyfikacje potranslacyjne mogą hamować aktywność α -krystalin, co prowadzi do agregacji białek strukturalnych soczewki β - i γ -krystalin, mętnienia soczewki i rozwoju zaćmy. Z drugiej strony wykazano, że α -krystaliny, które uległy glikacji wykazywały *in vitro* podwyższoną aktywność opiekuńczą w porównaniu z sHsps niemodyfikowanymi [17]. Być może, przynajmniej niektóre z modyfikacji potranslacyjnych mają na celu utrzymanie aktywności opiekuńczej α -krystalin w późnym wieku. Soczewka jest przezroczysta dzięki regularnemu ułożeniu, włóknistych, w przekroju heksagonalnych komórek, które są pozbawione jąder i organelli komórkowych. Stężenie białka (450 mg/ml, ok. 30% całkowitej masy soczewki) jest dwukrotnie wyższe niż w innych tkankach. Białka struktu-

ralne, głównie β - i γ -krystaliny, tworzą ściśle upakowane oligomery, co dodatkowo zmniejsza rozpraszanie światła [26]. Dojrzałe komórki soczewki są metabolicznie prawie nieaktywne, procesy degradacji i resyntezy białek (ang. *protein turnover*), a także wymiany białek pomiędzy komórkami nie zachodzą. W tych szczególnych warunkach działanie α A-krystaliny jako białka opiekuńczego jest niezwykle istotne dla utrzymania przezroczystości soczewki. Szereg doświadczeń *in vivo* i *in vitro* wykazało, że α -krystaliny zapobiegają agregacji białek strukturalnych soczewki [27,28]. U myszy pozbawionych genu *CRYAA*, kodującego α A-krystalinę, stwierdzono rozwój zaćmy, w soczewce obserwowano obecność ciał inkluzyjnych zawierających głównie α B- i γ -krystalinę [29]. W 1998 roku zidentyfikowano pierwszą mutację typu *missens* w genie *CRYAA* człowieka, kodującym α A-krystalinę, wywołującą dziedziczną zaćmę. Efektem mutacji była zamiana reszt aminokwasowych R116G w domenie α A-krystaliny białka [30]. W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że mutacja R116G czterokrotnie obniża aktywność opiekuńczą α -krystaliny, powoduje wzrost polidispersji oligomerów i hamuje wymianę podjednostek pomiędzy oligomerami α A-krystaliny niezmutowanej i R116G [22]. W ciągu następnych kilku lat wykryto kolejne mutacje w genie α -krystaliny, które są przyczyną dziedzicznej zaćmy: mutację typu *nonsense* W9X [21] i mutację *missens* R49C znajdującą się wyjątkowo poza domeną α -krystaliny zachowaną w ewolucji w białkach sHsps [17]. Stwierdzono, że w hodowli komórek nabłonka soczewki α A-krystalina R49C jest nieprawidłowo zlokalizowana w jądrze i w przeciwieństwie do niezmutowanego białka nie chroni komórek przed apoptozą indukowaną staurosporyną [17]. Zaćmę wywołują również mutacje w genie *CRYAB*, kodującym α B-krystalinę – jedna z nich powoduje przesunięcie ramki odczytu i produkcję białka z nieprawidłowym, 35 aminokwasowym końcem karboksylowym [31]. Wynikiem innej mutacji D140N, wywołującej zaćmę jest zmiana trzyczłonowej konformacji białka, co sprzyja tworzeniu większych oligomerów i powoduje utratę aktywności opiekuńczej α B-krystaliny [32]. Informacje dotyczące roli i mechanizmu działania α -krystalin w zapobieganiu agregacji białek umożliwiają opracowywanie leków zapobiegających zaćmie. Obiecujące wyniki uzyskano stosując pochodną pantotenianu – disiarczan panteteiny [disiarczan D-bis-(N-pantotenylo- β -aminoetylu), ang. *pantethine*]. Wykazano, że disiarczan panteteiny stymuluje *in vitro* aktywność α -krystalin [33] oraz hamuje indukowane selenianem mętnienie soczewek u szczurów. Niestety, badania kliniczne mające na celu sprawdzenie działania pochodnej pantotenianu u ludzi zostały przerwane w 2001 roku z powodu efektów ubocznych stosowania leku [34]. Inne doświadczenia wskazują, że leki przeciwbólowe: aspiryna, paracetamol i ibuprofen mogą zapobiegać zaćmie hamując modyfikacje potranslacyjne obniżające aktywność α -krystalin [35]. *In vitro* aspiryna i ibuprofen zapobiegają karbamylacji i wiązaniu cukrów do α -krystaliny. Ibuprofen również hamuje glikację α -krystaliny, dodatkowo produkty jego rozpadu prawdopodobnie wiążą się z resztą lizyny α -krystaliny co uniemożliwia dalsze modyfikacje białka. Acetylacja krystalin z udziałem acetylo-L-karnityny również może zapobiegać glikacji i inaktywacji białek [35].

α B-krystalina występuje w wielu innych narządach poza soczewką, jej inaktywacja wywołuje więc dodatkowe,

oprócz zaćmy, skutki. Zaskakujące, że po usunięcie genu *CRYAB*, kodującego α B-krystalinę u myszy nie stwierdzono rozwoju zaćmy, natomiast zwierzęta, prawidłowo rozwijające się tylko do ok. 40 tygodnia życia, traciły wagę i umierały [36]. W 1998 roku wykryto mutację R120G w genie *CRYAB* człowieka odpowiedzialną za zaćmę i rozwój desminopatii (DRM, ang. *desmin related myopathy*) [37]. Desmina należy do charakterystycznych dla mięśni filamentów pośrednich. W mięśniach prążkowanych filamente desminy tworzą połączenia pomiędzy miofibrilami, sarkolemmą i jądrem komórkowym [38]. Zarówno mutacje w genie desminy, które są główną przyczyną DRM, jak i mutacja R120G w α B-krystalinie powodują agregację filamentów desminy. W agregatach oprócz desminy i α B-krystaliny stwierdzono obecność innych filamentów pośrednich (nestyny i wimentyny) oraz ubikwityny i białka prekursorowego β -amyloidu (bAPP). Skutkiem agregacji desminy jest uszkodzenie sieci filamentów pośrednich i miofibryli. W przypadku wymienionych mutacji zmiany chorobowe ograniczone są najczęściej do mięśnia sercowego. Dwie kolejne mutacje, które wykryto powodują syntezę skróconych form α B-krystaliny Δ C13 i Δ C25 i wywołują desminopatię obejmującą mięśnie prążkowane [39]. Znaczenie mutacji R120G w rozwoju desminopatii potwierdziły doświadczenia *in vitro*. Wykazano, że α B-krystalina R120G tworzy nieregularne oligomery znacznie większe w porównaniu z niezmutowanym sHsp i wykazuje obniżoną aktywność opiekuńczą w reakcjach z modelowymi substratami [40]. Stwierdzono również, że α B-krystalina R120G wiąże *in vitro* kwaśne białko włóknikowe gleju GFAP (ang. *glial fibrillary acidic protein*) i powoduje agregację filamentów GFAP [41]. Zastanawiające jest, dlaczego efekt mutacji R120G nie jest widoczny we wszystkich tkankach, w których obecna jest α B-krystalina, a objawy desminopatii lub zaćmy pojawiają się dopiero w wieku dorosłym. Wytlumaczeniem może być częściowo zachowana aktywność α B-krystalina R120G, obecność oprócz α B-krystaliny R116G niezmutowanego białka u heterozygot oraz aktywność opiekuńcza innych sHsp obecnych w mięśniach [41]. Potwierdzają to, m. in. wyniki Ito i wsp. [42], którzy wykazali, że występujące w dużej ilości w mięśniach Hsp27, hamowało powstawanie ciał inkluzyjnych w komórkach HeLa, produkujących α B-krystalinę R120G. Wykazano również, że Hsp22 zapobiegało agregacji i umożliwiało zachowanie prawidłowej struktury oligomerów α B-krystaliny R120G [43].

ROLA sHsp W CHOROBAH NEURODEGENERACYJNYCH

W ciągu ostatnich dwóch lat zidentyfikowano kilka mutacji w genach Hsp27 i Hsp22, które odpowiadają za rozwój dziedzicznej neuropatii ruchowej lub jednej z najczęstszych dziedzicznych neuropatii ruchowo-czuciowych – choroby Charcota-Marie-Tootha (CMT) [44-48]. Większość mutacji znajduje się w domenie α -krystaliny i prawdopodobnie zapobiega prawidłowym oddziaływaniom sHsp z filamentami pośrednimi, co prowadzi do uszkodzenia cytoszkieletu neuronów [47].

Zmiana konformacji i agregacja białek, jest związana z wieloma chorobami neurodegeneracyjnymi [49]. W agregatach zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych często pojawia-

ją się sHsp. W przypadku choroby Alzheimera w mózgu powstają zewnątrzkomórkowe płytki starcze zawierające amyloid β ($A\beta$), którego prekursorem jest bAPP (ang. *amyloid β precursor protein*). Wewnątrz neuronów tworzą się sploty neurofibrylarne, głównie z hiperfosforylowanego białka tau. Prawdopodobnie w odpowiedzi na ich pojawienie się w komórce wzrasta poziom α B-krystaliny i Hsp27 [17]. Białka te obecne są również w agregatach amyloidu β , co może sugerować, że sHsp zapobiegają powstawaniu płytek starczych. Potwierdzają to doświadczenia *in vitro*, które wykazały, że Hsp27 hamuje agregację amyloidu β [50]. Stege i wsp. stwierdzili, że α B-krystaliny również opóźnia powstawanie włókien amyloidu β i jednocześnie powoduje wzrost neurotoksyczności [51]. Z danych tych wynika, że toksyczną formą są kompleksy sHsp-amyloid β , które nie tworzą włókien, a nadprodukcja sHsp nie zawsze może być korzystna dla komórki. Wilhelmus i wsp. wykazali obecność dodatkowych sHsp w płytkach starczych: Hsp20, HspB2 i Hsp22 [52]. Stwierdzono ponadto, że Hsp22 zapobiega śmierci komórek wywołanej obecnością zmutowanej formy amyloidu β (E22Q), występującej u pacjentów z dziedzicznym krwotokiem mózgowym z amyloidozą (odmiana holenderska, ang. *hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type – HCHWA-D*) [52,53]. Autorzy przypuszczają, że Hsp22 zapobiega tworzeniu arkuszy β w amyloidzie β (E22Q) ułatwiających agregację amyloidu. Hsp22 nie wykazuje podobnej aktywności w stosunku do amyloidu β .

Wewnątrzkomórkowe agregaty białek powstają w przypadku chorób poliglutaminowych, m. in. choroby Huntingtona. Przyczyną tych schorzeń jest zwielokrotnienie liczby powtórzeń kodonu CAG, kodującego glutaminę w genach odpowiednich białek [49]. Liczne badania przeprowadzone, m. in. na modelowych organizmach: drożdżach i *Caenorhabditis elegans* wykazały, że zależne od ATP systemy białek opiekuńczych Hsp70/ Hsp40 i Hsp100 zapobiegają agregacji nadprodukowanych peptydów poliQ [54,55]. Spośród badanych do tej pory sHsp człowieka, podobną funkcję pełni tylko Hsp22. W hodowlach komórek człowieka Hsp22 hamuje powstawanie agregatów Htt43Q – N-końcowej części huntingtyny z sekwencją 43 reszt glutaminy oraz AR65Q receptora androgenowego z 65 resztami glutaminy [56]. Autorzy sugerują, że Hsp22 utrzymuje Htt43Q w formie rozpuszczalnej, umożliwiającej szybką degradację peptydu przez proteasom. Wyttenbach i wsp. wykazali, że Hsp27 nie zapobiega agregacji poliQ, ale hamuje śmierć komórek indukowaną poliQ [57]. Wiadomo, że huntingtyna ze zwiększoną ilością reszt glutaminy powoduje podwyższenie reaktywnych form tlenu, które są przyczyną śmierci neuronów [58]. Ochronne działanie Hsp27 polegałoby na obniżaniu poziomu reaktywnych form tlenu i hamowaniu apoptozy. sHsp mogą działać podobnie w przypadku innych chorób neurodegeneracyjnych. Coraz więcej danych wskazuje, że za ich rozwój odpowiedzialny jest stres oksydacyjny i wzrost poziomu reaktywnych form tlenu. W istocie czarnej chorych na chorobę Parkinsona stwierdzono obniżenie poziomu zredukowanego glutationu, obecność produktów peroksydacji lipidów i 8-hydroksyguanozyny, która powstaje w wyniku oksydacyjnego uszkodzenia DNA [58]. W korze mózgowej u pacjentów z chorobą Parkinsona nadprodukowane są Hsp27 i α B-krystalina [59]. Wykazano, że α B-krystalina może zapobiegać agregacji białek, głów-

nie α -synukleiny, tworzących ciała Lewy'ego towarzyszące chorobie Parkinsona. Braak i wsp. wykazali, że w większości neuronów kresomózgowia, w których wykryto α B-kryształinę nie powstawały ciała Lewy'ego [60]. Natomiast w neuronach zawierających ciała Lewy'ego nie stwierdzono obecności α B-kryształiny.

Danych na temat potencjalnej roli sHsps w chorobach prionowych jest niewiele. Podwyższony poziom α B-kryształiny stwierdzono w neuronach u pacjentów z chorobą Creutzfeldta-Jakoba [17]. Sun i wsp. wykazali *in vivo* i *in vitro* oddziaływanie α B-kryształiny z komórkową izoformą białka prionu u krów PrP^C (ang. *cellular*). Autorzy sugerują, że sHsps mogą chronić PrP^C przed zmianą konformacji, która prowadzi do powstania patologicznej izoformy PrP^D (ang. *disease*), łatwo ulegającej agregacji i wywołującej pasażowalną encefalopatię gąbczastą [61]. Hsp27 i α B-kryształina pojawiają się również we włóknach Rosenthala – agregatach zawierających kwaśne białko włóknkowe gleju (GFAP). Włókna Rosenthala powstają w astrocytach uszkodzonej istoty białej mózgu u pacjentów z chorobą Alexandra. Przypuszcza się, że fizjologiczną funkcją sHsps w astrocytach jest kontrola organizacji filamentów pośrednich zbudowanych z kwaśnego białka włóknkowego gleju (GFAP) [62] oraz ochrona komórek w warunkach stresowych. Unieruchomione sHsps we włóknach Rosenthala hamowałyby antyapoptotyczną aktywność tych białek. Podobny efekt może powodować wiązanie Hsp27 i Hsp70 do zmutowanej dysmutazy ponadtlencowej (SOD1). Mutacje w genie kodującym dysmutazę ponadtlencową są przyczyną niektórych przypadków rodzinnej formy stwardnienia zanikowego bocznego, związanego ze zwyrodnieniem neuronów ruchowych [63]. α B-Kryształina również rozpoznaje i wiąże zmutowaną dysmutazę ponadtlencową [64]. Podwyższony poziom tego białka stwierdzono w astrocytach i oligodendrocytach u chorych na stwardnienie rozsiane, które jest chorobą o podłożu autoimmunologicznym [17]. α B-kryształina jest głównym autoantygenem osłonki mielinowej. Stwierdzono również, że miejsce promotora genu *CRYAB* charakteryzuje się polimorfizmem, a rodzaj allelu decyduje o przebiegu choroby [65].

PODSUMOWANIE

Badania ostatnich kilku lat dostarczają coraz więcej informacji o strukturze i złożonej roli sHsps w ochronie organizmów przed stresem. sHsps wiążą uszkodzone polipeptydy, zapobiegając ich nieodwracalnej denaturacji. Uwolnienie związanych substratów jest możliwe dzięki aktywności zależnych od ATP białek opiekuńczych. Jeżeli system białek opiekuńczych nie działa wydajnie uszkodzone polipeptydy ulegają nieodwracalnej agregacji. Tworzenie agregatów białkowych zawierających sHsps jest wspólną cechą wielu chorób neurodegeneracyjnych. Zaburzenie funkcji sHsps przez modyfikacje potranslacyjne lub mutacje może prowadzić do rozwoju zaćmy, miopatii lub neuropatii. Z jednej strony sHsps chronią komórkę przed niedokrwieniem, skutkami szoku oksydacyjnego i apoptozą. Z drugiej strony, niekorzystnym skutkiem indukowanej przez stres nadprodukcji sHsps jest hamowanie apoptozy, ułatwiające transformację nowotworową. Mimo, że procesy te nie są jeszcze w pełni poznane, możliwe jest opracowywanie metod diagnostycznych i strategii terapeutycznych, których celem są sHsps.

PIŚMIENNICTWO

1. Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular function and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62: 670-684
2. Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurter D, Buchner J (2005) Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nature Struct Mol Biol* 12: 842-846
3. Kędzierska S (2005) Rola białek opiekuńczych *Escherichia coli* w ochronie komórki bakteryjnej przed nieodwracalną agregacją białek indukowaną termicznie. *Postepy Biochem* 51: 146-153
4. Matuszewska M, Kuczyńska-Wiśnik D, Laskowska E, Liberek K (2005) The small heat shock protein IbpA of *E. coli* cooperates with IbpB in stabilization of thermally aggregated proteins in a disaggregation competent state. *J Biol Chem* 280: 12292-12298
5. Kuczyńska-Wiśnik D, Kędzierska S, Matuszewska E, Lund P, Taylor A, Lipińska B, Laskowska E (2002) The *Escherichia coli* small heat-shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured *in vivo* during extreme heat shock. *Microbiology* 148: 1757-1765
6. Narberhaus F (2002) α -Crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone Network. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 64-93
7. Kim KK, Kim R, Kim SH (1998) Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* 394: 595-599
8. van Montfort RLM, Basha E, Friedrich KL, Slingsby C, Vierling E (2001) Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nature Struct Biol* 8: 1025-1030
9. Kappé G, Franck E, Verschuure P, Boelens WC, Leunissen JAM, de Jong WW (2003) The human genome encodes 10 α -crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10. *Cell Stress Chaperones* 8: 53-61
10. Mounier N, Arrigo A-P (2002) Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones* 7: 167-176
11. Sugiyama Y, Suzuki A, Kishikawa M, Akutsu R, Hirose T, Waye MMY, Tsui SKW, Yoshidai S, Ohno S (2000) Muscle develops a specific form of small heat shock protein complex composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during myogenic differentiation. *J Biol Chem* 275: 1095-1104
12. Fontaine J-M, Rest JS, Welsh MJ, Benndorf R (2003) The sperm outer dense fiber protein is the 10th member of the superfamily of mammalian small stress proteins. *Cell Stress Chaperones* 8: 62-69
13. Kozawa O, Matsuno H, Niwa M, Hatakeyama D, Kato K, Uematsul T (2001) α -crystallin, a low-molecular-weight heat shock protein, acts as a regulator of platelet function. *Cell Stress Chaperones* 6: 21-28
14. Concannon CG, Gorman AM, Samali A (2003) On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 8: 61-70
15. Arrigo AP (1998) Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biol Chem* 379: 19-26
16. Merendino AM, Paul C, Vignola AM, Costa AM, Melis M, Chiappara G, Izzo V, Bousquet J, Arrigo A-P (2002) Heat shock protein-27 protects human bronchial epithelial cells against oxidative stress-mediated apoptosis: possible implication in asthma. *Cell Stress Chaperones* 7: 269-280
17. Sun Y, MacRae TM (2005) The small heat shock proteins and their role in human disease. *FEBS J* 272: 2613-2627.
18. Golenhofen N, Perng MD, Quinlan RA, Drenckhahn D (2004) Comparison of the small heat shock proteins α B-crystallin, MKBP, HSP25, HSP20, and α HSP in heart and skeletal muscle. *Histochem Cell Biol* 122: 415-25
19. Morrison LE, Whittaker RJ, Klepper RE, Wawrousek EF, Glembotski CC (2004) Roles for α B-crystallin and HspB2 in protecting the myocardium from ischemia-reperfusion-induced damage in a KO mouse model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H847-H855
20. Ciocca AR, Calderwood SK (2005) Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10: 86-103
21. Horwitz J (2003) Alfa-crystallin. *Exp Eye Res* 76: 145-153

22. Cobb BA, Petrash JM (2000). Characterization of alpha-crystallin-plasma membrane binding. *J Biol Chem* 275: 6664-6672
23. Rajaraman K, Raman B, Ramakrishna T, Mohan Rao Ch (2001). Interaction of human recombinant α A- and α B-crystallins with early and late unfolding intermediates of citrate synthase on its thermal denaturation. *FEBS Lett* 497: 118-123
24. Reddy GB, Das KP, Petrash JM, Surewicz WK (2000) Temperature-dependent chaperone activity and structural properties of human α A- and α B-crystallins. *J Biol Chem* 275: 4565-4570
25. Hoehenwarter W, Klose J, Jungblut PR (2006) Eye lens proteomics. *Amino Acids* 30: 369-389
26. Francis PJ, Berry V, Moore AT, Bhattacharya S (1999) Lens biology. Development and human cataractogenesis. *Trends Genet* 15: 191-196
27. Horwitz J (1992) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10449-10453
28. Pigaga V, Quinlan RA (2006) Lenticular chaperones suppress the aggregation of the cataract-causing mutant T5P γ C-crystallin. *Exp Cell Res* 312: 51-62
29. Brady JP, Garland D, Douglas-Tabor Y, Robinson G Jr, Groome A, Wawrousek EF (1997) Targeted disruption of the mouse α A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein α B-crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 884-889
30. Litt M, Kramer P, LaMorticella DM, Murphey W, Lovrien EW, Weleber RG (1998) Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human α A-crystallin gene *CRYAA*. *Hum Mol Genet* 7: 471-474
31. Berry V, Francis P, Reddy MA, Collyer D, Vithana E, MacKay I, Dawson G, Carey AH, Moore A, Bhattacharya SS, Quinlan RA (2001) α A-crystallin gene (*CRYAA*) mutation causes dominant congenital posterior polar cataract in humans. *Am J Hum Genet* 69: 1141-1145
32. Liu Y, Zhang X, Luo L, Wu M, Zeng R, Cheng G, Hu B, Liu B, Liang JJ, Shang F (2006) A novel α B-crystallin mutation associated with autosomal dominant congenital lamellar cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 1069-75
33. Clark JJ, Muchowski PJ (2000) Small heat-shock proteins and their potential role in human disease. *Curr Opin Struct Biol* 10: 52-59
34. Harding JJ (2001) Can drugs or micronutrients prevent cataract? *Drugs Aging* 18: 473-486
35. Crabbe MJC, Hepburne-Scott HW (2001) Small heat shock proteins (sHsp) as potential drug targets. *Curr Pharm Biotechnol* 2: 77-111
36. Brady JP, Garland D, Green DE, Tamm ER, Giblin FJ, Wawrousek EF (2001) α B-crystallin in lens development and muscle integrity: a gene knockout approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 2924-2934
37. Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost M-C, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tomé F, Dupret J-M, Paulin D, Fardeau M (1998) A missense mutation in the α B-crystallin gene causing a desmin-related myopathy. *Nature Genet* 20: 92-95
38. Kumarapeli ARK, Wang X (2004) Genetic modification of the heart: chaperones and the cytoskeleton. *J Mol Cell Cardiol* 37: 1097-1109
39. Selcen D, Engel AG (2003) Myofibrillar myopathy caused by novel dominant negative α B-crystallin mutations. *Ann Neurol* 54: 804-810
40. Bova MP, Yaron O, Huang Q, Ding L, Haley DA, Stewart PL, Horwitz J (1999) Mutation R120G in α B-crystallin, which is linked to a desmin-related myopathy, results in an irregular structure and defective chaperone-like function. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6137-6142
41. Perng MD, Muchowski PJ, van den Ijssel P, Wu JSG, Hutcheson AM, Clark JJ, Quinlan RA (1999) The cardiomyopathy and lens cataract mutation in α B-crystallin alters its protein structure, chaperone activity and interaction with intermediate filaments *in vitro*. *J Biol Chem* 274: 33235-33243
42. Ito H, Kamei K, Iwamoto I, Inaguma Y, Tsuzuki M, Kishikawa M, Shimada A, Hosokawa M, Kato K (2003) Hsp27 suppresses the formation of inclusion bodies induced by expression of R120G α -crystallin, a cause of desmin-related myopathy. *Cell Mol Life Sci* 60: 1217-1223
43. Chávez-Zobel AT, Lorangel A, Marceau N, Thériault JR, Lambert H, Landry J (2003) Distinct chaperone mechanisms can delay formation of aggresomes by the myopathy-causing R120G α B-crystallin mutant. *Hum Mol Genet* 12: 1609-1620
44. Evgrafov OV, Mersyanova I, Irobi J, Van Den Bosch L, Dierick I, Leung CL, Schagina O, Verpoorten N, Van Impe K, Fedotov V, Dadali E, Auer-Grumbach M, Windpassinger C, Wagner K, Mitrovic Z, Hilton-Jones D, Talbot K, Martin J-J, Vasserman N, Tverskaya S, Polyakov A, Liem RKH, Gettemans J, Robberecht W, De Jonghe P, Timmerman V (2004) Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat Genet* 36: 602-606
45. Irobi J, Van Impe K, Seeman P, Jordanova A, Dierick I, Verpoorten N, Michalik A, De Vriendt E, Jacobs A, Van Gerwen V, Vennekens K, Mazanec R, Tournev I, Hilton-Jones D, Talbot K, Kremensky I, Van Den Bosch L, Robberecht W, Vandekerckhove J, Van Broeckhoven C, Gettemans J, De Jonghe P, Timmerman V (2004) Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nat Genet* 36: 597-601
46. Tang B-S, Zhao G-H, Luo W, Xia K, Cai F, Pan Q, Zhang R-X, Zhang F-F, Liu X-M, Chen B, Zhang C, Shen L, Jiang H, Long Z-G, Dai H-P (2005) Small heat-shock protein 22 mutated in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2L. *Hum Genet* 116: 222-224
47. Kijima K, Numakura C, Goto T, Takahashi T, Otagiri T, Umetsu K, Hayasaka K (2005) Small heat shock protein 27 mutation in a Japanese patient with distal hereditary motor neuropathy. *J Hum Genet* 50: 473-476
48. Tang B, Liu X, Zhao G, Luo W, Xia K, Pan Q, Cai F, Hu Z, Zhang C, Chen B, Zhang F, Shen L, Zhang R, Jiang H (2005) Mutation analysis of the small heat shock protein 27 gene in Chinese patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *Arch Neurol* 61: 1201-1207
49. Bąk D, Milewski M (2005) Choroby związane z agregacją białek. *Postępy Biochem* 51: 297-307
50. Kudva YC, Hiddinga HJ, Butler PC, Mueske CS, Eberhardt NL (1997) Small heat shock proteins inhibit *in vitro* $\text{A}\beta_{1-42}$ amyloidogenesis. *FEBS Lett* 416: 117-121
51. Stege GJJ, Renkawek K, Overkamp PSG, Verschuure P, van Rijk AF, Reijnen-Aalbers A, Boelens WC, Bosman GJCGM, de Jong WW (1999) The molecular chaperone α B-crystallin enhances amyloid β neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 152-156
52. Wilhelmus MMM, Boelens WC, Otte-Höller I, Kamps B, Kusters B, Maat-Schieman MLC, de Wall RMW, Verbeek MM (2006) Small heat shock protein HspB8: its distribution in Alzheimer's disease brains and its inhibition of amyloid- β protein aggregation and cerebrovascular amyloid- β toxicity. *Acta Neuropathol* 111: 139-149
53. Bornebroek M, Haan J, Maat-Schieman ML, Van Duinen SG, Roos RA (1996) Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type (HCHWA-D): I—A review of clinical, radiologic and genetic aspects. *Brain Pathol* 6: 111-114
54. Nollen EAA, Garcia SM, van Haften G, Kim S, Chavez A, Morimoto RI, Plasterk RHA (2004) Genome-wide RNA interference screen identifies previously undescribed regulators of polyglutamine aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6403-6408
55. Leźnicki P (2005) Agregacja a toksyczność białek z powtórzeniami polyQ. *Postępy Biochem* 51: 215-222
56. Carra S, Sivilotti M, Chavez Zobel AT, Lambert H, Landry J (2005) HspB8, a small heat shock protein mutated in human neuromuscular disorders, has *in vivo* chaperone activity in cultured cells. *Hum Mol Genet* 14: 1659-1669
57. Wyttenbach A, Sauvageot O, Carmichael J, Diaz-Latoud C, Arrigo AP, Rubinsztein DC (2002) Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Hum Mol Genet* 11: 1137-1151
58. Pong K (2003) Oxidative stress in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for superoxide dismutase mimetics. *Expert Opin Biol Ther* 3: 127-139
59. Renkawek K, Stege GJ, Bosman GJ (1999) Dementia, gliosis and expression of the small heat shock proteins Hsp27 i α B-crystallin in Parkinson's disease. *Neuroreport* 10: 2273-2276

60. Braak H, Del Tredici K, Sandmann-Kiel D, Rub U, Schultz C (2001) Nerve cells expressing heat-shock proteins in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 102: 449-54
61. Sun G, Guo M, Shen A, Mei F, Peng X, Gong R, Guo D, Wu J, Tien P, Xiao G (2005) Bovine PrP^C directly interacts with alphaB-crystalline. *FEBS Lett* 579: 5419-5124
62. Mignot C, Boespflug-Tanguy O, Gelot A, Dautigny A, Pham-Dinh D, Rodriguez G (2004) Alexander disease: putative mechanisms of an astrocytic encephalopathy. *Cell Mol Life Sci* 61: 369-385
63. Okado - Matsumoto A, Fridovich I (2002) Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9010-9014
64. Shinder GA, Lacourse MC, Minotti S, Durham HD (2001) Mutant Cu/Zn-superoxide dismutase proteins have altered solubility and interact with heat shock/stress proteins in models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 276: 12791-12796
65. van Veen T, van Winsen L, Crusius JB, Kalkers NF, Barkhof F, Pena AS, Polman CH, Uitdehaag BM (2003) α B-crystallin genotype has impact on the multiple sclerosis phenotype. *Neurology* 61: 1245-1249
66. Suzuki A, Sugiyama Y, Hayashi Y, Nyu-i M, Yoshida M, Nanaka I, Ishiura S, Arahata K, Ohno S (1998) MKBP, a novel member of the small heat shock protein family, binds and activates the myotonic dystrophy protein kinase. *J Cell Biol* 140: 1113-1124
67. Krief S, Faivre JF, Robert P, Le Douarin B, Brument-Larignon N, Le-frere I, Bouzyk MM, Anderson KM, Greller LD, Tobin FL, Souchet M, Bril A (1999) Identification and characterization of cvHsp. A novel human small stress protein selectively expressed in cardiovascular and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem* 274: 36592-36600
68. Chowdary TK, Raman B, Ramakrishna T, Rao CM (2004) Mammalian Hsp22 is a heat-inducible small heat-shock protein with chaperone-like activity. *Biochem J* 381: 379-387
69. de Wit NJ, Verschuure P, Kappe G, King SM, de Jong WW, van Muijen GN, Boelens WC (2004) Testis-specific human small heat shock protein HSPB9 is a cancer/testis antigen, and potentially interacts with the dynein subunit TCTEL1. *Eur J Cell Biol* 83: 337-345
70. Bhullar B, Zhang Y, Junco A, Oko R, van der Hoorn FA (2003) Association of kinesin light chain with outer dense fibers in a microtubule-independent fashion. *J Biol Chem* 278: 16159-16168

Small heat shock proteins - role in apoptosis, cancerogenesis and diseases associated with protein aggregation

Ewa Laskowska 

Department of Biochemistry, University of Gdańsk, 24 Kładki St., 80-952 Gdańsk, Poland
 e-mail: lasko@biotech.univ.gda.pl

Key words: α -crystallin, molecular chaperones, neurodegenerative diseases, protein aggregation, small heat shock proteins

ABSTRACT

Small heat shock proteins (sHsps) belong to molecular chaperones, which protect prokaryotic and eukaryotic cells against deleterious effects of stress. sHsps prevent stress induced, irreversible aggregation of damaged proteins and facilitate renaturation of bound substrates cooperating with other molecular chaperones. This review summarizes recent studies focused mainly on the involvement of sHsps in diseases related to protein aggregation. sHsps are often a component of protein aggregates forming during progress of neurodegenerative disorders. Mutation in sHsps genes have been identified, which are responsible for development of cataract, desmin related myopathy and neuropathies. sHsps protect cells against oxidative stress resulting from ischemia/reperfusion during heart or brain stroke. Several studies indicate that sHsp participate in regulation of apoptosis and are involved in cancerogenesis. Uncovering the sHsps role in diseases enable to develop new therapeutic strategies.

Charakterystyka białek z rodziny HtrA

STRESZCZENIE

Białka HtrA tworzą rodzinę zachowanych w ewolucji proteaz serynowych, będących homologami białka HtrA z modelowej bakterii *Escherichia coli*. Są szeroko rozpowszechnione zarówno wśród organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych. Stanowią linię obrony komórek bakteryjnych przed skutkami stresów powodujących uszkodzenia struktury białek, np. stresu termicznego i oksydacyjnego. Dotychczas zidentyfikowano cztery homologi HtrA człowieka, które uczestniczą nie tylko w odpowiedzi na stres, ale też w regulacji wzrostu i różnicowania komórek oraz indukcji apoptozy, a zaburzenia w ich prawidłowym działaniu mogą prowadzić do rozwoju procesu nowotworowego i chorób artretycznych oraz neurodegeneracyjnych. Niniejszy artykuł przeglądowy podsumowuje dotychczasową wiedzę na temat białek z rodziny HtrA, ich struktury, regulacji i funkcji, ze szczególnym uwzględnieniem białek człowieka. Przedstawia również praktyczne zastosowanie badań nad białkami z rodziny HtrA oraz perspektywy ich wykorzystania w przyszłości.

WPROWADZENIE

Na poziomie molekularnym odpowiedź komórki na stres wiąże się z indukcją syntezy białek należących do rodziny białek szoku termicznego (hsp, ang. *heat shock proteins*). Do białek hsp zalicza się białka opiekuńcze oraz proteazy. Pierwsze z nich uczestniczą w prawidłowym zwijaniu białek nowosyntetyzowanych i refaldowaniu białek nieprawidłowo zwiniętych, drugie degradują białka nieodwracalnie uszkodzone, zapobiegając tworzeniu w komórce toksycznych agregatów i dostarczając aminokwasów dla syntezy białek *de novo*.

Białko HtrA, zidentyfikowane po raz pierwszy u gramujemnej bakterii *Escherichia coli*, należy do grupy proteaz szoku termicznego. HtrA *E. coli* jest proteazą serynową, zlokalizowaną w przestrzeni periplazmatycznej, gdzie uczestniczy w degradacji nieodwracalnie uszkodzonych białek pojawiających się na skutek działania czynników stresowych, takich jak temperatura podwyższona ponad wartość fizjologiczną, zmiana pH, obecność czynników utleniających czy redukujących. Istnieją prace sugerujące, iż obok aktywności proteolitycznej HtrA wykazuje właściwości opiekuńcze. Zaproponowano hipotezę, że w niskich temperaturach aktywność proteolityczna HtrA zostaje zastąpiona przez aktywność opiekuńczą wobec białek nieprawidłowo zwiniętych [1].

Do tej pory zidentyfikowano około 180 homologów białka HtrA *E. coli*, zarówno wśród organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych, począwszy od proteobakterii, poprzez cyjanobakterie, drożdże, rośliny, aż po ssaki. Białka HtrA tworzą rodzinę zachowanych w ewolucji białek będących, poza nielicznymi wyjątkami, endoproteazami serynowymi o aktywności niezależnej od ATP. Należą do subklanu proteaz PA(S) i stanowią część rodziny S1. Charakterystyczną cechą struktury białek HtrA jest obecność zachowanej w ewolucji domeny proteazowej z triadą katalityczną reszt aminokwasowych His-Asp-Ser i przynajmniej jednej domeny PDZ na końcu karboksylowym (Ryc. 1). Komórkowa lokalizacja białek HtrA związana jest z przedziałami pozacytoplazmatycznymi, takimi jak periplazma bakterii gramujemnych czy błona komórkowa bakterii gramodatnich. W komórkach eukariotycznych homologiczne białka HtrA zlokalizowane są w siateczce śródplazmatycznej, mitochondriach i chloroplastach, bądź podlegają wydzielaniu [2].

Bakterie pozbawione funkcjonalnego białka HtrA charakteryzują się termowrażliwością oraz obniżoną odpornością na stres, między innymi termiczny i oksydacyjny. W przypadku bakterii patogennych obserwuje się obniżoną zdolność szczepów *htrA*⁻ do przeżywania w makrofagach i tkankach zwierzęcych. Powyższe fakty skłoniły do wykorzystania atenuowanych szczepów bakterii pozbawionych genu *htrA* w konstrukcji szczepionek [1,3].

Dorota Żurawa-Janicka[✉]

Joanna Narkiewicz

Barbara Lipińska

Katedra Biochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet Gdański, Gdańsk

[✉]Katedra Biochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; e-mail: zurawa@biotech.univ.gda.pl, tel.: (058) 523 63 85

Artykuł otrzymano 12 maja 2006 r.

Artykuł zaakceptowano 15 września 2006 r.

Słowa kluczowe: białka szoku termicznego, białko HtrA *Escherichia coli*, białka HtrA człowieka, proteazy serynowe

Wykaz skrótów: BSA (ang. *bovine serum albumin*) – albumina surowicy bydłowej; *E. coli* – *Escherichia coli*; HumHtrA – białko HtrA człowieka; IAP (ang. *inhibitor of apoptosis proteins*) – białka inhibitorowe apoptozy; IL (ang. *interleukin*) – interleukina; MBP (ang. *maltose binding protein*) – białko wiążące maltozę; PDZ (ang. *PSD95, Dlg, ZO1*) – domena występująca m. in. w białkach PSD95, Dlg, ZO1; TNF (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu

Podziękowania: Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego KBN 1074/P04/2004/26 oraz została dofinansowana ze środków Badań Własnych UG 1460-5-0348-6

Dotychczas zidentyfikowano u człowieka cztery homologi białka HtrA *E. coli*, które pełnią istotne funkcje nie tylko w odpowiedzi na stres, ale również w regulacji wzrostu i różnicowania komórek, w procesach związanych z indukcją apoptozy, a zaburzenia ich funkcji wydają się przyczyniać do rozwoju chorób nowotworowych, artretycznych i neurodegeneracyjnych [1].

CHARAKTERYSTYKA BIAŁKA HtrA BAKTERII *ESCHERICHIA COLI*

Gen *htrA* (ang. *high temperature requirement A*) gramujemnej bakterii *Escherichia coli* został zidentyfikowany jako niezbędny dla wzrostu w temperaturze powyżej 42°C [4]. Równoległe gen ten został zidentyfikowany jako zaangażowany w degradację białek periplazmatycznych i nazwany *degP* (ang. *degradation of extracellular proteins*) [5].

Gen *htrA* jest zlokalizowany w ok. 3.7 minucie chromosomu *Escherichia coli*. Bezpośrednim produktem genu jest białko prekursorowe o masie cząsteczkowej 51 kDa, ulegające modyfikacji potranslacyjnej, polegającej na usunięciu peptydu sygnałowego obejmującego 26 reszt aminokwasowych z końca aminowego. Dojrzałe białko HtrA, zbudowane z 448 reszt aminokwasowych, zlokalizowane jest w przestrzeni periplazmatycznej i jest białkiem peryferyjnym błony wewnętrznej. Składa się z domeny proteolitycznej z triadą katalityczną His₁₀₅, Asp₁₃₅ i Ser₂₁₀, charakterystyczną dla proteaz serynowych, oraz dwóch domen PDZ na końcu karboksylowym, które uczestniczą w oddziaływaniach białko-białko [6,7,8].

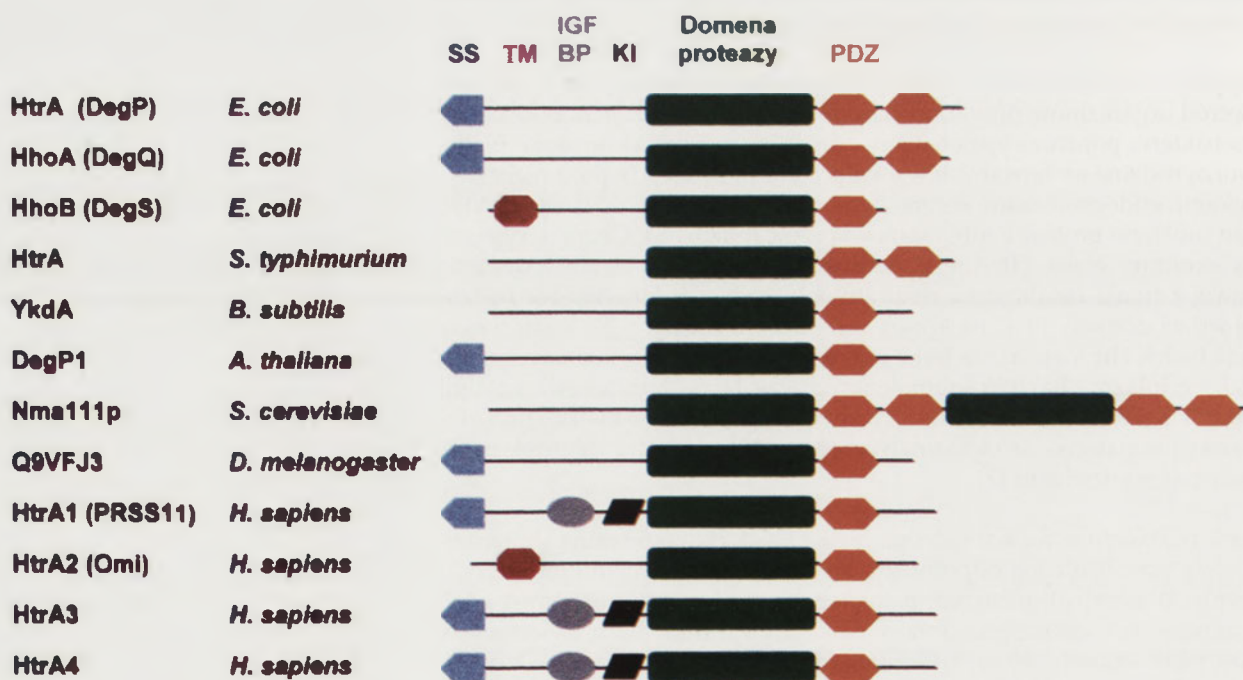
CHARAKTERYSTYKA AKTYWNOŚCI PROTEOLITYCZNEJ PROTEAZY HtrA

Białko HtrA wykazuje aktywność endopeptydazy serynowej, której aktywność nie zależy od obecności ATP oraz jonów dwuwartościowych (Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺) [9].

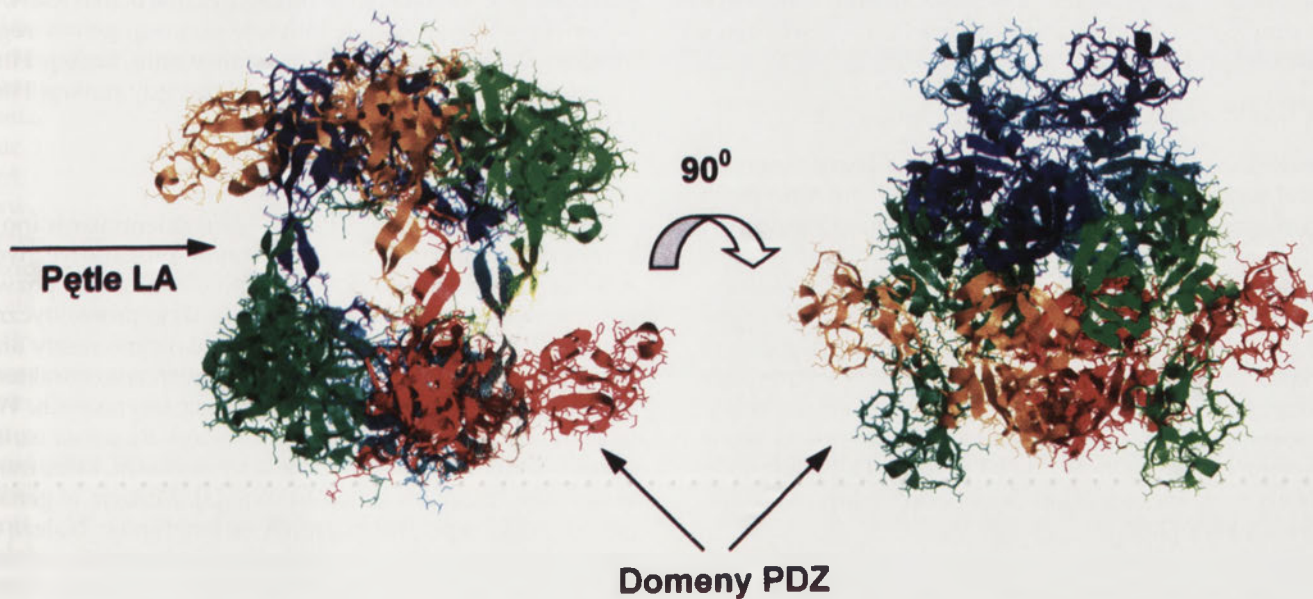
Wśród substratów HtrA znajdują się białka zdenaturowane termicznie, takie jak syntaza cytrynianowa, dehydrogenaza malonianowa; białka periplazmatyczne błędnie zwinięte, takie jak MBP, PhoA i MalS; białka hybrydowe i zrekombinowane o nieprawidłowej lokalizacji komórkowej, między innymi Tref i OmpF [1]. Co więcej, HtrA nie degraduje białek MalS, BSA i insuliny będących w natywnej konformacji [1].

Dotychczas poznano jedynie dwa białka, które w formie natywnej stanowią fizjologiczne substraty dla proteazy HtrA *E. coli*. Pierwszym białkiem jest acylowany prekursor białka lizy kolicyny A (pCal^m), lipoproteiny, która uczestniczy w wydzielaniu kolicyny A przez komórki *E. coli* niosące plazmid ColA [10]. Drugim jest białko CpxP, będące elementem systemu regulującego transkrypcję genów związanych z odpowiedzią na stres w obrębie otoczki komórkowej [11].

Główną fizjologiczną funkcją HtrA jest degradacja nieprawidłowych białek pojawiających się w obrębie otoczki komórkowej w odpowiedzi na różne warunki stresowe. Wykazano, że proteaza HtrA jest odpowiedzialna za usuwanie termicznie zdenaturowanych białek komórkowych [12]. Ponadto, w badaniach *in vitro* stwierdzono, że wraz ze wzrostem temperatury aktywność proteolityczna HtrA rośnie i osiąga maksymalną wartość w przedziale 50-55°C, co koreluje z częściowym rozluźnieniem struktury przestrzennej proteazy [8].



Rycina 1. Domeny strukturalne białek z rodziny HtrA. SS – sekwencja sygnałowa; TM – domena transbłonowa; IGF BP – domena wiążąca insulinowe czynniki wzrostu; KI – domena inhibitorowa typu Kazal; PDZ – domena uczestnicząca w oddziaływaniach białko-białko.



Rycina 2. Model budowy przestrzennej białka HtrA *Escherichia coli* na podstawie struktury krystalicznej [17]. Domeny proteolityczne trimerów tworzą podstawy wewnętrznej komory, w której zlokalizowane są miejsca aktywne proteazy. W asocjacji trimerów uczestniczą pętle LA tworzące filary wokół komory. Domeny PDZ są wyeksponowane na zewnątrz struktury i stanowią jej ruchome elementy. Rysunek przedstawia strukturę heksameryczną HtrA w konformacji „otwartej”, w której domeny PDZ nie blokują dostępu do wewnętrznej komory. Poszczególne monomery oznaczono odmiennymi kolorami. Rysunek został wykonany w oparciu o dane zawarte w pliku pdb1K9Y dostępnym w bazie danych NCBI (www.ncbi.nih.gov) z wykorzystaniem programu RasTop.

HtrA uczestniczy także w ochronie komórki przed skutkami stresu oksydacyjnego indukowanego jonami Fe(II). W obecności jonów Fe(II) komórki pozbawione funkcjonalnego białka HtrA wykazują zahamowany wzrost, a poziom utlenienia białek błonowych w komórkach *htrA* jest wyższy w porównaniu ze szczepem dzikim [13], co wskazuje na udział HtrA w degradacji oksydacyjnie uszkodzonych białek otoczki komórkowej.

AKTYWNOŚĆ OPIEKUŃCZA BIAŁKA HtrA

Uważa się, że białko HtrA *E. coli* obok aktywności proteolitycznej wykazuje aktywność opiekuńczą wobec białek błędnie zwiniętych. Po raz pierwszy funkcja opiekuńcza HtrA została wykazana dla periplazmatycznego białka MalS, będącego elementem regulonu maltozowego *E. coli*. Stwierdzono, że HtrA uczestniczy w procesie prawidłowego fałdowania MalS w temperaturach poniżej 28°C, podczas gdy w podwyższonej temperaturze aktywne proteolitycznie białko HtrA degraduje błędnie zwinięte MalS [14]. Wykazano również, że aktywność proteolityczna HtrA nie wpływa na właściwości opiekuńcze tego białka. Nieaktywne proteolitycznie HtrA (HtrA₅₂₁₀) wykazuje aktywność opiekuńczą wobec błędnie zwiniętego MalS [14] oraz białka błony wewnętrznej OmpC [15]. Ponadto nadprodukcja HtrA₅₂₁₀ znosi termowrażliwy fenotyp mutantów pozbawionych periplazmatycznego białka opiekuńczego SurA [16]. Na podstawie powyższych faktów wysunięto hipotezę o istnieniu mechanizmu, który w zależności od temperatury umożliwi przełączanie aktywności proteolitycznej na opiekuńczą [14-17].

STRUKTURA PRZESTRZENNA HtrA A REGULACJA AKTYWNOŚCI BIAŁKA

Poznanie struktury krystalicznej HtrA *E. coli* przyczyniło się do pełniejszego zrozumienia mechanizmu działania proteazy. HtrA może tworzyć w komórce w warunkach

fizjologicznych struktury oligomeryczne, od trimerów po dodekamery [18]. Podstawową funkcjonalną strukturą oligomeryczną HtrA jest heksamer, utworzony przez asocjację dwóch trimerów [17] (Ryc. 2). Struktura trimeryczna o kształcie przypominającym lejek (ang. 'funnel-like shape') jest stabilizowana przez oddziaływania reszt aminokwasowych domen proteolitycznych monomerów, natomiast domeny PDZ stanowią jej elementy ruchome, wyeksponowane na zewnątrz struktury. Dwa trimery są połączone głównie dzięki pętlom LA, zlokalizowanym w częściach aminowych polipeptydów HtrA. Pętle LA przeciwnych trimerów pierścieni są owinięte wokół siebie tworząc filary wokół wewnętrznej komory, w której zlokalizowane są centra aktywne. Dodatkowo struktura heksameryczna stabilizowana jest dzięki oddziaływaniu domen PDZ należących do naprzeciwległych monomerów (Ryc. 2). Ze względu na fakt, iż HtrA nie wykorzystuje ATP podczas wiązania i uwalniania substratów uważa się, że rola domen PDZ jest w tym procesie kluczowa. W zaproponowanym modelu działania HtrA domeny PDZ rozpoznają substraty, a dzięki swej ruchliwości wyłapują je i translokują do centrów aktywnych [17].

Poznanie struktury krystalicznej HtrA zaowocowało zaproponowaniem modelu, w którym w zależności od temperatury aktywność proteolityczna może ulegać przełączeniu na opiekuńczą. Każda z pętli LA trimerycznego pierścienia zwrócona jest w kierunku miejsca aktywnego monomeru należącego do naprzeciwległego pierścienia. Co więcej, oddziałuje z pętlami L1 i L2 tego monomeru. Utworzona w ten sposób triada L1-L2-LA* ((*) oznacza pętlę należącą do monomeru naprzeciwległego pierścienia) całkowicie blokuje dostęp do centrum aktywnego. Uważa się, że w niskich temperaturach, gdy HtrA wykazuje aktywność opiekuńczą, domena proteazowa przybiera konformację nieaktywną, która wyklucza możliwość wiązania substratu i katalizę.

Podwyższenie temperatury powoduje zmiany konformacyjne prowadzące do rozpadu triady L1-L2-LA* i włączenia aktywności proteolitycznej [1,17].

REGULACJA EKSPRESJI GENU *htrA* *Escherichia coli*

Podwyższony poziom syntezy białka HtrA obserwuje się w warunkach stresu termicznego [6], oksydacyjnego indukowanego jonami Fe(II) [13], w obecności czynników redukujących [19], po podwyższeniu pH ponad wartość fizjologiczną, w efekcie zaburzeń w składzie fosfolipidów błonowych [20], oraz w komórkach zawierających mutacje w genach *dsbA*, *dsbC*, *trxB* (geny te zaangażowane są w tworzenie mostków disiarczkowych, a więc w formowanie struktury trzyczłonowej białek) [21]. Sygnałem do indukcji ekspresji genu *htrA* jest także nadprodukcja białek błony zewnętrznej *OmpC*, *OmpF*, *OmpT* i *OmpX* [22], lipoproteiny błony zewnętrznej, *NlpE* oraz lipoproteiny błony wewnętrznej, *YafY* [23].

Podsumowując, wzmożona ekspresja genu *htrA* jest efektem pojawienia się w obrębie przestrzeni periplazmatycznej i błon otoczki komórkowej białek o nieprawidłowej konformacji, a więc zdenaturowanych termicznie, uszkodzonych oksydacyjnie, nieprawidłowo zwiniętych. Regulacja poziomu HtrA odbywa się na poziomie transkrypcji i zachodzi z udziałem czynnika transkrypcyjnego σ^{24} . Regulacja ta została opisana szczegółowo w pracach przeglądowych [24,25] i z tego względu nie będzie tu przedstawiana.

HOMOLOGI BIAŁKA HtrA *ESCHERICHIA COLI*

Homologi białka HtrA *E. coli* zostały zidentyfikowane w komórkach wielu gatunków organizmów, zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych, począwszy od proteobakterii, poprzez cyjanobakterie, aż po drożdże i człowieka. Wyróżnia się dwa rodzaje homologów HtrA/*htrA* w zależności od ich gatunkowej przynależności oraz pochodzenia: (1) paralogi - homologi zlokalizowane w obrębie tego samego genomu, powstałe w wyniku duplikacji genu, np. *htrA* (*degP*), *degQ* (*hhoA*), *degS* (*hhoB*) w genomie *E. coli*; (2) ortologi - homologi w komórkach różnych gatunków, pochodzące od wspólnego ich przodka, np. geny *htrA* w komórkach *E. coli* i *Salmonella typhimurium* [3].

PROKARIOTYCZNE BIAŁKA HtrA

KOMÓRKOWE PARALOGI HTRA *ESCHERICHIA COLI*

Homologi *htrA* w komórce *E. coli*, *degQ* (*hhoA*) i *degS* (*hhoB*) sąsiadujące ze sobą w genomie, leżą w znacznej odległości od genu *htrA* i znajdują się pod kontrolą osobnych promotorów. Transkrypcja ich nie jest indukowana termicznie i nie jest zależna od podjednostki σ^{24} [26]. *DegQ* i *DegS* są serynowymi endoproteazami działającymi w przestrzeni periplazmatycznej. Wyniki badań *in vitro* pokazały, iż HtrA oraz *DegQ* mają bardzo podobną specyficzność substratową i degradują białka częściowo lub całkowicie zdenaturowane [18]. Nadprodukcja *DegQ* łagodzi skutki mutacji w genie *htrA*, natomiast nadprodukcja *DegS* nie daje supresji mutacji w genie *htrA* [26]. Delecyjne mutanty *degQS* nie wykazują termowrażliwego fenotypu charakterystycznego dla mutantów *htrA*. Białko *DegS* w warunkach stresu pozacyto-

plazmatycznego inaktywuje proteolitycznie białko *RseA*, co w konsekwencji powoduje indukcję ekspresji genów regulonu σ^{24} , w tym genu *htrA*. W podsumowaniu, funkcje HtrA i *DegQ* częściowo się nakładają, podczas gdy funkcje HtrA i *DegS* są różne.

PROKARIOTYCZNE ORTOLOGI HtrA

Do tej pory ortologi HtrA *E. coli* zidentyfikowano u wszystkich analizowanych organizmów prokariotycznych. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych pozwala przypuszczać, iż białka te pełnią funkcje proteolityczne. U większości białek tej grupy zidentyfikowano reszty aminokwasowe mogące tworzyć triadę katalityczną charakterystyczną dla centrum aktywnego proteaz serynowych. Wyjątki stanowią homologi HtrA z komórek *Rickettsia tsutsugamusi*, *Rhizobium meliloti*, *Azotobacter vinelandii*, które mogą pełnić inne, nieznanne dotąd funkcje [3]. Mutacje w genach *htrA* tworzą grupę nakładających się fenotypów. Należą do nich: termowrażliwość oraz obniżona odporność na szok oksydacyjny i osmotyczny. Mutanty *htrA*⁻ wykazują obniżoną zdolność do przeżywania w makrofagach i komórkach organizmów zwierząt laboratoryjnych.

Wśród bakterii gramujemnych najlepiej dotychczas poznany ortologiem HtrA *E. coli* jest białko HtrA bakterii *Salmonella typhimurium*. HtrA *S. typhimurium* jest w 88,7% identyczne z białkiem *E. coli* i wykazuje aktywność proteazy serynowej. Promotor genu *htrA* z *S. typhimurium* jest podobny do promotora *htrA* z *E. coli* odczytywanego przez $E\sigma^{24}$, ale mutanty pozbawione funkcjonalnego HtrA nie są wrażliwe na szok termiczny. Są natomiast wrażliwe na czynniki utleniające, co czyni je podatnymi na zabijanie oksydacyjne z udziałem makrofagów i neutrofilów. Ekspresja genu *htrA* wyraźnie wzrasta po wnikięciu *S. typhimurium* do komórek eukariotycznych, z makrofagami włącznie [27].

Produkty genów *htrA* z *Brucella abortus* i *Klebsiella pneumoniae* są także proteazami serynowymi. Ekspresja homologa *htrA* u *B. abortus* jest, podobnie jak u *E. coli*, zależna od szoku temperaturowego. Promotor tego genu jest podobny do promotorów rozpoznawanych przez σ^{24} . Skutkiem braku HtrA w komórkach omawianych gatunków bakterii jest zwiększona wrażliwość na czynniki utleniające (H_2O_2) oraz obniżona wirulencja [28,29]. Przypuszcza się, że pierwszorzędnym mechanizmem eliminacji wewnątrzkomórkowej *Brucella* przez fagocyty gospodarza jest zabijanie oksydacyjne. Biorąc pod uwagę fakt, że HtrA jest elementem obrony przed skutkami stresu oksydacyjnego, uważa się, że może odgrywać istotną rolę w przetrwaniu komórek *Brucella* w fagosomach gospodarza. W przypadku bakterii *K. pneumoniae* wykazano, że komórki pozbawione białka HtrA wiążą więcej składnika C3 dopełniacza i są znacznie bardziej wrażliwe na zabijanie z udziałem białek dopełniacza i fagocytozę [30].

Geny kodujące homologi HtrA *E. coli* zidentyfikowano również u bakterii gramodatnich. Mutacje w genach *htrA* większości bakterii gramodatnich powodują wzrost wrażliwości na podwyższoną temperaturę oraz czynniki utleniające, a w niektórych przypadkach także na stres osmotyczny i puromycynę (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*,

Lactococcus lactis). Mutacja w genie *htrA* obniża wirulencję bakterii patogennych między innymi z rodzajów *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, a w przypadku bakterii gatunku *L. monocytogenes* oraz niektórych szczepów *S. pneumoniae* całkowicie ją znosi. Stosując mysli model zapalenia płuc i bakteremii stwierdzono, iż mutanty *S. pneumoniae htrA⁻* są niezdolne do przeżycia w tkankach płuc i krwi, i nie wywołują zapalenia płuc i bakteremii u myszy, również w mniejszym stopniu indukują odpowiedź zapalną mierzoną poziomem IL-6 i TNF α niż bakterie *HtrA⁺*. Białko HtrA uważa się za kluczowy czynnik wirulencji *S. pneumoniae* [31].

Proteaza HtrA uczestniczy także w biogenezie białek pozacytoplazmatycznych i powstawaniu biofilmu. HtrA_{LI} *Lactococcus lactis* uczestniczy w dojrzewaniu białek sekrecyjnych oraz w degradacji białek nieprawidłowych otoczki komórkowej [32]. Inaktywacja genu *htrA* *L. monocytogenes* redukuje powstawanie biofilmu [33], natomiast inaktywacja genu *htrA* *Streptococcus mutans* wpływa na poziom szeregu białek pozakomórkowych i powierzchniowych enzymów glikolitycznych oraz zmienia morfologię biofilmu [34]. U bakterii z gatunku *Streptococcus pyogenes* HtrA jest białkiem błonowym i stanowi część unikalnej mikrodomeny ExPortal, będącej elementem błony komórkowej. ExPotral odpowiada za biogenezę białek sekrecyjnych i koordynuje oddziaływania pomiędzy niezwiniętymi polipeptydami białek sekrecyjnych, a białkami opiekuńczymi związanymi z błoną komórkową [35]. Mutacje w homologicznych genach *htrA_I* i *htrA₃*, *Staphylococcus aureus* zaburzają ekspresję genów kodujących czynniki wirulencji. Co więcej, białka HtrA *S. aureus* będące powierzchniowymi proteazami serynowymi wpływają na sekrecję szeregu białek, w tym należących do czynników wirulencji hemolizyn [36].

W komórkach gramodatniej eubakterii *Bacillus subtilis* zidentyfikowano aż trzy potencjalne homologii *htrA* *E. coli*: *ykfA*, *yvtA*, *yycK*, z których *ykfA*, *yvtA* ulegają podwyższonej ekspresji w warunkach stresu termicznego oraz stresu indukowanego nadprodukcją białek sekrecyjnych oraz ich akumulacją w obrębie otoczki komórkowej. Inaktywacja jednego z genów rekompensowana jest przez zwiększenie poziomu ekspresji drugiego, jednak dopiero inaktywacja obu genów prowadzi do termowrażliwego fenotypu. Bakterie *B. subtilis htrA⁻* wykazują też obniżoną tolerancję na H₂O₂ [37].

HOMOLOGICZNE BIAŁKA HtrA ORGANIZMÓW EUKARIOTYCZNYCH

Aż czternaście genów, kodujących białka spokrewnione z białkiem HtrA *E. coli* oraz jego paralogami, zostało zidentyfikowanych w genomie gatunku *Arabidopsis thaliana*. Białka z tej rodziny zlokalizowano głównie w chloroplastach. Zawierają w swej sekwencji katalityczną triadę złożoną z reszt aminokwasowych His-Asp-Ser, a część z nich także jedną lub dwie domeny PDZ na końcu karboksylowym [38], jednak rola większości z nich nie została dotąd poznana. Podwyższony poziom białka DegP2 w komórkach *A. thaliana* obserwuje się w warunkach odwodnienia, zasolenia oraz stresu świetlnego. DegP2 degraduje w sposób zależny od GTP uszkodzone białko D1, będące centralnym elementem fotosystemu II, niezbędnym dla prawidłowego transportu elektronów [39].

Homologii HtrA *E. coli* zidentyfikowano w komórkach drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Candida albicans*. Homolog drożdżowy Nma111p (ang. *Nuclear mediator of apoptosis*) *S. cerevisiae* jest białkiem jądrowym o właściwościach proapoptotycznych. W warunkach stresu termicznego lub oksydacyjnego (H₂O₂) białko Nma111p ulega agregacji, co prowadzi do kondensacji i fragmentacji chromatyny i w konsekwencji powoduje śmierć komórki na drodze apoptozy [40].

Dotychczas zidentyfikowano cztery homologii białka HtrA *Escherichia coli* występujące w organizmie człowieka humHtrA1(L56, ORF480), humHtrA2 (Omi), humHtrA3, humHtrA4 [1], będące proteazami serynowymi (Rys. 1). Białka HtrA1 i HtrA2 biorą udział w odpowiedzi na stres termiczny, oksydacyjny, w regulacji wzrostu i różnicowania komórek, apoptozie, a zaburzenia w ich funkcjonowaniu mogą przyczyniać się do rozwoju szeregu chorób, o czym będzie mowa w dalszej części prezentowanej pracy. Rola humHtrA3 i humHtrA4 jak dotąd pozostaje najmniej poznana. Ze względu na podobny wzór ekspresji genów *HtrA1* i *HtrA3* w tkankach oraz podobieństwo strukturalne białek HtrA1 i HtrA3 sugeruje się, iż mogą pełnić podobne i wzajemnie uzupełniające się funkcje. Podobnie jak HtrA1, białko HtrA3 wykazuje aktywność proteolityczną wobec białek z rodziny Tgf β (ang. *Transforming growth factor*), będących czynnikami regulującymi wzrost i różnicowanie komórek. Podwyższony poziom ekspresji genu *HtrA3* i białka HtrA3, jaki obserwuje się w tkankach embrionalnych i łożysku w pierwszym trymestrze ciąży, pozwala przypuszczać, że białko to pełni istotną rolę w rozwoju płodu i powstawaniu łożyska [41,42].

BIAŁKO HtrA1 CZŁOWIEKA (L56, ORF480, PRSS11)

Po raz pierwszy gen *HtrA* człowieka opisano w efekcie poszukiwań genów biorących udział w odpowiedzi na transformację komórek wirusami onkogennymi. Stwierdzono wówczas, iż jeden z genów o obniżonej ekspresji w fibroblastach człowieka transformowanych SV40 koduje białko w 36% identyczne z HtrA *Escherichia coli*. Zidentyfikowany gen nazwano genem *HtrA* człowieka [43].

Gen *HtrA1* człowieka (*humHtrA1*) zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 10 (10q26.2) [44] i koduje polipeptyd złożony z 480 reszt aminokwasowych o masie cząsteczkowej 50 kDa. Wśród analizowanych gatunków ssaków struktura białka HtrA1 jest zachowana w ewolucji. Na poziomie sekwencji reszt aminokwasowych stopień identyczności białek HtrA1 człowieka, krowy, świnki morskiej, królika sięga niemal 98% [45].

UDZIAŁ BIAŁKA HtrA1 W ROZWOJU CHOROÓB NOWOTWOROWYCH

Obecnie HtrA1 uważa się za białko supresorowe w rozwoju nowotworów i potencjalny indyktor progresji nowotworów. Obniżony poziom ekspresji genu *humHtrA1* obserwuje się w komórkach guzów węzłów chłonnych, będących ogniskami przerzutowymi czerniaka, w stosunku do pierwotnych komórek ogniska skórno tego nowotworu. Stabilna ekspresja genu *HtrA1* i nadprodukcja białka w

komórkach transfekowanych wektorem niosącym prawidłowy gen *HtrA1* hamuje rozwój guza u myszy [46]. Obniżenie poziomu ekspresji *humHtrA1* stwierdzono również w komórkach nowotworu jajnika, co jest skorelowane z utratą heterozygotyczności oraz hipermetylacją genu [47].

Białko HtrA1 jest białkiem sekrecyjnym. Obok peptydu sygnałowego na końcu aminowym posiada domenę homologiczną do białka Mac25, należącego do rodziny białek wiążących insulinowy czynnik wzrostu (IGF, ang. *Insulin Growth Factor*) i związanego z rozwojem szeregu nowotworów, między innymi raka piersi. W obrębie sekwencji HtrA1 znajduje się także motyw inhibitora typu Kazal, który spotyka się w białkach regulujących aktywność komórkowych czynników wzrostu. Oka i wsp. wykazali, iż HtrA1 wiąże i przeprowadza proteolizę białek z rodziny Tgf β (Bmp4, Tgf β 1, Tgf β 2, aktywinę, Gdf5), które biorą udział w regulacji wzrostu i różnicowania komórek oraz produkcji białek macierzy międzykomórkowej [48]. Co więcej, odgrywają istotną rolę na różnych etapach kancerogenezy. Z jednej strony pełnią rolę białek supresorowych na wczesnych etapach rozwoju procesu nowotworowego a z drugiej strony, stymulują rozwój nowotworu w stadium zaawansowanym [49]. HtrA1 dzięki aktywności proteolitycznej pełni rolę inhibitora wobec białek z rodziny Tgf β [48]. Można więc przypuszczać, iż HtrA1 poprzez udział w regulacji aktywności czynników wzrostu może wywierać wpływ na funkcjonowanie białek związanych z regulacją cyklu komórkowego, czynników transkrypcyjnych, białek supresorowych, i tym samym może uczestniczyć w rozwoju procesów związanych z transformacją nowotworową.

ROLA *HtrA1* W ROZWOJU CHOROÓB ARTRETYCZNYCH

Dzięki hamowaniu sygnalizacji komórkowej z udziałem białek Tgf β oraz poprzez degradację elementów macierzy międzykomórkowej, tkanki chrzęstnej, glikoprotein oraz proteoglikanów (między innymi kolagenu typu II, fibromoduliny, fibronektyny), HtrA1 bierze udział w różnicowaniu chondrocytów oraz prawidłowych procesach kostnienia [50]. Z drugiej strony, podwyższony poziom mRNA *humHtrA1* oraz białka *humHtrA1* [45] w tkance chrzęstnej u chorych na osteoartretyzm pozwala przypuszczać, że białko *humHtrA1* może uczestniczyć w degradacji chrząstki stawowej i tym samym w powstawaniu zmian patologicznych w obrębie stawów [50].

ZWIĄZEK *HtrA1* Z ROZWOJEM CHOROBY ALZHEIMERA

Dotychczasowe wyniki badań pokazały związek białka HtrA1 z rozwojem choroby Alzheimerera, w przebiegu której dochodzi do powstawania i akumulacji w mózgu pozakomórkowych złogów białkowych o właściwościach neurotoksycznych. Złogi powstają w wyniku agregacji β -amyloidu, który jest generowany w efekcie hydrolizy wielkocząsteczkowego białka prekursorowego APP (ang. *amyloid beta A4 precursor protein*) z udziałem sekretaz. Szlak amyloidotwórczy zależny od sekretaz β i γ generuje peptydy A β 40 i A β 42, które wykazują tendencję do tworzenia agregatów i są głównym składnikiem złogów [51]. Wykorzystując linie komórkowe astrocytów wykazano, iż białko HtrA1 uczestniczy w metabolizmie β -amyloidu. Aktywne astrocyty pro-

dukują duże ilości APP i wydzielają β -amyloid, wykazują też wysoki poziom syntezy HtrA1. Stwierdzono, że peptydy A β 40, A β 42 oraz peptyd C99, będący produktem hydrolizy APP, stanowią substraty dla proteazy HtrA1. Zahamowanie aktywności proteolitycznej HtrA1 powoduje akumulację pozakomórkowego β 40. Przypuszcza się, że proteaza HtrA1 może pełnić kluczową rolę w kontroli poziomu β -amyloidu. Proteoliza zapobiega akumulacji toksycznych agregatów i tym samym przyczynia się do hamowania rozwoju choroby Alzheimerera [52].

BIAŁKO HtrA2 CZŁOWIEKA (OMI)

Drugim znanym homologiem białka bakteryjnego jest *humHtrA2* (Omi). Gen *HtrA2* człowieka (*humHtrA2*) zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 2 (2p13.1). W obrębie genu znajduje się osiem eksonów, które kodują polipeptyd, złożony z 458 reszt aminokwasowych, o masie cząsteczkowej około 50 kDa. Należy jednak dodać, że w procesie różnicowego cięcia i składania mRNA mogą powstać aż cztery warianty, których ekspresja jest specyficzna tkankowo [2].

Podwyższony poziom HtrA2 obserwuje się w warunkach stresu termicznego, a także po traktowaniu komórek tunikamycyną, która u ssaków indukuje stres wywołany nieprawidłową glikozylacją białek [53]. W warunkach niedotlenienia i reperfuzji, przy niezmiennym poziomie białka obserwuje się wzrost aktywności proteolitycznej HtrA2 w nerce, co sugeruje udział tego białka w odpowiedzi na stres oksydacyjny [54].

FUNKCJA BIAŁKA *HtrA2* W MECHANIZMACH INDUKCJI APOPTOZY

Białko HtrA2 pełni niezwykle istotną rolę w indukowaniu apoptozy. Dojrzałe białko zlokalizowane jest w przestrzeni mitochondrialnej. W warunkach indukowanej apoptozy (pod wpływem promieniowania UV, staurosporyny, niedotlenienia i reperfuzji) HtrA2 ulega autoproteolizie, co powoduje odsłonięcie na końcu aminowym białka motywu AVPS (Ala-Val-Pro-Ser). Motyw ten jest charakterystyczny dla białek o właściwościach proapoptotycznych (Grim, Hid, Reaper, Smac/DIABLO) i umożliwia oddziaływanie z białkami inhibitorami apoptozy (IAP, ang. *inhibitor of apoptosis proteins*). Białko HtrA2 z odsłoniętym motywem AVPS ulega translokacji do cytosolu, gdzie wiąże białka IAP i przeprowadza ich proteolizę, co z kolei prowadzi do aktywacji kaspaz. Wykazano, że następujące białka z rodziny IAP stanowią substraty dla proteazy HtrA2: CIAP1, CIAP2, XIAP, liwiny α i β oraz DIAP [55,56].

Obok białek IAP substratem proteazy HtrA2 jest cytosolowe białko o właściwościach antyapoptotycznych ped/pea15. Rola białka ped/pea15 polega na blokowaniu sygnału apoptozy inicjowanego z udziałem receptorów błonowych (Fas-R, TNF-R1) przez uniemożliwienie wytworzenia kompleksu białek inicjującego aktywację kaskady kaspaz. W warunkach indukowanej apoptozy HtrA2 wiąże białko ped/pea15 i przeprowadza jego proteolizę. Nadprodukcja białka ped/pea15 zapobiega wiązaniu HtrA2 z XIAP i aktywacji kaspazy 3. Sugeruje się, że zdolność HtrA2 do wią-

zania białek z rodziny IAP może zależeć od relatywnego poziomu HtrA2 i białka ped/pea15 [57].

Białko HtrA2 ma zdolność do indukowania apoptozy nie tylko na drodze zależnej od kaspaz, lecz również w oparciu o aktywność proteazy serynowej. Wykazano, że mutacja polegająca na zamianie reszty alaniny na glicynę w obrębie motywu AVPS uniemożliwia oddziaływanie białka HtrA2 z XIAP, ale nie znosi całkowicie jego proapoptotycznych właściwości. Dopiero białko HtrA2 pozbawione alaniny w obrębie wspomnianego motywu AVPS oraz właściwości proteolitycznych traci zdolność indukowania apoptozy [58,59,60].

Proteaza HtrA2 posiada również zdolność wiązania i proteolizy mitochondrialnego białka HAX-1 (ang. *HS1-associated protein-1*). Białko HAX-1 wykazuje homologię do białek z rodziny Bcl-2 i posiada właściwości antyapoptotyczne. Przypuszcza się, że bierze udział w regulacji potencjału błonowego mitochondrium i tym samym wpływa na przepuszczalność błony dla białek ulegających translokacji do cytosolu podczas apoptozy. Do degradacji HAX-1 dochodzi we wczesnych etapach apoptozy, gdy HtrA2 znajduje się jeszcze w mitochondrium [61]. Co więcej, na przykładzie neutrofilów człowieka traktowanych TNF α wykazano, że HtrA2 może indukować apoptozę nie ulegając przemieszczeniu do cytosolu [62]. Białko HtrA2 może zatem uczestniczyć w regulacji apoptozy zarówno na jej wczesnych etapach, kiedy białko znajduje się jeszcze w mitochondrium, jak i po przemieszczeniu do cytosolu, gdzie hamuje aktywność białek antyapoptotycznych.

Obok wspomnianych powyżej mechanizmów regulujących proces indukcji apoptozy, w których uczestniczy HtrA2, wykazano istnienie związku tej proteazy ze szlakiem indukcji śmierci komórki zależnym od białka p53. Okazało się, że ekspresja genu *humHtrA2* pozostaje pod kontrolą p53. W warunkach apoptozy indukowanej etopozydem (przebiegającej z udziałem p53) w komórkach HeLa i tymocytach człowieka poziom ekspresji genu *humHtrA2* wzrasta. Wykazano, że HtrA2 wiąże i przeprowadza proteolizę białka CIAP1, głównego inhibitora apoptozy w komórkach ssaków. Zablokowanie aktywności proteolitycznej *humHtrA2* inhibitorem specyficznym dla proteaz serynowych uniemożliwia proteolizę CIAP1 i tym samym blokuje apoptozę zależną od p53 [63].

ZWIĄZEK BIAŁKA HtrA2 Z ROZWOJEM CHOROBY ALZHEIMERA

Wykazano również związek białka HtrA2 z rozwojem choroby Alzheimera. HtrA2 wchodzi w oddziaływanie z preseniliną-1 (PS-1) – jednym z białek biorących udział w powstawaniu β -amyloidu. PS-1 jest enzymem, który jest elementem kompleksu γ -sekreazy i przeprowadza hydroлизę prekursorowego białka APP, w efekcie czego zostaje uwolniony β -amyloid. Mutacje w genie kodującym PS-1, odpowiedzialne za powstawanie ponad połowy dziedzicznych przypadków choroby Alzheimera, powodują zwiększenie apoptozy neuronów. Przypuszcza się, że w procesie śmierci neuronów kluczową rolę odgrywa proteaza HtrA2. Akumulacja β -amyloidu może inicjować apoptozę, a to z kolei powoduje translokację HtrA2 do cytosolu. Wykazano,

że karboksylowy fragment PS-1 wiąże domeny PDZ dojrzałego białka HtrA2, co powoduje zwiększenie aktywności proteolitycznej HtrA2 wobec białek IAP (XIAP, CIAP1, CIAP2) i w konsekwencji aktywuje kaspazy [64]. Białko HtrA2 wiąże również β -amyloid lecz nie odpowiada bezpośrednio za jego degradację. Należy jednak zauważyć, że poziom β -amyloidu spada o jedną trzecią w komórkach nadprodukcujących białko HtrA2 [65].

PRAKTYCZNE ZASTOSOWANIE BADAŃ NAD BIAŁKAMI Z RODZINY HtrA ORAZ PERSPEKTYWY ICH WYKORZYSTANIA W PRZYSZŁOŚCI

Intensywne badania prowadzone nad rolą prokariotycznych białek HtrA budzą szczególne zainteresowanie w kontekście wykorzystania atenuowanych szczepów bakterii *htrA* do konstrukcji szczepionek. Obiecujące efekty przyniosły badania nad szczepionkami na bazie atenuowanych szczepów z gatunków *Salmonella* i *Shigella* pozbawionych genu *htrA*. Drugą fazę testów klinicznych pomyślnie przeszła żywa szczepionka CVD 908-*htrA* (*aroC aroD htrA*) na bazie szczepu *Salmonella enterica* serowariantu Thyphi przeciwko durowi brzuszemu. Tak skonstruowana szczepionka jest bezpieczna i wysoce immunogenna. W przeciwieństwie do obecnie stosowanej szczepionki CVD 908 (*aroC aroD*), indukuje odporność u ludzi już po jednorazowym szczepieniu [66]. Ten sam szczep *S. enterica htrA*⁻ używany jest jako wektor do przenoszenia plazmidów ekspresyjnych niosących geny heterologicznych antygenów, między innymi gen kodujący fragment powierzchniowego białka SSP-2 *Plasmodium falciparum* [67], gen *ureAB* ureazy *Helicobacter pylori* [68], gen hemaglutyniny wirusa odry [69]. Wstępne testy kliniczne przeszła pomyślnie szczepionka przeciwko tężcowi skonstruowana w oparciu o wspomniany szczep *S. enterica htrA*, w którym ekspresji ulega gen kodujący fragment toksyny tężca (TetC) [70]. Wykorzystana strategia daje możliwość opracowywania szczepionek biwalentnych indukujących odpowiedź immunologiczną przeciwko heterologicznym antygenom.

Atenuowane szczepy *Salmonella htrA* używa się do przenoszenia eukariotycznych plazmidów ekspresyjnych kodujących cytokiny w celu modulowania odpowiedzi immunologicznej. Badania prowadzone na modelu zwierzęcym pokazały, iż terapia indukuje efekt przeciwnowotworowy w czerniaku oraz może być stosowana także w infekcjach pasożytniczych [71].

Do ekspresji heterologicznych antygenów wykorzystuje się także silny promotor genu *htrA*. Ekspresja genu *htrA* wyraźnie wzrasta po wnikięciu bakterii z rodzaju *Salmonella* do komórek eukariotycznych. Właściwość tę wykorzystano wprowadzając gen kodujący C-końcowy fragment toksyny jadu kiełbasianego bezpośrednio pod kontrolę promotora *htrA*. W ten sposób uzyskano silną odpowiedź immunologiczną przeciwko toksynie jadu kiełbasianego u myszy [72].

HtrA wykorzystuje się jako indykator chorób powodowanych przez riketsje, mikroorganizmy będące przyczyną szeregu chorób przenoszonych przez owady, pchły i kleszcze, takich jak gorączka plamista (ang. *spotted fever*). Ampli-

fikacja genu *htrA* z zastosowaniem techniki PCR umożliwia identyfikację patogenu i rozpoznanie gatunku [73]. Gen *htrA* wykorzystuje się w identyfikacji metodą PCR patogennej bakterii *Bartonella henselae* w zmienionych węzłach chłonnych w chorobie kociego pazura (ang. *Cat Scratch Disease*) [74].

Mutacje w genie *htrA* powodują stabilizację wielu niestabilnych białek otoczki komórkowej oraz fuzyjnych, stąd używa się mutantów *htrA* w roli gospodarzy do ekspresji zrekombinowanych genów. W ten sposób uzyskano wydajną ekspresję szeregu zrekombinowanych białek w komórkach pozbawionych prawidłowego białka HtrA, np. pochodnej toksyny błonicy i zrekombinowanej podjednostki S1 toksyny krztuśca. Skonstruowano także podwójne mutanty *rpoH htrA*, które jeszcze bardziej udoskonaliły możliwość ekspresji heterologicznych sekrecyjnych białek [3].

Ogromny wzrost zainteresowania eukariotycznymi białkami HtrA zaowocował ukazaniem się szeregu niezwykle interesujących prac dotyczących roli wspomnianych białek w rozwoju chorób, w tym nowotworowych, neurodegeneracyjnych oraz artretycznych. Sugeruje się, iż ocena ekspresji genu *HtrA1* może być w przyszłości przydatna w diagnostyce onkologicznej, a aktywność genu *HtrA1* może być markerem progresji nowotworów. Należy również zauważyć, że upośledzenie procesów związanych z indukcją apoptozy może prowadzić do niekontrolowanego namnażania komórek i indukcji procesu nowotworowego, stąd HtrA2 jako białko proapoptotyczne może być zaangażowane w kancerogenezę poprzez udział w apoptozie. Istnieje również możliwość wykorzystania wiedzy na temat białek HtrA w leczeniu chorób artretycznych i neurodegeneracyjnych.

UWAGI KOŃCOWE

Powszechność występowania białek HtrA oraz ich zachowana w ewolucji aktywność proteolityczna wskazuje na niezwykle istotną rolę omawianej rodziny białek w prawidłowym funkcjonowaniu komórek i to zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych. Proteazy HtrA są zaangażowane w degradację nieprawidłowych i potencjalnie toksycznych dla komórki białek oraz regulację aktywności szeregu białek kluczowych dla właściwego przebiegu procesów związanych ze wzrostem i różnicowaniem komórki, a w szczególnych okolicznościach kierowaniem jej na drogę autodestrukcji. Dotychczasowe badania nad funkcją prokariotycznych białek HtrA zaowocowały wykorzystaniem zdobytej wiedzy przede wszystkim w konstrukcji szczepionek na bazie atenuowanych szczepów *htrA*. Dalsze prace nad rolą eukariotycznych białek HtrA mogą dać odpowiedź na pytania z zakresu transformacji nowotworowej i procesów związanych z rozwojem chorób, w tym neurodegeneracyjnych i artretycznych, a dokładne poznanie mechanizmów działania białek HtrA dałoby możliwość wykorzystania zdobytej wiedzy w diagnostyce i leczeniu tych schorzeń.

PISMIENNICTWO

1. Clausen T, Southan C, Ehrmann M (2002) The HtrA Family of Proteases: Implications for protein Composition and Cell Fate. *Molecular Cell* 10: 443-455
2. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF (2004) Serine and Threonine Peptidases, W: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, t II. Elsevier Academic Press, str. 1417-1784
3. Pallen BW, Wren MJ (1997) The HtrA family of serine proteases. *Mol Microbiol* 26: 209-221
4. Lipinska B, Sharma S, Georgopoulos C (1988) Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res* 16: 10053-10067
5. Strauch KL, Beckwith J (1988) An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1576-1580
6. Lipinska B, Fayet O, Baird L, Georgopoulos C (1989) Identification, characterization and mapping of the *Escherichia coli htrA* gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J Bacteriol* 171: 1574-1584
7. Skorko-Glonek J, Wawrzynow A, Krzewski K, Kurpierz K, Lipinska B (1995) Site-directed mutagenesis of the HtrA (DegP) serine protease, whose proteolytic activity is indispensable for *Escherichia coli* survival at elevated temperatures. *Gene* 163: 47-52
8. Skorko-Glonek J, Lipinska B, Krzewski K, Zolse G, Bertoli E, Tanfani F (1997) HtrA heat shock protease interacts with phospholipid membranes and undergoes conformational changes. *J Biol Chem* 272: 8974-8982
9. Lipinska B, Zylicz M, Georgopoulos C (1990) The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at elevated temperatures, is an endoprotease. *J Bacteriol* 172: 1791-1797
10. Cavard D (1995) Role of DegP protease on levels of various forms of colicin A lysis protein. *FEMS Microbiol Lett* 125: 173-178
11. Isaac DD, Pinkner JS, Hultgren SJ, Silhavy TJ (2005) The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 17775-17779
12. Laskowska E, Kuczynska-Wisnik D, Skorko-Glonek J, Taylor A (1996) Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA of *Escherichia coli* proteins intracellularly aggregated by heat shock: HtrA protease action *in vivo* and *in vitro*. *Mol Microbiol* 22: 555-571
13. Skorko-Glonek J, Zurawa D, Kuczwarra E, Wozniak M, Wypych Z, Lipinska B (1999) The *Escherichia coli* heat shock serine protease participates in defense against oxidative stress. *Mol Gen Protease* 262: 342-350
14. Spiess C, Beil A, Ehrmann M (1999) A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in Widely Conserved Heat Shock Protein. *Cell* 97: 339-347
15. CastilloKeller M, Misra R (2003) Protease-Deficient DegP Suppress Lethal Effect of a Mutant OmpC Protein by Its Capture. *J Bacteriol* 185: 148-154
16. Rizzitello AE, Harper JR, Silhavy TJ (2001) Genetic Evidence for Parallel Pathways of Chaperone Activity in the Periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 6794-6800
17. Krojer T, Garrido-Franco M, Huber R, Ehrmann M, Clausen T (2002) Crystal Structure of DegP (HtrA) Reveals a New Protease-Chaperone Machine. *Nature* 416: 455-459
18. Kolmar H, Waller PRH, Sauer RT (1996) The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrates conformation. *J Bacteriol* 178: 5925-5929
19. Skorko-Glonek J, Zurawa D, Tanfani F, Scire A, Wawrzynow A, Narkiewicz J, Bertoli E, Lipinska B (2003) N-terminal region of HtrA serine protease is essential for stabilization of primary structure and maintaining of its oligomeric structure. *Biochim Biophys Acta* 1649: 171-182
20. Mileyskovskaya E, Dowhan W (1997) The Cpx two-component signal transduction pathway is activated in *Escherichia coli* mutant strains lacking phosphatidylethanolamine. *J Bacteriol* 179: 1029-1034

21. Raina S, Missiakas D, Georgopoulos C (1995) The *rpoE* gene encoding the σ^E (σ^{24}) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. EMBO J 14: 1043-1055
22. Mecsas J, Rouviere PE, Erickson JW, Donohue TJ, Gross CA (1993) The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. Genes Dev 7: 2618-2628
23. Miyadai H, Tanaka-Masuda K, Matsuyama S, Tokuda H (2004) Effects of Lipoprotein Overproduction on the Induction of DegP (HtrA) Involved in Quality Control in the *Escherichia coli* Periplasm. J Biol Chem 279: 39807-39813
24. Miot M, Betton JM (2004) Protein quality control in the bacterial periplasm. Microbial Cell Factories 3: 4. <http://www.microbialcellfactories.com/content/3/1/4>
25. Ehrmann M, Clausen T (2004) Proteolysis as a Regulatory Mechanism. Annu Rev Genet 38: 709-724
26. Waller PR, Sauer RT (1996) Characterization of *degQ* and *degS*, *Escherichia coli* genes encoding homologs of the DegP protease. J Bacteriol 178: 1146-1153
27. Everest P, Frankel G, Li J, Lund P, Chatfield S, Dougan G (1995) Expression of LacZ from the *htrA*, *nirB* and *groE* promoters in a *Salmonella* vaccine strain: influence of growth in mammalian cells. FEMS Microbiol Lett 126: 97-101
28. Roop RM 2nd, Fletcher TW, Sriranganathan NM, Boyle SM, Schurig GG (1994) Identification of an immunoreactive *Brucella abortus* HtrA stress response protein homolog. Infect Immun 62: 1000-1007
29. Elzer PH, Phillips RW, Kovach ME, Peterson KM, Roop RM 2nd (1994) Characterization and genetic complementation of a *Brucella abortus* high-temperature-requirement A (*htrA*) deletion mutant. Infect Immun 62: 4135-4139
30. Cortes G, de Astorza B, Benedi VJ, Alberti S (2002) Role of the *htrA* Gene in *Klebsiella pneumoniae* Virulence. Infect Immun 70: 4772-4776
31. Ibrahim YM, Kerr AR, McCluskey, Mitchell TJ (2004) Control of Virulence by the Two-Component System CiaR/H Is Mediated via HtrA, a Major Virulence Factor of *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol 186: 5258-5266
32. Poquet I, Saint V, Seznec E, Simoes N, Bolotin A, Gruss A (2000) HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. Mol Microbiol 35: 1042-1051
33. Wilson RL, Brown LL, Kirkwood-Watts D, Warren TK, Lund SA, King DS, Jones KF, Hruba DE (2006) *Listeria monocytogenes* 10403S HtrA is necessary for resistance to cellular stress and virulence. Infect Immun 74: 765-768
34. Biswas S, Biswas I (2005) Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. Infect Immun 73: 6923-6934
35. Rosch JW, Caparon MG (2005) The ExPortal: an organelle dedicated to the biogenesis of secreted proteins in *Streptococcus pyogenes*. Mol Microbiol 58: 959-968
36. Rigoulay C, Entenza JM, Halpern D, Widmer E, Moreillon P, Poquet I, Gruss A (2005) Comparative Analysis of the Roles of HtrA-Like Surface Proteases in Two Virulent *Staphylococcus aureus* Strains. Infect Immun 73: 563-572
37. Noone D, Howell A, Collyer R, Devine KM (2001) YkdA and YvtA, HtrA-like serine proteases in *Bacillus subtilis*, engage in negative autoregulation and reciprocal cross-regulation of *ykdA* and *yvtA* gene expression. J Bacteriol 183: 654-663
38. Adam Z, Adamska I, Nakabayashi K, Ostersehter O, Haussuhl K, Manuell A, Zheng B, Vallon O, Rodermerl SR, Shinozaki K, Clarke AK (2001) Chloroplast and Mitochondrial Proteases in *Arabidopsis*. Proposed nomenclature. Plant Physiol 125: 1912-1918
39. Haussuhl K, Andersson B, Adamska I (2001) A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. EMBO J 20: 713-722
40. Fahrenkrog B, Sauder U, Aebi U (2004) The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis. J Cell Sci 117: 115-126
41. Nie G-Y, Hampton A, Li Y, Findlay JK, Salamonsen LA (2003) Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2. Biochem J 371: 39-48
42. Tocharus J, Tsuchiya A, Kajikawa M, Ueta Y, Oka C, Kawaichi M (2004) Developmentally regulated expression of mouse HtrA3 and its role as an inhibitor of TGF- β signaling. Dev Growth Differ 16: 257-274
43. Zumbunn J, Treub B (1996) Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. FEBS Lett 398: 187-192
44. Zumbunn J, Treub B (1997) Localization of the gene for a serine protease with IGF-binding domain (PRSS11) to human chromosome 10q25.3-q26.2. Genomics 45: 461-462
45. Hu S-I, Carozza M, Klein M, Nantermet P, Luk D, Crowl RM (1998) Human HtrA, evolutionary conserved serine protease identified as differentially expressed gene product on osteoarthritis cartilage. J Biol Chem 273: 34406-34412
46. Baldi A, De Luca A, Morini M, Battista T, Felsani A, Baldi F, Catricala C, Amantea A, Noonan DM, Albini A, Natali PG, Lombardi D, Paggi MG (2002) The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and repress growth of metastatic melanoma cells. Oncogene 21: 6684-6688
47. Chien J, Staub J, Hu S-I, Erickson-Johnson MR, Couch FJ, Smith DL, Crowl RM, Kaufmann SH, Shridhar V (2004) A candidate tumor suppressor HtrA1 is down-regulated in ovarian cancer. Oncogene 23: 1636-1644
48. Oka C, Tsujimoto R, Kajikawa M, Koshiba-Takeuchi K, Ina J, Yano M, Tsuchiya A, Ueta Y, Soam A, Kanda H, Matsumoto M, Kawaichi M (2003) HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgf β family proteins. Development 131: 1041-1053
49. Kaminska B, Wesolowska A, Danilkiewicz M (2005) TGF beta signaling and its role in tumour pathogenesis. Acta Biochim Polon 52: 329-337
50. Tsuchiya A, Yano M, Tocharus J, Kojami H, Fukumoto M, Kawaichi M, Oka C (2005) Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. Bone 37: 323-336
51. Bąk D, Milewski M (2005) Choroby związane z agregacją białek. Postępy Biochem 51: 297-307
52. Grau S, Baldi A, Bussani R, Tian X, Stefanescu R, Przybylski M, Richards P, Jones SA, Shridhar V, Clausen T, Ehrmann M (2005) Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. Proc Natl Acad Sci USA 102: 6021-6026
53. Gray CW, Ward RV, Karran E, Turconi S, Rowles A, Viglienghi D, Southan C, Barton A, Fantom KG, West A, Savopoulos J, Hassan NJ, Clinkenbeard H, Hanning C, Amegadzie B, Davis JB, Dingwall C, Livi GP, Creasy CL (2000) Characterization of Human HtrA2, novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. Eur J Biochem 267: 5699-5710
54. Faccio L, Fusco C, Chen A, Martinotti S, Bonventres JV, Zervos AS (2000) Characterization of Novel Human Serine Protease That Has Extensive Homology to Bacterial Heat Shock Endoprotease HtrA and Is Regulated by Kidney Ischemia. J Biol Chem 275: 2581-2588
55. Yang QH, Church-Hajduk R, Ren J, Newton NL, Du C (2003) Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAP and facilitates caspase activity in apoptosis. Genes Dev 17: 1487-1496
56. Srinivasula SM, Gupta S, Datta P, Zhang ZJ, Hedge R, Cheong N, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2003) Inhibitor of Apoptosis Proteins Are Substrates for the Mitochondrial Serine Protease Omi/HtrA2. J Biol Chem 278: 31469-31472
57. Trencia A, Fiory F, Maitan MA, Vito P, Barbagallo APM, Perfetti A, Miele C, Ungaro P, Oriente F, Cilenti L, Zervos AS, Formisano P, Beugnot F (2004) Omi/HtrA2 Promotes Cell Death by Binding and Degrading the Anti-apoptotic Protein ped/pea15. J Biol Chem 279: 46566-46572
58. Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoines NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, Downward J

- (2002) The Serine Protease Omi/HtrA2 Regulates Apoptosis by Binding XIAP through a Reaper-like Motif. *J Biol Chem* 277: 439-444
59. Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakush M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2002) HtrA2 Promotes Cell Death through Its Serine Protease Activity and Its Ability to Antagonize Inhibitor of Apoptosis Proteins. *J Biol Chem* 277: 445-454
 60. Hedge R, Srinivasula SM, Zhang ZJ, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DoBois G, Lazebnik Y, Zevros AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2002) Identification of Omi/HtrA2 as Mitochondrial Apoptotic Serine Protease That Disrupts Inhibitors of Apoptosis Protein-Caspase Interaction. *J Biol Chem* 277: 432-438
 61. Cilenti L, Soundarapandian MM, Kyriasis GA, Stratico V, Singh S, Gupta S, Bonventre JV, Alnemri ES, Zevros AS (2004) Regulation of HAX-1 Anti-apoptotic Protein by Omi/HtrA2 Protease during Cell Death. *J Biol Chem* 279: 50295- 50301
 62. Bink E, Maianski NA, Alnemri ES, Zevros AS, Roos D, Kuijpers TW (2004) Intramitochondrial serine protease activity of Omi/HtrA2 is required for caspase-independent cell death of human neutrophils. *Cell Death Differ* 11: 937-939
 63. Jin S, Kalkum M, Overholtzer M, Stoffel A, Chait BT, Levine AJ (2002) CIAP1 and the serine protease HtrA2 are involved in a novel p53-dependent apoptosis pathway in mammals. *Genes Dev* 17: 359-367
 64. Gupta S, Singh R, Datta P, Zhang ZJ, Orr C, Lu Z, Dubois G, Zevros AS, Meisler HM, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2004) The C-terminal Tail of Presenilin Regulates Omi/HtrA2 Protease Activity. *J Biol Chem* 279: 45844-45854
 65. Liu ML, Liu MJ, Kim MJ, Kim HJ, Hong ST (2005) HtrA2 Interacts with A β Peptide but Does Not Directly Alter Its Production and Degradation. *Mol Cells* 20: 83-89
 66. Salerno-Goncalves R, Wyant TL, Pasetti MF, Fernandez-Vina M, Tacket CO, Levine MM, Sztein MB (2003) Concomitant Induction of CD4⁺ and CD8⁺ T cell Responses in Volunteers Immunized with *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strain CVD 908-htrA. *J Immunol* 170: 2734-2741
 67. Gomez-Duarte OG, Pasetti MF, Santiago A, Sztein MB, Hoffman SL, Levine MM (2001) Expression, extracellular secretion and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* sporozoite protein 2 in *Salmonella* vaccine strains. *Infect Immun* 69: 1192-1198
 68. Londorno-Arcila P, Freeman D, Kleanthous H, O'Dowd AM, Lewis S, Turner AK, Rees EL, Tibbitts TJ, Greenwood J, Monath TP, Darsley MJ (2002) Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhi Expressing Urease Effectively Immunizes Mice against *Helicobacter pylori* Challenge as Part of a Heterologous Mucosal Priming - Parental Boosting Vaccination. *Infect Immun* 70: 5096-5106
 69. Pasetti MF, Levine MM, Sztein MB (2003) Animal models paving the way for clinical trials of attenuated *Salmonella Typhi* live oral vaccines and live vectors. *Vaccine* 21: 401-418
 70. Tacket CO, Galen JE, Sztein MB, Losonsky G, Wyant TL, Nataro J, Wasserman SS, Edelman R, Chatfield S, Dougan G, Levine MM (2000) Safety and immune responses to attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhi oral live vector vaccines expressing tetanus toxin fragment C. *Clin Immunol* 97: 146-153
 71. Rozenkranz CD, Chiara D, Agorio C, Baz A, Pasetti MF, Schreiber F, Dematteis S, Martinez M, Sztein MB, Chabalgoity JA (2003) Towards New Immunotherapies: Targeting Recombinant Cytokines to the Immune System using Live Attenuated *Salmonella*. *Vaccine* 21: 798-801
 72. Foyne S, Holley JL, Garmory HS, Titball RW, Fairweather NF (2002) Vaccination against type F botulinum toxin using attenuated *Salmonella enterica* var Thypimurium strains expressing the BoNT/F H_C fragment. *Vaccine* 21: 1052-1059
 73. Blair PJ, Jiang J, Schoeler GB, Moron C, Anaya E, Cespedes M, Cruz C, Felices V, Guevara C, Mendoza L, Villaseca P, Sumner JW, Richards AL, Olson JG (2004) Characterization of Spotted Fever Group Rickettsiae in Flea and Tick Specimens from Northern Peru. *J Clin Microbiol* 42: 4961-4967
 74. Hansmann Y, DeMartino S, Piemont Y, Meyer N, Mariet P, Heller R, Christmann D, Jaulhac B (2005) Diagnosis of Cat Scratch Disease of *Bartonella henselae* by PCR: a Study of Patients with Lymph Node Enlargement. *J Clin Microbiol* 43: 3800-3806

Characterization of the HtrA family of proteins

Dorota Żurawa-Janicka[✉], Joanna Narkiewicz, Barbara Lipińska

University of Gdańsk, Institute of Biology, Department of Biochemistry, 24 Kładki St., 80-822 Gdańsk, Poland

[✉]e-mail: zurawa@biotech.univ.gda.pl

Key words: *Escherichia coli* HtrA protein, heat shock proteins, human HtrA proteins, serine proteases

ABSTRACT

The HtrA family of proteins consists of evolutionary conserved serine proteases, which are homologues of the HtrA protein from a model bacterium *Escherichia coli*. They are widely distributed among organisms, prokaryotic as well as eukaryotic including humans. HtrA proteins participate in defense against stresses causing aberrations in protein structure, for example heat or oxidative stress. At least four human homologues have been identified. They are involved in cell growth and differentiation, apoptosis, and disturbances in their function may induce carcinogenesis, arthritic and neurodegenerative disorders. This article summarizes recent studies regarding the HtrA family of proteins, their structure, regulation and function. It also presents practical applications of this knowledge and perspective of its use in the future.

Kolagenazy typu IV (MMP-2 i MMP-9) i ich substraty – białka macierzy zewnątrzkomórkowej, hormony, cytokiny, chemokiny i ich receptory

STRESZCZENIE

Metaloproteiny macierzy (MMP) są endopeptydazami zależnymi od cynku, wymagającymi obecności jonów wapnia w środowisku, zdolnymi do trawienia białkowych składników macierzy zewnątrzkomórkowej takich jak kolageny, lamininy, proteoglikany, fibronektyna. Degradując białka macierzy, w tym również błony podstawne, umożliwiają migrację komórek. Jednakże macierz nie stanowi pasywnego rusztowania. Jej składniki są między innymi rezerwuarem czynników wzrostu, które mogą być uwolnione przez metaloproteiny i modulować reakcje komórek. Ponadto, do substratów metaloproteinaz macierzy należy także wiele innych białek, takich jak hormony, cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu, które w wyniku proteolizy mogą być aktywowane, inaktywowane bądź przekształcane w produkty o nowej aktywności biologicznej. Metaloproteiny macierzy odgrywają również istotną rolę w układzie immunologicznym. Wynika z tego, że funkcja tych enzymów jest niezwykle złożona i nie sprowadza się do prostej destrukcji. W warunkach fizjologicznych metaloproteiny są niezbędne podczas embriogenezy i przebudowy tkanek, ale zwiększona ekspresja tych enzymów towarzyszy wielu stanom patologicznym, takim jak choroby nowotworowe, choroby sercowo-naczyniowe, oraz autoimmunologiczne.

WPROWADZENIE

Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP, ang. *matrix metalloproteinase*), zwane inaczej matryksynami, stanowią rodzinę endopeptydaz mających dwie ważne wspólne cechy: zachowany ewolucyjnie motyw sekwencyjny obejmujący trzy reszty histydylowe wiążące jon cynku w centrum katalitycznym oraz zachowawczą resztę metionylową zlokalizowaną poniżej miejsca wiązania tego jonu. U większości MMP można wyróżnić trzy główne domeny: N-końcowy propeptyd (prodomenę), domenę katalityczną i domenę hemopeksynową na karboksylowym końcu cząsteczki, ale u wielu reprezentantów tej rodziny występują także dodatkowe domeny, decydujące o odmiennych właściwościach poszczególnych enzymów. Dlatego też, zarówno swoistość substratowa, jak i budowa chemiczna stanowiły podstawowe kryteria podziału metaloproteinaz macierzy na kilka głównych grup (kolagenazy, żelatynazy, stromelizyny, metaloproteiny błonowe) [1].

MMP uczestniczą w wielu procesach fizjologicznych; przede wszystkim w implantacji trofoblastu, embriogenezie, rozwoju kości i szkliwa zębów, angiogenezie, gojeniu ran oraz w odnowie tkanki łącznej [2-5]. Ekspresję ich genów obserwuje się głównie w fibroblastach i innych rodzajach komórek tkanki łącznej, takich jak granulocyty obojętne, monocyty, makrofagi, a także w komórkach śródbłona.

W wielu stanach patologicznych dochodzi do wzrostu aktywności MMP. Można tu wymienić rozrost nowotworowy, choroby zapalne, choroby sercowo-naczyniowe oraz autoimmunologiczne. Zwiększona aktywność tych enzymów towarzyszy wszystkim stanom patologicznym, z którymi związany jest wzmożony proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych, a więc przede wszystkim wspomnianym już chorobom nowotworowym, ale także powikłaniom cukrzycowym (retinopatia proliferacyjna), degeneracji plamki żółtej związanej z wiekiem oraz reumatoidalnemu zapaleniu stawów [2,6-8]. Aktywność MMP regulowana jest na wielu poziomach, obejmujących zdarzenia zachodzące wewnątrz komórki jak i poza nią. Zależy przede wszystkim od ekspresji genów regulowanych przez liczne cytokiny i czynniki wzrostu, ale końcowy efekt jest również wypadkową stabilizacji bądź destabilizacji ich mRNA, modyfikacji posttranslacyjnych (glikozylacji), szybkości sekrecji z komórki, aktywacji latentnych form enzymów i hamowania ich aktywności przez cząsteczki tkankowych inhibitorów metaloproteinaz macierzy (TIMP, ang. *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*), a także szybkości katabolizmu [1].

Do najlepiej poznanych przedstawicieli rodziny MMP należą kolagenazy typu IV (żelatynazy), reprezentowane przez MMP-2 i MMP-9 lub inaczej żelatynazę

Elżbieta Hrabec[✉]

Julia Naduk

Małgorzata Stręk

Zbigniew Hrabec

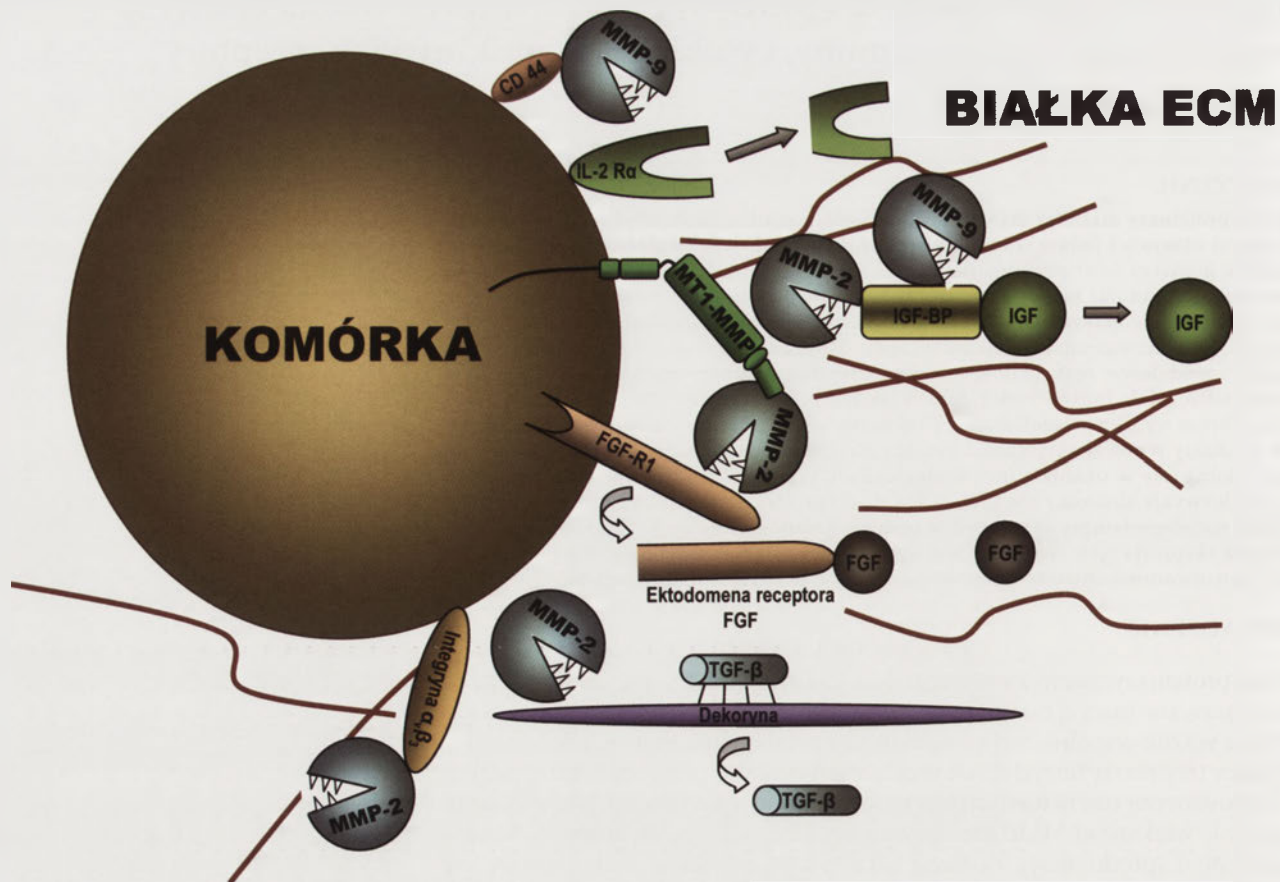
Zakład Enzymologii Medycznej, Katedra Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź

[✉]Zakład Enzymologii Medycznej, Katedra Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; e-mail: ehrabec@zdn.am.lodz.pl, tel.: (042) 678 06 20, faks: (042) 678 24 65

Artykuł otrzymano 6 listopada 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 15 grudnia 2006 r.

Słowa kluczowe: metaloproteiny macierzy, kolagenazy typu IV (MMP-2, MMP-9), substraty MMP, macierz zewnątrzkomórkowa

Podziękowanie: Praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego 502-16-196, finansowanego przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi



Rycina 1. Przykłady proteolizy z udziałem MMP-2 i MMP-9. MMP mogą koncentrować się w pobliżu błony komórkowej. Najważniejszym błonowym „receptorem” MMP-2 jest cząsteczka MT1-MMP; MMP-2 może również wiązać się z powierzchnią komórki za pośrednictwem integryny $\alpha\beta$, a MMP-9 za pośrednictwem powierzchniowego receptora CD44. MMP mogą degradować wiele białek ECM (brązowe linie) oraz nie będących składnikami ECM. Degradacja dekoryny prowadzi do uwolnienia TGF- β . Degradacja IGF-BP uwalnia IGF. MMP-9 rozszczepia receptor α IL-2 zlokalizowany na powierzchni limfocytów T, obniżając ich odpowiedź proliferacyjną na stymulację IL-2. MMP-2 rozcina związany z błoną komórkową receptor 1 FGF, uwalniając jego ektodomenę zdolną do wiązania FGF.

A i żelatynazę B i właśnie na te dwa enzymy pragniemy zwrócić uwagę Czytelników.

DEGRADACJA BIAŁEK MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ PRZEZ MMP

MMP mogą degradować wiele białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*) i błon podstawnych, które są wyspecjalizowaną formą ECM. Do ich substratów należą między innymi kolageny, lamininy, fibronektyna, elastyna, entaktyna, agrekany i tenascyna [2]. Degradując białka macierzy MMP mogą likwidować strukturalne bariery, umożliwiając tym samym inwazję komórek, tak w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Jednak białka macierzy nie stanowią pasywnego rusztowania; są dynamiczną strukturą modulującą reakcje komórek, między innymi poprzez sekwestrację makromolekuł sygnalnych, takich jak czynniki wzrostu [9]. Składniki ECM są ponadto ligandami dla komórkowych receptorów adhezyjnych – integryn, za których pośrednictwem przenoszą sygnały do wnętrza komórki [10]. Białka macierzy regulują wiele ważnych procesów; przekazują sygnały stymulujące proliferację komórek, ich różnicowanie, migrację, adhezję oraz apoptozę. Stąd prosty wniosek, że MMP, w tym także kolagenazy typu IV, dzięki zdolności do zmiany składu i strukturalnej organizacji ECM uczestniczą we wszystkich tych procesach.

Przyjmuje się powszechnie, że jedną z ważniejszych funkcji pełnionych przez MMP-2 i MMP-9 jest degradacja kolagenu typu IV, głównego składnika błon podstawnych, w tym także naczyniowej błony podstawnej. Dzięki niszczeniu tej bariery możliwa jest migracja komórek podczas morfogenezy oraz wędrówka leukocytów do ognisk zapalnych. Zdolność do degradacji białek ECM pozwala im również regulować leukocytozę oraz aktywnie uczestniczyć w procesie miejscowego wzrostu nowotworu, angiogenezie i powstawaniu przerzutów, a także niszczeniu bariery krwemózg [11-16].

Już na wstępie zwróciliśmy uwagę, że proteoliza składników ECM przez MMP nie sprowadza się wyłącznie do niszczenia fizycznych barier. Rozcinając białka macierzy MMP biorą udział w przekazywaniu sygnałów z ECM do komórki. Może się to odbywać przynajmniej na kilka sposobów:

(1) białka macierzy są rezerwuarem czynników wzrostu, które mogą być uwolnione po degradacji związanych z nimi specyficznych makromolekuł. Przykładem może być transformujący czynnik wzrostu- β (TGF- β , ang. *transforming growth factor- β*), wykazujący silne powinowactwo do dekoryny. Dekoryna, składnik ECM, jest niewielkim proteoglikanem utrzymującym integralność tkanek poprzez oddziaływanie z fibronektyną i trombospondyną. Pełni też rolę rezerwuaru TGF- β w środowisku ECM. Sekwestrując cząsteczki TGF- β

z ich błonowych receptorów, reguluje szlak transmisji sygnału z udziałem tego czynnika wzrostu. W degradacji dekarbonylacji, prowadzącej do uwolnienia TGF- β , może brać udział kilku reprezentantów MMP: MMP-2, MMP-3 i MMP-7 [17]. Biologiczne działanie TGF- β jest bardzo szerokie, a jedną z funkcji jest regulacja ekspresji genu kodującego MMP. W ten sposób, uwolniony TGF- β stymuluje transkrypcję MMP-9, ale hamuje transkrypcję genów większości induk-

cyjnych MMP; taki mechanizm zapobiega niekontrolowanemu uwalnianiu tego czynnika wzrostu.

(2) rozcinanie niektórych białek ECM może odsłaniać niedostępne regiony cząsteczki (ang. *cryptic sites*), zdolne do przekazywania sygnałów lub prowadzić do powstania produktów o zupełnie nowej aktywności biologicznej; na przykład, jedna z metaloproteinaz typu błonowego (MT1-MMP, ang. *membrane type matrix metalloproteinase*) i MMP-2 indukują migrację komórek nabłonkowych przez rozcinanie specyficznych sekwencji składnika błon podstawnych - lamininy-5 [18,19]. Komórki nabłonkowe mają zdolność adhezji do lamininy-5 dzięki obecności receptora integrynowego $\alpha_3\beta_1$. Jednak dopiero proteolityczne rozcięcie łańcucha γ_2 lamininy przez MMP, eksponujące ukryte regiony cząsteczki, nadaje komórkom zdolność do migracji.

(3) rozległa degradacja białek ECM przez MMP powoduje zniszczenie adhezyjnych połączeń pomiędzy komórką a macierzą, uniemożliwiając komórce odbiór sygnałów z otoczenia i w konsekwencji wprowadza ją w apoptozę. Przykładem takiego procesu może być sterowana hormonalnie inwolucja organów reprodukcyjnych czy gruczołów mlecznych. Redukcja masy tkanek spowodowana jest degradacją ECM i utratą komórek na skutek apoptozy [20].

Tabela 1. Substraty kolagenazy typu IV nienależące do białek ECM.

Substraty kolagenazy typu IV nienależące do białek ECM	Skutek działania mmp
pro TGF- β	aktywacja
proIL1- β	aktywacja
TNF- α	konwersja związanego z błoną komórkową proTNF- α (26 kDa) do aktywnej, wolnej cytokiny (17 kDa),
Receptor 1 FGF	uwolnienie ektodomeny receptora FGF - regulacja mitogennej i angiogennej aktywności FGF
IL-2R α	rozszczepienie receptora IL-2 α - obniżenie odpowiedzi proliferacyjnej na stymulację IL-2
IGF-BP	degradacja IGF-BP - uwolnienie IGF
IL-8	odcięcie sześciu N-końcowych reszt aminokwasowych prowadzi do powstania IL-8 (7-77) - o 10-krotnie wyższej aktywności niż IL-8
CTAP-III	inaktywacja
PF-4	inaktywacja
ENA-78	inaktywacja
SDF-1	odcięcie czterech N-końcowych aminokwasów prowadzi do utraty zdolności wiązania ze swoistym receptorem (CXCR-4)
SCF	uczestniczą w powstawaniu sSCF
MCP-3	inaktywacja
Prolaktyna	jeden z produktów degradacji - N-końcowy fragment (16 kDa) ma właściwości antyangiogenne
Plazminogen	angiostatyna (38 kDa fragment plazminogenu)- odgrywa rolę inhibitora angiogenezy
PEDF	inaktywacja
uPA	inaktywacja
α -PI	inaktywacja
α 1-antychymotrypsyna	inaktywacja
PAI-2	inaktywacja
Insulina	degradacja prowadzi do powstawania immunodominujących epitopów - skutkiem jest zaostrzenie przebiegu cukrzycy
MBP	niszczenie osłonek mielinowych
IFN- β	inaktywacja
AM	inaktywacja oraz generowanie AM (11-22) - czynnika zwężającego naczynia krwionośne
Big-ET1	aktywacja

WIELE SUBSTRATÓW MMP NIE NALEŻY DO BIAŁEK ECM

MMP znane są przede wszystkim ze zdolności do degradowania składników ECM, ale do grona ich substratów należy również wiele innych peptydów i białek (Tabela 1, Ryc. 1).

Ze względu na lokalizację (na powierzchni komórki), MMP mogą degradować powierzchniowe receptory, w tym też adhezyjne, lub uwalniać z błony komórkowej biologicznie aktywne cząsteczki. Mając zdolność do aktywacji lub inaktywacji niektórych cytokin, chemokin i czynników wzrostu regulują również sygnały parakryne. Na szczególną uwagę zasługują kolagenazy typu IV, dla których rozpoznano najwięcej substratów spoza ECM.

W komunikacji międzykomórkowej, a także w komunikacji między komórką a ECM, kluczowe znaczenie mają zdarzenia zachodzące bezpośrednio na powierzchni komórki lub w jej najbliższym otoczeniu. Wprawdzie tylko niektóre spośród MMP (MT-MMP) mają charakter enzymów błonowych, ale dzięki możliwości zakotwiczenia wolnych MMP w błonie komórkowej, może dochodzić do okołokomórkowej proteolizy również z ich udziałem. Najważniejszym błonowym „receptorem” MMP-2 jest cząsteczka MT1-MMP, uczestnicząca także (we współpracy z TIMP-2) w aktywacji tego enzymu [1,21,22].

Inny sposób zakotwiczenia MMP-2 w błonie komórkowej wymaga udziału integryn. Na przykład, za pośrednictwem integryny $\alpha_v\beta_3$ cząsteczka MMP-2 może się wiązać z powierzchnią komórek śródbłonna i komórek nowotworowych [23]. W oddziaływaniu z integryną uczestniczy domena hemopeksynowa MMP-2, a zatem takie oddziaływanie nie blokuje centrum katalitycznego enzymu. Z kolei aktyw-

na MMP-9 może wiązać się z komórką za pośrednictwem powierzchniowego receptora CD44 [23,24]. Inne MMP także mogą oddziaływać z receptorami błonowymi i gromadzić się na powierzchni komórki. Zdolność do koncentracji w pobliżu błony komórkowej stwarza dogodne warunki do trawienia niektórych substratów. Dzięki takiej strategii MMP mogą wydajnie rozcinać różne białka błonowe lub związane z błoną komórkową. Uczestniczą w ten sposób w uwalnianiu lub degradacji biologicznie aktywnych cząsteczek, które nie są składnikami ECM. Poprzez degradację białek adhezyjnych MMP mogą bezpośrednio modulować oddziaływania adhezyjne i migrację komórek. Przykładowo, podjednostka β_4 integryny może być degradowana przez MMP-7, a E-kadheryna przez MMP-3 i MMP-7. Degradacja E-kadheryny prowadzi ponadto do uwolnienia fragmentu o masie cząsteczkowej 80 kDa, który w sposób parakryny stymuluje inwazję komórek [25].

MMP MOGĄ AKTYWOWAĆ LUB UDOSTĘPNIAC CYTOKINY I CZYNNIKI WZROSTU

Zlokalizowane na powierzchni komórki MMP uczestniczą także w uwalnianiu biologicznie aktywnych cząsteczek. Wykazano, że zarówno MMP-2 jak i MMP-9 mogą aktywować proTGF- β [24,26]. TGF- β ma szerokie działanie biologiczne; jest ważnym czynnikiem immunosupresyjnym, blokującym oba typy odpowiedzi immunologicznej: komórkową i humoralną. Pobudza też syntezę białek ECM i hamuje proliferację wielu rodzajów komórek, w tym prawidłowych komórek nabłonkowych, ale stymuluje proliferację i zwiększa potencjał inwazyjny komórek nowotworowych. Udział MMP-2 i MMP-9 w rozwoju nowotworów jest bardzo dobrze udokumentowany [27], warto więc w tym miejscu zwrócić uwagę, że TGF- β , w którego aktywacji mogą uczestniczyć obie kolagenazy typu IV ma z kolei zdolność do stymulowania ich produkcji poprzez aktywację szlaku transmisji sygnału z udziałem kinazy białek aktywowanej mitogenem (p38 MAPK, ang. *mitogen activated protein kinase*) [28].

MMP mogą także aktywować prekursor interleukiny-1 β (IL-1 β , ang. *interleukin-1 β*) [29]. IL-1 β wytwarzana jest jako prekursor o masie 33 kDa, który w wyniku proteolitycznego rozszczepienia łańcucha polipeptydowego pomiędzy Asp¹¹⁶ i Ala¹¹⁷ zostaje przekształcony do aktywnej cytokiny (18 kDa). W aktywacji uczestniczy kaspaza-1, znana też jako konwertaza IL-1 β (ICE, ang. *IL-1 β -converting enzyme*) [30]. Zaproponowano również zupełnie inny sposób aktywacji tej cytokiny, z udziałem MMP [29]. W chorobach o podłożu zapalnym, takich jak miażdżyca tętnic czy reumatoidalne zapalenie stawów, dochodzi do jednoczesnego wzrostu ekspresji IL-1 β i metaloproteinaz macierzy, w tym MMP-9. Wydaje się, że w takich warunkach, proIL-1 β może być aktywowana przez MMP. *In vitro* obie kolagenazy typu IV (szczególnie MMP-9) bardzo efektywnie rozcinają prekursor IL-1 β , prowadząc do powstania produktu o pełnej aktywności biologicznej. Mniej skuteczna jest MMP-3 (stromelizyna-1), ale zaktywowana pod jej działaniem cytokina jest dalej degradowana i w konsekwencji traci właściwości biologiczne. Schönbeck i wsp. [29] postulowali, że w ogniskach zapalnych mógłby to być mechanizm regulujący dostępność aktywnej cytokiny. Jest to istotne choćby z tego powodu, że aktywna IL-1 β stymuluje ekspresję i aktywację

wielu metaloproteinaz, a zatem wzajemne oddziaływania pomiędzy MMP i IL-1 β , o charakterze dodatniego sprzężenia zwrotnego (cytokina stymuluje ekspresję genu kodującego enzym uczestniczący w jej aktywacji), będą prowadzić do zaostrzenia stanu zapalnego.

Czynnik martwicy nowotworów- α (TNF- α , ang. *tumor necrosis factor*) jest cytokiną o kluczowym znaczeniu w układzie immunologicznym i pleiotropowym działaniu. Między innymi stymuluje proliferację limfocytów T i B, zwiększa cytotosycywność komórek NK (ang. *natural killer*), pobudza sekrecję niektórych cytokin oraz stymuluje ekspresję wielu MMP. TNF- α wytwarzany jest głównie przez monocyty/makrofagi (w odpowiedzi na bodźce aktywujące receptor TLR, ang. *tool-like receptor*) jako białko błonowe o masie cząsteczkowej 26 kDa. Wiele MMP (w tym obie kolagenazy typu IV) może przeprowadzać konwersję związanego z błoną komórkową TNF- α do aktywnej, wolnej cytokiny (17 kDa), aczkolwiek główną rolę w tym procesie pełni blisko spokrewniony z MMP enzym – konwertaza TNF- α (TACE, ang. *tumor necrosis factor- α converting enzyme*) [31,32].

W przypadku insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF, ang. *insulin-like growth factor*) wykorzystana jest jeszcze inna strategia. IGF-1 i IGF-2 uczestniczą w procesie proliferacji i różnicowania komórek oraz regulują wiele funkcji metabolicznych. W przeciwieństwie do podobnej strukturalnie insuliny, prawie cały IGF osocza skompleksowany jest z białkami, tak zwanymi białkami wiążącymi insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-BP, ang. *insulin-like growth factor-binding protein*). Jak dotąd, opisano sześć rodzajów takich białek. Sekwestrując IGF, IGF-BP zazwyczaj hamują działanie tego czynnika wzrostu, uniemożliwiając jego interakcję z receptorem. Chociaż opisano kilka strategii prowadzących do uwolnienia IGF z kompleksu, wiele danych wskazuje, że proteolityczna degradacja IGF-BP przez MMP może odgrywać szczególną rolę [36,37]. Przynajmniej kilka enzymów z tej rodziny (w tym także kolagenazy typu IV) ma zdolność do rozcinania IGF-BP, a tym samym może regulować dostępność IGF, tak w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych [38].

MMP MOGĄ DEGRADOWAĆ RECEPTORY BŁONOWE LUB ODCINAĆ ICH DOMENY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWE

Poza aktywacją i uwalnianiem cytokin i czynników wzrostu, MMP mogą degradować receptory błonowe lub odcinać ich domeny zewnątrzkomórkowe (ektodomeny). MMP-2 rozcina związany z błoną komórkową receptor 1 czynnika wzrostu fibroblastów (FGF, ang. *fibroblast growth factor*), uwalniając jego ektodomenę zdolną do wiązania FGF [33]. Wydaje się, że uwolnione ektodomeny receptora FGF, łącząc się z cząsteczką czynnika wzrostu, mogą z kolei regulować jego dostępność. Z drugiej strony, odcinanie zewnątrzkomórkowych domen redukuje ilość miejsc wiążących FGF, co w efekcie może wywoływać taki sam skutek. Mogłaby to być jedna ze strategii regulowania mitogennej i angiogennej aktywności tego czynnika wzrostu. Z kolei MMP-9, rozszczepiając receptor α IL-2 (IL-2R α , ang. *interleukin-2 receptor α*), zlokalizowany na powierzchni limfocytów T, wyraźnie obniża ich odpowiedź proliferacyjną na stymulację IL-2 [34]. Może to przyspieszyć rozwój nowotworu, bowiem zdolność do ucieczki spod nadzoru immunologicz-

nego sprzyja jego szybkiej progresji. Należy w tym miejscu wspomnieć, że komórki nowotworowe stymulują produkcję i aktywację obu kolagenaz typu IV i nawet jeśli same nie syntetyzują tych enzymów to potrafią skłonić do tego komórki podścieliska guza [1,35]. Aktywowane limfocyty T także syntetyzują MMP-9, umożliwiającą im migrację przez naczyniowe błony podstawne. Wyraźny wzrost ekspresji genu kodującego ten enzym w ognisku nowotworowym i jego zdolność do degradacji IL-2R α może zatem hamować proliferację limfocytów infiltrujących guz, sprzyjając w ten sposób rozwojowi nowotworu [34].

SUBSTRATAMI MMP JEST WIELE CHEMOKIN

Do substratów MMP należy również wiele chemokin. MMP-9 odcina niewielki fragment z N-końca cząsteczki IL-8, głównego chemoatraktanta i aktywatora granulocytów obojętnochłonnych. Skrócona IL-8 (7-77) wykazuje aż 10-20 -krotnie wyższą aktywność od cząsteczki o pełnej długości. Może to oczywiście w istotny sposób przyspieszać napływ granulocytów do miejsca infekcji [39]. Warto w tym miejscu zwrócić uwagę, że aktywacja IL-8 przez MMP-9 jest przykładem dodatniego sprzężenia zwrotnego, bowiem IL-8 powoduje degranulację neutrofilii i bardzo szybkie uwolnienie MMP-9 zgromadzonej w ziarnistościach żelatynazowych. Aktywna MMP-9 może pośrednio wpływać również na stężenie IL-8, ponieważ w warunkach zapalenia aktywuje proIL-1 β , silny induktor ekspresji genu kodującego IL-8. Także inne chemokiny z rodziny CXC (chemokiny, w których dwie pierwsze z czterech zachowawczych reszt cysteinowych przedzielone są pojedynczym aminokwasem), w tym peptyd aktywujący tkankę łączną-III (CTAP-III, ang. *connective tissue activating peptide*), czynnik płytkowy-4 (PF-4, ang. *platelet factor-4*) i pochodzący z komórek śródbłonna peptyd aktywujący granulocyty obojętnochłonne (ENA-78, ang. *epithelial cell derived neutrophil activating peptide-78*) są rozpoznawane przez MMP-9, a w kontakcie z tym enzymem mogą być przecięte w kilku miejscach i tracić aktywność biologiczną [3,40]. Chemokiny z motywem sekwencyjnym ELR (Glu-Leu-Arg), poprzedzającym sekwencję CXC, do których należą między innymi IL-8, ENA-78 i CTAP-III, kierują granulocyty obojętnochłonne do miejsc infekcji, a także promują angiogenezę [40]. Związanie chemokiny CXC ze swoistym receptorem (CXCR-1, CXCR-2, ang. *CXC chemokine receptor-1, -2*) zapoczątkowuje proces przekazywania sygnału, prowadzący do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Ca²⁺. Wynikiem tego procesu jest między innymi degranulacja neutrofilii i ich migracja w kierunku wzrastającego stężenia bodźca chemotaktycznego. Degranulacja powoduje uwolnienie nieaktywnej MMP-8 i MMP-9. Po ich aktywacji (np. z udziałem reaktywnych form tlenu, produkowanych przez pobudzone granulocyty) następuje degradacja białek ECM, umożliwiającą migrację granulocytów. Zważywszy, że wiele chemokin ma charakter substratów MMP-9, można przyjąć, że enzym spełnia w tym układzie podwójną rolę: degradując białka ECM pozwala na migrację komórek, ale degradując chemokiny, także pełni funkcję regulatorową [40].

Innym reprezentantem chemokin CXC jest czynnik pochodzący z komórek zrębu szpiku kostnego (SDF-1, ang. *stromal cell-derived factor-1*), odgrywający kluczową rolę w

rekrutacji hematopoetycznych komórek prekursorowych (CD34+). SDF-1 jest również silnym chemoatraktantem dla innych typów komórek, głównie spoczynkowych limfocytów i monocytów. Odcięcie przez MMP czterech reszt aminokwasowych z N-końcowego rejonu cząsteczki SDF-1 prowadzi do utraty zdolności wiązania ze swoistym receptorem (CXCR-4). Przynajmniej sześć enzymów z tej rodziny, w tym MMP-2, rozszczepia wiązanie peptydowe pomiędzy czwartym a piątym aminokwasem cząsteczki SDF-1 [41].

Od dawna wiadomo, że CXCR-4 pełni rolę koreceptora podczas fuzji wirusa HIV-1 (ang. *human immunodeficiency virus*) i jest niezbędny do zakażenia nim komórek CD4+, a fizjologiczny ligand tego receptora (SDF-1), blokując wiązanie HIV do CXCR-4, hamuje infekcję. Zatem degradacja SDF-1 przez MMP-2 będzie ułatwiać zakażenie wirusem HIV. W tym kontekście warto odnotować, że z kolei wirus HIV ma zdolność indukowania ekspresji genów kodujących obie kolagenazy typu IV [42]. Z przewlekłym zakażeniem tym wirusem bezpośrednio związany jest zespół otępienny o cechach podostrego zapalenia mózgu. Okazało się, że MMP-2 może być bezpośrednio zaangażowana w proces neurodegeneracji, bowiem skrócona przez nią cząsteczka SDF-1 (5-67) jest wysoce neurotoksyczna [43].

Nie sposób w tym miejscu pominąć faktu, że MMP-9 zajmuje wyjątkową pozycję w procesie mobilizacji hematopoetycznych komórek macierzystych ze szpiku kostnego do krwi obwodowej. Bodźce stresowe, takie jak zapalenie, uszkodzenia tkanek czy chemioterapia indukują sekrecję wspomnianego już wcześniej SDF-1, stymulującego ekspresję MMP-9. Działanie tego enzymu w procesie mobilizacji hematopoetycznych komórek macierzystych jest złożone i obejmuje zarówno uwalnianie cytokin i czynników wzrostu związanych z ECM, niszczenie adhezyjnych połączeń pomiędzy komórkami macierzystymi a środowiskiem szpiku, jak i degradację białek ECM, umożliwiającą migrację komórek. Ale to jeszcze nie wszystko. W rekrutacji hematopoetycznych komórek prekursorowych i innych komórek macierzystych uczestniczy również czynnik wzrostu komórek macierzystych (SCF, ang. *stem cell factor*), będący ligandem dla receptora *c-kit* – białka o aktywności kinazy tyrozynowej [44,45]. SCF występuje w dwóch formach, powstających w wyniku alternatywnej obróbki potranskrypcyjnej. Eliminacja eksonu 6 prowadzi do powstania białka transbłonowego, podczas gdy cząsteczka o pełnej długości zawiera miejsce cięcia rozpoznawane przez MMP-9. Przy udziale tego enzymu powstaje forma wolna (rozpuszczalna) SCF (sSCF). Wprawdzie obie formy SCF (błonowa i rozpuszczalna) są aktywne biologicznie i wydaje się, że sSCF nie jest konieczna do prawidłowego przebiegu konstytutywnej hematopoezy, ale ma kluczowe znaczenie podczas szybkiej, indukowanej stresem mobilizacji hematopoetycznych komórek macierzystych [44].

Substratami MMP mogą być też chemokiny z rodziny CC czyli takie, w których dwie pierwsze zachowane w ewolucji reszty cysteinowe następują bezpośrednio po sobie. Przykładowo, MCP-3 (ang. *monocyte chemoattractant protein*) jest substratem MMP-2. Odłączenie czterech aminokwasów z N-końcowego rejonu cząsteczki prowadzi nie tylko do jej inaktywacji, ale przekształca ją w silnego antagonistę recep-

torów CCR-1, CCR-2 i CCR-3 (ang. *CC chemokine receptor* -1, -2, -3). Metaloproteiny, których synteza ma miejsce w granulocytach obojętnochłonnych (MMP-8, MMP-9) nie są zdolne do proteolitycznej degradacji MCP-3 [46]. Inne MCP (MCP-1, -2, -4) także są substratami MMP i w kontakcie z tymi enzymami tracą swą aktywność agonistów stanu zapalnego.

MMP MOGĄ GENEROWAĆ REGULATORY ANGIOGENEZY

Poza regulowaniem aktywności, czy też dostępności cytokin, chemokin i czynników wzrostu, MMP rozcinają również inne białka, znosząc tym samym ich funkcje biologiczne, ale często powstające produkty degradacji mają zupełnie nowe właściwości. I tak, obie kolagenazy typu IV oraz kilka innych MMP (zwłaszcza MMP-8 i MMP-13) mogą rozcinać prolaktynę, a jednym z produktów degradacji jest N-końcowy fragment (16 kDa) [47]. Prolaktyna jest hormonem laktotropowym o masie cząsteczkowej 23 kDa, wydzielanym przez przysadkę, a jej N-końcowy fragment (16 kDa), obecny w krwioobiegu i w wielu narządach, jest znany z bardzo silnych właściwości antyangiogennych; ma zdolność do hamowania proliferacji komórek śródbłonna stymulowanej zasadowym czynnikiem wzrostu fibroblastów (bFGF, ang. *basic fibroblast growth factor*) i czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*). Z kolei degradacja plazminogenu przez kolagenazy typu IV oraz MMP-7 prowadzi do powstania innego inhibitora angiogenezy – angiostatyny, stanowiącej 38 kDa fragment tego białka (cztery pierwsze pętle) [21].

Można odnaleźć jeszcze więcej przykładów, wskazujących na antyangiogenne działanie MMP, aczkolwiek chodzi tu o produkty powstające w wyniku degradacji białek ECM. Do takich inhibitorów należy endostatyna – 20 kDa proteolityczny fragment kolagenu typu XVIII i restyna – fragment kolagenu typu XVI [1]. Negatywnymi regulatorami angiogenezy są także fragmenty kolagenu IV: aresten (ang. *arresten*), kanstatyna (ang. *canstatin*) i tumstatyna (ang. *tumstatin*), pochodzące odpowiednio z łańcucha $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ tego białka. Jednak MMP są przede wszystkim bardzo skuteczne w promowaniu angiogenezy. Inwazja proliferujących komórek śródbłonna na otaczające tkanki wymaga degradacji ECM i w tych procesach uczestniczą obie kolagenazy typu IV [11]. MMP mogą również stymulować angiogenezę w jeszcze inny sposób, degradując czynniki antyangiogenne. Wykazano ostatnio, że czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (PEDF, ang. *pigment epithelium-derived factor*), silny inhibitor angiogenezy, może być niszczone przez MMP-2 i MMP-9 [6]. W ten sposób oba enzymy włączone są w patogenezę niezwykle poważnego powikłania cukrzycowego, jakim jest retinopatia proliferacyjna. Warto jednak zaznaczyć, że działanie PEDF nie ogranicza się do obszaru oka; omawiane białko jest obecne w krwioobiegu w wystarczająco wysokim stężeniu by hamować unaczynianie wtórnych ognisk nowotworowych [48].

MMP REGULUJĄ AKTYWNOŚĆ WIELU PROTEINAZ

MMP zdolne są do inaktywacji aktywatora plazminogenu typu urokinazowego (uPA, ang. *urokinase-type plasmino-*

gen activator), jak i wielu inhibitorów proteinaz serynowych, w tym inhibitora α_1 -proteinaz serynowych (α_1 -PI, ang. *α_1 -proteinase inhibitor*), α_1 -anty-chymotrypsyny i inhibitora-2 aktywatora plazminogenu (PAI-2, ang. *plasminogen activator inhibitor*) [49]. Wreszcie, w charakterze substratów MMP mogą występować inne latentne enzymy z tej rodziny, a odcięcie prodomeiny prowadzi do ich aktywacji. Przykładem może być wspomniana już wcześniej MT-1MMP, uczestnicząca w aktywacji MMP-2 [1].

MMP WŁĄCZONE SĄ W PATOGENEZĘ WIELU CHOROÓB

Ponieważ MMP-2 i MMP-9 rozpoznają tak wiele różnorodnych substratów (zarówno składników ECM, jak i spoza ECM), zachwianie równowagi pomiędzy tymi enzymami a ich naturalnymi inhibitorami (TIMP) może prowadzić do rozwoju stanów patologicznych. Kolagenazy typu IV włączone są w patogenezę wielu chorób. Niewątpliwie najwięcej wiadomo o ich udziale w rozwoju i progresji nowotworów (ten temat był już podnoszony na łamach Postępów Biochemii [2]) oraz w chorobach sercowo-naczyniowych [50]. Ostatnio dużo mówi się o roli tych enzymów w rozwoju chorób o podłożu autoimmunologicznym, takich jak cukrzyca typu I oraz stwardnienie rozsiane. Wynika to z faktu, że podczas stanu zapalnego trzustki zaktywowana MMP-9 może rozcinać insulinę na mniejsze fragmenty, a tym samym brać udział w generowaniu immunodominujących epitopów [51]. Prowadzi to do zaostrzenia przebiegu choroby. Z kolei zdolność MMP, w tym obu kolagenaz typu IV, do degradowania zasadowego białka mieliny (MBP, ang. *myelin basic protein*), jednego ze składników osłonek mielinowych, prowadzi do jej zniszczenia, a odsłanianie immunogennych epitopów wzmacnia odpowiedź immunologiczną, napędzając w ten sposób proces destrukcji w stwardnieniu rozsianym [52]. Nie bez znaczenia jest też fakt, że MMP-9 może również degradować interferon β (IFN- β), zarówno endogenny, jak i podawany w ramach kuracji, jako środek immunomodulujący [52,53]. Oczywiście szczegółowe omówienie roli MMP we wszystkich wspomnianych wcześniej stanach patologicznych przekracza ramy niniejszego artykułu. Postanowiliśmy zatem zwrócić uwagę Czytelników na udział tych enzymów w rozwoju nadciśnienia.

UDZIAŁ MMP W PATOGENEZIE CHOROBY NADCIŚNIENIOWEJ

Nadciśnienie tętnicze, niezwykle ważny czynnik ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, związane jest z procesem przebudowy układu sercowo-naczyniowego, prowadzącym do postępującego włóknienia mięśnia sercowego. MMP odgrywają istotną rolę w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych; uczestniczą w przebudowie ECM, prowadzącej do włóknienia miokardium, pogrubienia błony wewnętrznej tętnicy, a także przyczyniają się do destabilizacji blaszek miażdżycowych [54,55].

Ostatnie badania wskazują, iż rola MMP w patogenezie nadciśnienia nie sprowadza się wyłącznie do przebudowy białek ECM. Ciśnienie krwi jest regulowane dzięki współdziałaniu współczulnego układu nerwowego i grupy naczynioaktywnych peptydów takich jak adrenomedulina (AM, ang. *adrenomedullin*), peptyd pochodny genu kalcytoniny (CGRP, ang. *calcitonin-gene-related peptide*), przedsionkowy

peptyd natriuretyczny (ANP, ang. *atrial natriuretic peptide*), amylna oraz aktywna endotelina-1 (ET-1, ang. *endothelin-1*) [56,57].

Adrenomedulina, peptyd zbudowany z 52 reszt aminokwasowych, spokrewniony z kalcytoniną, CGRP i amyliną [58-60], jest silnym czynnikiem rozszerzającym naczynia, którego synteza zachodzi głównie w komórkach śródbłonna i mięśniach gładkich naczyń. Martinez i wsp. [57] wykazali, że adrenomedulina może być rozcinana przez MMP-2 w kilku miejscach, co prowadzi do powstania sześciu różnych peptydów. Odcięcie siedmiu lub dziesięciu reszt aminokwasowych z rejonu N-końcowego cząsteczki adrenomeduliny nie powoduje utraty zdolności do wiązania z receptorem, ani utraty aktywności biologicznej. AM (8-52) i AM (11-52) ma w pełni zachowaną zdolność rozszerzania naczyń krwionośnych. Jednak dalsza degradacja tych peptydów przez MMP-2 prowadzi do utraty tej funkcji, i co ciekawe, jeden z produktów degradacji, AM (11-22) jest czynnikiem obkurczającym naczynia, działającym za pośrednictwem niezidentyfikowanego jak dotąd receptora. Obecne w krwioobiegach białko wiążące adrenomedulinę, tzw. czynnik H, zapobiega degradacji tego hormonu przez MMP-2 [57].

In vitro MMP mogą degradować wiele białek nie będących składnikami ECM, ale nie do końca rozpoznano czy działają w ten sposób także *in vivo*. W przypadku adrenomeduliny jest to bardzo prawdopodobne, ponieważ takie same peptydy jakie powstawały w wyniku trawienia tego hormonu MMP-2 *in vitro*, udało się wyizolować z moczu [57]. MMP-2 może więc w znaczący sposób przyczynić się do rozwoju nadciśnienia, zważywszy, że nie tylko obniża poziom adrenomeduliny (rozszerzającej naczynia), ale także generuje peptyd o działaniu antagonistycznym. Ten sam enzym może również pośredniczyć w aktywacji prekursorów hormonów regulujących ciśnienie krwi. Duża endotelina-1 (ET-1, ang. *big endothelin-1*) (1-38) powstaje między innymi w komórkach śródbłonna, komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych i kardiomiocytach. Jest czynnikiem inotropowym, bardzo silnie obkurcza naczynia krwionośne, ale także działa jako mitogen [61]. Na terenie śródbłonna naczyń przekształcenie dużej ET-1 do aktywnego hormonu zachodzi głównie przy udziale enzymów konwertujących endoteliny (ECEs, ang. *endothelin-converting enzymes*). Aktywność tych enzymów w komórkach śródbłonna jest bardzo wysoka, a proteolityczne rozszczepienie dużej ET-1 za ich pośrednictwem prowadzi do powstania aktywnego peptydu ET-1(1-21) [62]. W wielu chorobach sercowo-naczyniowych obserwowano podniesiony poziom ET-1 w osoczu [63-65].

Fernandez-Patron i wsp. [66] wykazali, że duża endotelina-1 może być także przekształcana do aktywnego hormonu przy udziale MMP-2. Pod wpływem działania tego enzymu, w wyniku rozszczepienia wiązania pomiędzy Gly³² a Leu³³, powstaje peptyd ET-1(1-32), wykazujący silniejsze działanie skurczowe niż ET-1(1-21). W przeciwieństwie do komórek śródbłonna, w komórkach mięśni gładkich naczyń, aktywność ECE jest niska, ale zachodzi w nich ekspresja MMP-2. Wydaje się zatem prawdopodobne, że w tych komórkach MMP-2 mogłaby pośredniczyć w alternatywnej drodze ak-

tywacji ET-1 [66]. Za istnieniem takiego mechanizmu przemawia też fakt, że w wielu stanach patologicznych, takich jak nadciśnienie, miażdżyca i restenoza obserwuje się jednoczesny wzrost syntezy dużej ET-1 i MMP-2.

Odkrycie nowej drogi aktywacji ET-1, w której pośredniczy MMP-2, może mieć istotne znaczenie farmakologiczne. W wielu laboratoriach prowadzone są prace zmierzające do skonstruowania syntetycznych, selektywnych inhibitorów metaloproteinaz. Selektywne hamowanie MMP-2 mogłoby stanowić nową farmakologiczną strategię leczenia chorób naczyń, w których obserwowana jest nadekspresja genów zarówno dla MMP-2, jak i dla ET-1.

UWAGI KOŃCOWE

Przytoczone powyżej fakty wskazują, że obie kolagenazy typu IV mają niezwykle szerokie możliwości modulowania środowiska, w którym przebywa komórka. O ile ich zdolność do degradowania strukturalnych białek ECM (prze- de wszystkim kolagenu typu IV) była znana od dawna, to ostatnio pojawia się coraz więcej informacji wskazujących, że mogą także degradować wiele biologicznie aktywnych molekuł, takich jak cytokiny, hormony, chemokiny, czynniki wzrostu, receptory błonowe i wiele innych białek spoza ECM. Tym samym, kolagenazy typu IV zyskały nowe oblicze. Można powiedzieć, że awansowały do roli ważnych enzymów regulujących podstawowe funkcje komórki. Bez wątplenia, na szczególną uwagę zasługuje MMP-9, która jest nie tylko efektem, ale też regulatorem wielu funkcji komórek obronnych. Nie jest więc niczym zaskakującym, że MMP włączone są w patogenezę wielu chorób, między innymi nowotworowych, układu krążenia, nadciśnienia, ostrych i przewlekłych chorób układu oddechowego oraz chorób przyzębia. Z tego powodu zaczęto poszukiwać sposobu zahamowania ich aktywności. Skonstruowano wiele syntetycznych inhibitorów tych enzymów. Batimastat a następnie marimastat przeszły próby kliniczne już w drugiej połowie lat 90. Pierwsze inhibitory MMP wprowadzone do badań klinicznych miały bardzo małą selektywność (hamowały aktywność wielu enzymów z tej rodziny), a ponadto ich stosowanie związane było z uciążliwymi efektami ubocznymi, między innymi w postaci bólów mięśni i stawów. Inhibitory nowej generacji są znacznie bardziej selektywne, ale pomimo tego, stosowanie takich leków nie doprowadziło do spektakularnych sukcesów w terapii przeciwnowotworowej. Może to wynikać z faktu, że rola tych enzymów w procesie nowotworowym nie jest tak jednoznaczna jak pierwotnie sądzono; MMP, a zwłaszcza kolagenazy typu IV niewątpliwie sprzyjają unaczynieniu guza ale z ich udziałem mogą przecież także powstawać inhibitory angiogenezy.

PIŚMIENNICTWO

1. Hrabec E (2003) Udział kolagenaz typu IV w procesach patologicznych. Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź, str. 18-48
2. Przybyłowska K, Błasiak J (2001) Metaloproteinazy macierzowe i ich rola w progresji nowotworów. Postępy Biochem 47: 212-222
3. Ortega N, Behonick D, Stickens D, Werb Z (2003) How proteases regulate bone morphogenesis. Ann N Y Acad Sci 995: 109-116
4. Vu TH, Werb Z (2000) Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. Genes Dev 14: 2123-2133

5. Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C (2004) Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 48: 411-424
6. Notari L, Miller A, Martinez A, Amaral J, Ju M, Robinson G, Smith LE, Becerra SP (2005) Pigment epithelium-derived factor is a substrate for matrix metalloproteinase type 2 and type 9: implications for downregulation in hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 2736-2747
7. Wong WT, Rex TS, Auricchio A, Maguire AM, Chung D, Tang W, Bennett J (2004) Effect of over-expression of pigment epithelium derived factor (PEDF) on developing retinal vasculature in the mouse. *Mol Vis* 10: 837-844
8. Bainbridge J, Sivakumar B, Paleolog E (2006) Angiogenesis as a therapeutic target in arthritis: lessons from oncology. *Curr Pharm Des* 12: 2631-2644
9. Kresse H, Schonherr E (2001) Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J Cell Physiol* 89: 266-274
10. Ffrench-Constant C, Colognato H (2004) Integrins: versatile integrators of extracellular signals. *Trends Cell Biol* 14: 678-686
11. Rundhaug JE (2005) Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9: 267-285
12. Zaoui P, Cantin JF, Alimardani-Bessette M, Monier F, Halimi S, Morel F, Cordonnier D (2000) Role of metalloproteases and inhibitors in the occurrence and progression of diabetic renal lesions. *Diabetes Metab* 26: 25-29
13. Ishida Y, Migita K, Izumi Y, Nakao K, Ida H, Kawakami A, Abiru S, Ishibashi H, Eguchi K, Ishii N (2004) The role of IL-18 in the modulation of matrix metalloproteinases and migration of human natural killer (NK) cells. *FEBS Lett* 569: 156-160
14. Shigemori Y, Katayama Y, Mori T, Maeda T, Kawamata T (2006) Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. *Acta Neurochir Suppl* 96: 130-133
15. Gurney KJ, Estrada EY, Rosenberg GA (2006) Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation. *Neurobiol Dis* 23: 87-96
16. Li WP, Anderson CJ (2003) Imaging matrix metalloproteinase expression in tumors. *Q J Nucl Med* 47: 201-208
17. Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y (1997) Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of a cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta-1 release. *Biochem J* 322: 809-814
18. Kawano K, Yanagisawa S (2006) Predictive value of laminin-5 and membrane type 1-matrix metalloproteinase expression for cervical lymph node metastasis in T1 and T2 squamous cell carcinomas of the tongue and floor of the mouth. *Head Neck* 28: 525-533
19. Guo P, Imanishi Y, Cackowski FC, Jarzynka MJ, Tao HQ, Nishikawa R, Hirose T, Hu B, Cheng SY (2005) Up-regulation of angiopoietin-2, matrix metalloprotease-2, membrane type 1 metalloprotease, and laminin 5 gamma 2 correlates with the invasiveness of human glioma. *Am J Pathol* 166: 877-90
20. Sorrell DA, Szymanowska M, Boutinaud M, Robinson C, Clarkson RW, Stein T, Flint DJ, Kolb AF (2005) Regulation of genes encoding proteolytic enzymes during mammary gland development. *J Dairy Res* 72: 433-441
21. Pepper MS (2001) Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1104-1117
22. Itoh Y, Seiki M (2006) MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Physiol* 206: 1-8
23. van Hinsbergh VW, Engelse MA, Quax PH (2006) Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 716-728
24. Yu Q, Stamenkovic I (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14: 163-176
25. Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M (2001) Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-11. *J Cell Sci* 114: 111-118
26. Wang M, Zhao D, Spinetti G, Zhang J, Jiang LQ, Pintus G, Monticone R, Lakatta EG (2006) Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta1-type II receptor signaling within the aged arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1503-1509
27. Fingleton B (2006) Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. *Front Biosci* 11: 479-491
28. Kim ES, Kim MS, Moon A (2004) TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. *Int J Oncol* 25: 1375-1382
29. Schönbeck U, Mach F, Libby P (1998) Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* 161: 3340-3346
30. Dinarello CA (2005) Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Biol* 218: 1355-1359
31. Black RA, Doedens JR, Mahimkar R, Johnson R, Guo L, Wallace A, Virca D, Eisenman J, Slack J, Castner B, Sunnarborg SW, Lee DC, Cowling R, Jin G, Charrier K, Peschon JJ, Paxton R (2003) Substrate specificity and inducibility of TACE (tumour necrosis factor alpha-converting enzyme) revisited: the Ala-Val preference, and induced intrinsic activity. *Biochem Soc Symp* 70: 39-52
32. MacEwan DJ (2002) TNF ligands and receptors-a matter of life and death. *Br J Pharmacol* 135: 855-875
33. Levi E, Fridman R, Miao HQ, Ma YS, Yayon A, Vlodavsky I (1996) Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7069-7074
34. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH (2001) A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res* 61: 237-242
35. Bachmeier BE, Iancu CM, Jochum M, Nerlich AG (2005) Matrix metalloproteinases in cancer: comparison of known and novel aspects of their inhibition as a therapeutic approach. *Expert Rev Anticancer Ther* 5: 149-163
36. Larsen PH, DaSilva AG, Conant K, Yong VW (2006) Myelin formation during development of the CNS is delayed in matrix metalloproteinase-9 and -12 null mice. *J Neurosci* 26: 2207-14
37. Coppock HA, White A, Aplin JD, Westwood M (2004) Matrix metalloprotease-3 and -9 proteolyze insulin-like growth factor-binding protein-1. *Biol Reprod* 71: 438-443
38. Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F, Sedlacek R (2003) Matrix Metalloproteinase 19 Regulates Insulin-like Growth Factor-mediated Proliferation, Migration, and Adhesion in Human Keratinocytes through Proteolysis of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3. *Mol Biol Cell* 14: 4569-4580
39. Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G (2000) Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96: 2673-2681
40. Van den Steen PE, Wuyts A, Husson SJ, Proost P, Van Damme J, Opdenakker G (2003) Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *Eur J Biochem* 270: 3739-3749
41. Mc Quibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power Ch, Clark-Lewis I, Overall ChM (2001) Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem* 276: 43503-43508
42. Johnston JB, Jiang Y, van Marle G, Mayne MB, Ni W, Holden J, McArthur JC, Power C (2000) Lentivirus infection in the brain induces matrix metalloproteinase expression: role of envelope diversity. *J Virol* 74: 7211-7220
43. Zhang K, McQuibban GA, Silva C, Butler GS, Johnston JB, Holden J, Clark-Lewis I, Overall CM, Power C (2003) HIV-induced metalloproteinase processing of the chemokine stromal cell derived factor-1 causes neurodegeneration. *Nat Neurosci* 6: 1064-1071

44. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S (2002) Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109: 625-637
45. Kollet O, Dar A, Shivtiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, Tesio M, Samstein RM, Goichberg P, Spiegel A, Elson A, Lapidot T (2006) Osteoclasts degrade osteocalcin components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* 12: 657-664
46. Overall CM, McQuibban GA, Clark-Lewis I (2002) Discovery of chemokine substrates for matrix metalloproteinases by exosite scanning: a new tool for degradomics. *Biol Chem* 383: 1059-1066
47. Macotella Y, Aguilar MB, Guzman-Morales J, Rivera JC, Zermeño C, Lopez-Barrera F, Nava G, Lavalle C, Martínez de la Escalera G, Clapp C (2006) Matrix metalloproteinases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci* 119: 1790-1800
48. Petersen SV, Valnickova Z, Enghild JJ (2003) Pigment-epithelium-derived factor (PEDF) occurs at a physiologically relevant concentration in human blood: purification and characterization. *Biochem J* 374: 199-206
49. Sternlicht MD, Werb Z (1999) ECM proteinases. W: *Guidebook to the Extracellular Matrix, anchor and adhesion Proteins*. Kreis T, Vale R (red) Oxford Univ Press, Oxford, str. 503-562
50. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L (2003) Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 107: 1579-1585
51. Descamp FJ, Martens E, Ballaux F, Geboes K, Opdenakker G (2004) In vivo activation of gelatinase B/ MMP-9 by trypsin in acute pancreatitis is a permissive factor in streptozotocin-induced diabetes. *J Pathol* 204: 555-561
52. Kurzepa J, Bartosik-Psujek H, Suchozebrska-Jesionek D, Rejdak K, Stryjenka-Zimmer M, Stelmasiak Z (2005) Rola metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w patogenezie stwardnienia rozsianego. *Neurol Neurochir Pol* 39: 63-67
53. Opdenakker G, Nelissen I, Damme JV (2003) Functional roles and therapeutic targeting of gelatinase B and chemokines in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2: 747-56
54. D'Armiento J (2002) Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction. *Trends Cardiovasc Med* 12: 97-101
55. Newby AC (2005) Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 85: 1-31
56. Overall CM (2004) Dilating the degradome: matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) cuts to the heart of the matter. *Biochem J* 383: e5-7
57. Martínez A, Oh HR, Unsworth EJ, Bregonzio C, Saavedra JM, Stetler-Stevenson WG, Cuttitta F (2004) Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem J* 383: 413-418
58. Martínez A, Julian M, Bregonzio C, Notari L, Moody TW, Cuttitta F (2004) Identification of vasoactive nonpeptidic positive and negative modulators of adrenomedullin using a neutralizing antibody-based screening strategy. *Endocrinology* 145: 3858-3865
59. Postuła M, Makowiecka-Cieśla M, Prejbisz A, Januszewicz A (2003) Adrenomedullina w nadciśnieniu tętniczym i innych chorobach układu sercowo-naczyniowego. *Nadciśnienie tętnicze* 7: 105-114
60. Nicholls MG (2004) Hemodynamic and hormonal actions of adrenomedullin. *Braz J Med Biol Res* 37: 1247-1253
61. Giannessi D, Del Ry S, Vitale RL (2001) The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol Res* 43: 111-126
62. D'Orleans-Juste P, Plante M, Honore JC, Carrier E, Labonte J (2003) Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol* 81: 503-510
63. Yip HK, Wu CJ, Chang HW, Yang CH, Yu TH, Chen YH, Hang CL (2005) Prognostic value of circulating levels of endothelin-1 in patients after acute myocardial infarction undergoing primary coronary angioplasty. *Chest* 127: 1491-1497
64. Parker JD, Thiessen JJ (2004) Increased endothelin-1 production in patients with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 28: H1141-1145
65. Cardillo C, Campia U, Iantorno M, Panza JA (2004) Enhanced vascular activity of endogenous endothelin-1 in obese hypertensive patients. *Hypertension* 43: 36-40
66. Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST (1999) Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* 85: 906-911

Substrates of matrix metalloproteinases

Elżbieta Hrabec[✉], Julia Naduk, Małgorzata Stręk, Zbigniew Hrabec

Department of Medical Enzymology, Medical University of Łódź, 6/8 Mazowiecka St., 92-215 Łódź

✉e-mail: ehrabec@zdn.am.lodz.pl

Key words: matrix metalloproteinases, MMP, type IV collagenases, extracellular matrix

ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-dependent endopeptidases that cleave protein components of extracellular matrix such as collagens, laminin, fibronectin, proteoglycans and contribute to cell migration by eliminating the surrounding extracellular matrix and basement membrane barriers. However, the extracellular matrix is not simply an extracellular scaffold because, for example, it contains sites that can bind growth factors; therefore, degradation of the extracellular matrix components by MMPs can alter cellular behavior. MMPs also cleave a variety of non-ECM proteins, including cytokines, chemokines, and growth factors, activating or inactivating them, or generating other products that have biological consequences. The immune system is also influenced by MMPs. For that reason, the function of MMPs is much more complex and subtle than simple demolition. MMPs are essential for embryonic development and morphogenesis, however, exuberant expression of these enzymes has been associated with a variety of destructive diseases, including tumor progression, cardiovascular diseases and autoimmune diseases.

Małgorzata Alicja Śliwińska

Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, Warszawa

Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: m.sliwiska@nencki.gov.pl, tel.: (022) 589 22 50

Artykuł otrzymano 30 października 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 14 grudnia 2006 r.

Słowa kluczowe: laminy, laminopatie, progeria Hutchinson-Gilford,

Wykaz skrótów: BAF (ang. *barrier to autointegration factor*) – represor transkrypcji; CDK (ang. *cyclin dependent kinase*) – kinaza cykliczna; E2F – czynnik transkrypcyjny; ER (ang. *endoplasmic reticulum*) – siateczka śródplazmatyczna; FACE 1 (ang. *farnesylated proteins-converting enzyme 1*) – metaloproteinaza zależna od jonów cynku; FTI (ang. *farnesyl transferase inhibitor*) – inhibitor transferazy farnesylowej; GCL (ang. *germ cell-less*) – represor transkrypcji; HGPS (ang. *Hutchinson-Gilford progeria syndrome*) – progeria Hutchinson-Gilford; HP1 (ang. *heterochromatin protein 1*) – nie-histonowe białko uczestniczące w tworzeniu heterochromatyny i wyciszaniu genów; INM (ang. *inner nuclear membrane*) – wewnętrzna błona jądrowa; LAP (ang. *lamin associated protein*) – białko związane z laminami; LMNA – gen kodujący laminy typu A; LMNB1 – gen kodujący laminy B1; LMNB2 – gen kodujący laminy B2 i B3; MDM2 (ang. *murine double minute 2*) – ligaza ubiquitylowa, negatywny regulator białka p53; ONM (ang. *outer nuclear membrane*) – zewnętrzna błona jądrowa; OCT-1 (ang. *octamer-binding transcription factor 1*) – czynnik transkrypcyjny; Rb (ang. *retinoblastoma protein*) – białko retinoblastoma; Rce1 (ang. *prenyl protein protease Rce1*) – proteaza białek prenylowanych; SREBP-1 (ang. *steroid response element binding protein-1*) – czynnik transkrypcyjny, WRN – gen kodujący helikazę DNA; ZMPST24 (ang. *zinc metalloproteinase STE24 homolog*) – metaloproteinaza zależna od jonów cynku

Podziękowanie: Chciałabym bardzo serdecznie podziękować Pani Prof. dr hab. Ewie Sikorze, za cenne uwagi, życzliwą krytykę i cierpliwość podczas redagowania tego manuskryptu

STRESZCZENIE

Laminy są białkami należącymi do rodziny filamentów pośrednich typu V. Wiadomo już, że są one nie tylko białkami strukturalnymi jądra komórki, ale też wpływają na strukturę chromatyny, regulują ekspresję genów, warunkują rozmieszczenie i prawdopodobnie stabilność innych białek. Tak jak laminy pełnią wiele różnych funkcji w komórce, tak też mutacje genów kodujących te białka mogą w różny sposób wpływać na komórkę i w rezultacie mieć różne skutki. Mutacje genu *LMNA* są przyczyną licznych chorób zwanych laminopatiami. Wśród laminopatii znajdują się choroby dotyczące tkanki mięśniowej, tłuszczowej, aksonów, a także progerie, czyli choroby objawiające się przedwczesnym starzeniem, m.in. progeria Hutchinson-Gilford (HGPS). Wydaje się, że te same mechanizmy molekularne, które są odpowiedzialne za przedwczesne starzenie komórek pacjentów z HGPS, przyczyniają się do starzenia komórek prawidłowych.

WPROWADZENIE

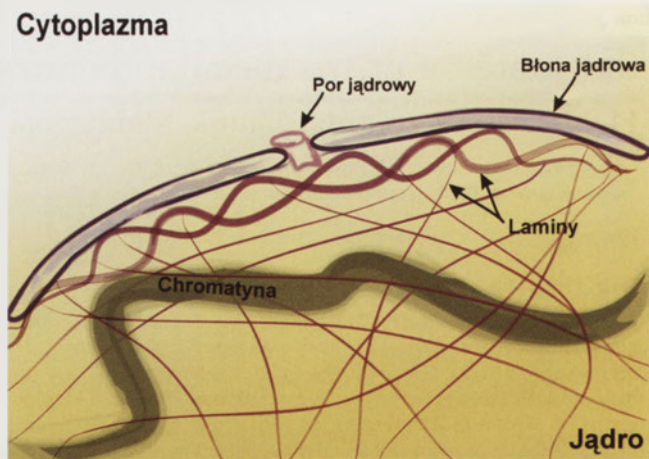
Jedną z cech odróżniających komórkę eukariotyczną od prokariotycznej jest obecność jądra komórkowego, organelum wydzielonego z cytoplazmy otoczką jądrową. W skład otoczki jądrowej wchodzi podwójna błona jądrowa, kompleksy białek porów jądrowych oraz lamina jądrowa (ang. *nuclear lamina*), zwana także blaszką jądrową. Błonę jądrową tworzą dwie błony: zewnętrzna (ONM, ang. *outer nuclear membrane*) i wewnętrzna (INM, ang. *inner nuclear membrane*), łączące się w miejscach, gdzie znajdują się pory jądrowe – kompleksy białek regulujących transport pomiędzy jądrem a cytoplazmą. Zewnętrzna błona jądrowa przechodzi w siateczkę śródplazmatyczną i posiada podobne biochemiczne i funkcjonalne właściwości, natomiast cechą charakterystyczną dla wewnętrznej błony jądrowej jest obecność białek błonowych zwanych transbłonowymi białkami otoczki jądrowej, kotwiczonych w błonie podczas interfazy [1].

Tuż pod wewnętrzną błoną jądrową znajduje się blaszka jądrowa będąca siecią białkową oddziałującą z różnymi białkami i chromatyną, zapewniająca strukturalną integralność otoczki jądrowej [2]. Głównym składnikiem blaszki jądrowej są laminy (ang. *lamins*) – białka należące do rodziny filamentów pośrednich (Ryc. 1).

Zainteresowanie otoczką jądrową znacznie wzrosło od kiedy odkryto, że mutacje w genach zarówno białek błony jądrowej, jak i lamin czy białek kompleksów porów jądrowych są przyczyną licznych chorób dziedzicznych określanых wspólną nazwą laminopatii (ang. *laminopathies*) jeśli mutacja dotyczy genów lamin lub otoczkopatii (ang. *envelopathies*), jeśli mutacje zaszły w obrębie genów białek INM lub porów jądrowych [1]. Ponadto zmiany w ekspresji lamin coraz częściej łączy się z rozwojem nowotworów [1,3,4].

LAMINY – PIERWSZA ODSŁONA

Laminy są to białka należące do rodziny filamentów



Rycina 1. Rozmieszczenie lamin w jądrze. Zaznaczono główne elementy budowy jądra: podwójną błonę jądrową, por oraz laminy tworzące blaszkę jądrową.

pośrednich typu V. Podobnie jak wszystkie filamenty pośrednie również laminy składają się z trzech części: krótkiej N-końcowej domeny (ang. *head domain*), centralnej α -helicoidalnej domeny (ang. *rod domain*) oraz C-końcowej domeny globularnej (ang. *tail domain*). Ze względu na strukturę białkową i wzór ekspresji laminy podzielono na laminy typu A i B [5].

U zwierząt kręgowych syntetyzowane są liczne laminy, zarówno w formie specyficznej dla komórek linii rozrodczej, embrionów i komórek somatycznych. W komórkach człowieka występują trzy różne geny lamin (*LMNA*, *LMNB1* i *LMNB2*), kodujące w sumie siedem różnych białek (cztery laminy typu-A oraz trzy laminy typu-B). Wszystkie cztery laminy typu-A (A, A Δ 10, C, C2) są produktami różnicowego cięcia i składania mRNA (ang. *splicing*) genu *LMNA*. W większości zróżnicowanych komórek głównymi produktami genu *LMNA* są laminy A i C. Lamina A Δ 10 pozbawiona jest egzonu 10, wykryto ją w komórkach nowotworowych, ale też w licznych typach komórek prawidłowych, natomiast lamina C2 jest produktem genu *LMNA* specyficznym dla komórek linii rozrodczej [1,6]. Jak dotąd opisano trzy laminy typu-B. Lamina B1 wydaje się unikalnym produktem genu *LMNB1*, zaś w wyniku różnicowego cięcia i składania mRNA genu *LMNB2* powstaje lamina B2 występująca w większości komórek oraz lamina B3, która ulega ekspresji jedynie w spermatozoidach [1].

Laminy stanowią substrat kinazy cyklinozależnej 1 (CDK1) oraz kinaz mitotycznych. Podczas interfazy i mitozy laminy ulegają fosforylacji, blaszka jądrowa rozpada się, zaś tworzące ją laminy typu-A (A i C) rozpraszają się

w postaci rozpuszczalnych dimerów, podczas gdy laminy typu-B (B1 i B2) pozostają w kontakcie z błonami [1]. Laminy typu-A i B różnią się nie tylko zachowaniem podczas mitozy, ale także odmiennym wzorem ekspresji w komórkach. Laminy typu-B zapewniają integralność jądra komórkowego, są niezbędne do przeżycia komórki, jak też prawidłowego rozwoju [1,7]. Laminy B1 i B2 występują w większości komórek, zarówno w życiu płodowym, jak i w komórkach organizmu dorosłego. W przeciwieństwie do lamin typu-B, które uważa się za podstawowe elementy budujące laminy jądrowe, laminy typu-A wydają się pełnić bardziej wyspecjalizowane funkcje, a ich ekspresja zazwyczaj skorelowana jest z różnicowaniem komórki [1]. Świadczy o tym fakt, że zarodki ludzkie pozbawione lamin typu-A umierają jeszcze w czasie życia płodowego lub wkrótce po urodzeniu, podczas gdy komórki bez lamin A i C w hodowli dzielą się prawidłowo [1,7].

Karioszkielet tworzony przez laminy pomaga w organizacji kompleksów białkowych w obrębie jądra, ich interakcji z chromatyną, jak również zapewnia strukturalną podporę jądra [8]. Laminy uczestniczą w regulacji ekspresji genów i replikacji DNA, niemniej mechanizm tego procesu nie jest do końca poznany.

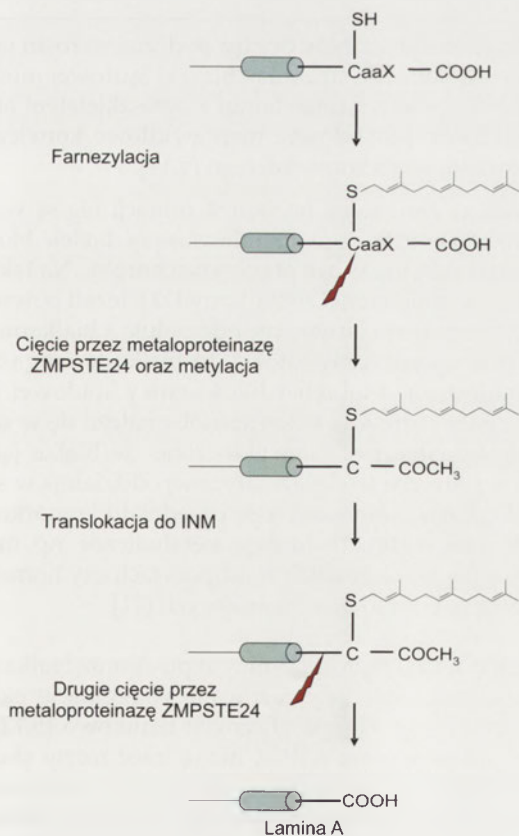
OD PRELAMINY DO LAMINY

Wszystkie laminy z wyjątkiem laminy C powstają jako pre-laminy, posiadające na C-końcu motyw CaaX (cysteina, dwa aminokwasy alifatyczne, dowolny aminokwas), zwany również Caax-box [5]. Motyw ten podlega sekwencji zdarzeń prowadzących do farnezytacji i metylacji zawartej w nim reszty cysteiny. Przyłączenie grupy farnezylowej do reszty cysteiny zachodzi w nukleoplazmie i jest sygnałem do proteolitycznego odcięcia grupy aaX, a następnie metylacji tejże cysteiny [1,9,10]. (Ryc. 2). Zarówno farnezytacja, jak i metylacja, są procesami niezbędnymi by lamina A i laminy typu-B mogły zostać zakotwiczone w INM. Jednakże z chwilą przemieszczenia do INM drogi laminy A i laminy typu-B rozchodzą się. Podczas gdy laminy typu-B pozostają farnezylowane przez cały okres trwania, lamina A ulega cięciu przez metaloproteinazę zależną od cynku ZMPSTE24 (FACE-1) w obrębie sekwencji zlokalizowanej piętnaście reszt aminokwasowych powyżej farnezylowanej reszty cysteiny. W ten sposób powstaje ostateczna forma laminy A. Utracie grupy farnezylowej lamina A zawdzięcza właściwości rozpuszczalne podczas mitozy, gdyż w tej formie białko to nie jest w stanie pozostać związane z błoną z chwilą gdy dochodzi do rozpadu blaszki jądrowej.

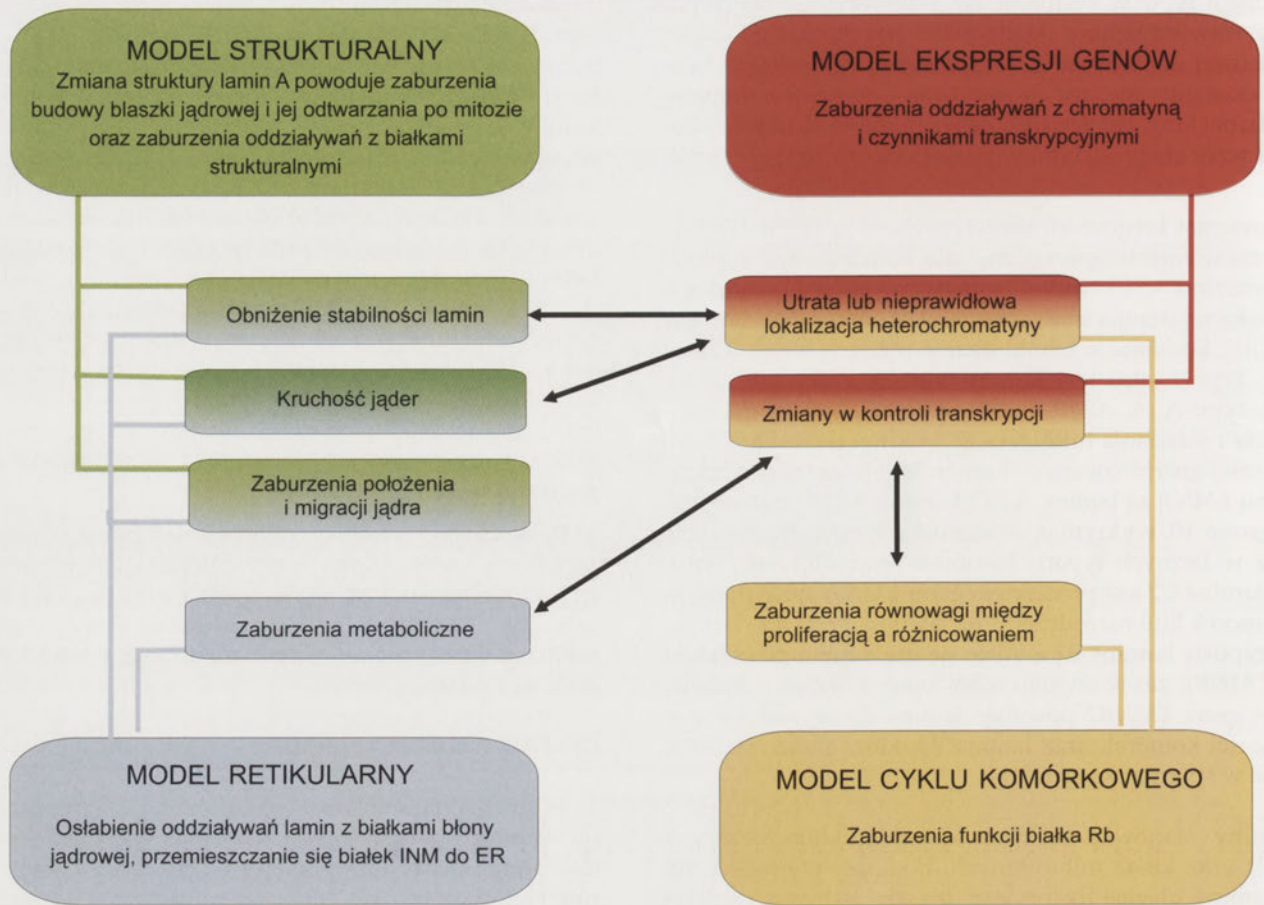
Badania *in vitro* wykazały, że metaloproteinaza ZMPSTE24 jest niezbędna do przeprowadzenia tylko drugiej endoproteolizy w procesie obróbki laminy A, natomiast pierwsza (odcięcie grupy aaX) może zostać przeprowadzona przez ZMPSTE24 lub Rce1 (ang. *prenyl protein protease 1*) [8].

DRASTYCZNE SKUTKI DROBNEJ ZMIANY - MUTACJE GENU *LMNA*

Jak dotąd nie są znane choroby dziedziczne związane z mutacjami w genach *LMNB1* i *LMNB2*, przypuszczalnie mu-



Rycina 2. Od pre-laminy do laminy. Na schemacie przedstawiono modyfikacje posttranslacyjne jakimi ulega pre-lamina A nim stanie się lamina A.



Rycina 3. Hipotetyczne modele próbujące wyjaśnić molekularne podstawy laminopatii. Przedstawiono proponowane przyczyny (tuż pod nazwą modelu) oraz skutki na podstawie [11].

tacje takie są letalne [5]. Natomiast wykryto już ponad 150 mutacji w genie *LMNA* odpowiadających za różne choroby dziedziczne zwane laminopatiami (aktualny wykaz dostępny jest na stronie internetowej „Leiden muscular dystrophy pages” pod adresem http://www.dmd.nl/lmna_home.html).

Wśród chorób wynikających z mutacji genu kodującego laminy typu-A są m.in. choroby dotyczące układu mięśniowego (dystrofia Emery-Dreifuss), tkanki tłuszczowej (syndrom Seip) oraz aksonów (choroba Charcot-Marie-Tooth typu 2) [1,5,6]. Niedawno wykazano również związek mutacji w genie *LMNA* z chorobami objawiającymi się przedwczesnym starzeniem, m.in. progerią Hutchinson-Gilford (HGPS) czy nietypowym syndromem Wernera [5,6].

Pytanie jak to się dzieje, że mutacje jednego genu powodują tak liczne i różnorodne choroby nadal pozostaje otwarte. Zaproponowano cztery modele próbujące na nie odpowiedzieć (Ryc. 3).

Pierwszy, zwany strukturalnym, opiera się na założeniu, że podstawową funkcją lamin jest ochrona strukturalnej integralności jądra komórki. Zgodnie z tym założeniem mutacje lamin A osłabiają strukturę blaszki jądrowej i zmieniają jej właściwości mechaniczne czyniąc ją bardziej podatną na czynniki stresowe. Ponadto, mutacje mogą powodować zmiany budowy cząsteczek lamin, co może wpływać na łączenie się tych białek podczas odtwarzania blaszki jądrowej

po podziale mitotycznym, czy też podczas wzrostu jądra w interfazie. Osłabienie struktury blaszki jądrowej może także destabilizować wiązanie lamin z cytoszkieletem aktynowym, co może powodować nieprawidłowe kotwiczenie i lokalizowanie jądra komórkowego [5,11].

Laminy A zmienione na skutek mutacji nie są w stanie zapewnić prawidłowego rozmieszczenia białek błony jądrowej, co także może być przyczyną choroby. Na takim założeniu opiera się model retikularny [11]. Jeżeli powstałe ze zmutowanego genu laminy nie oddziałują z białkami błony jądrowej w sposób prawidłowy, to białka te mogą zacząć się przemieszczać w obrębie dwuwarstwy lipidowej, jak też poprzez pory jądrowe i w ten sposób znaleźć się w siateczce śródplazmatycznej. Niewykluczone, że białka jądrowe obecne w siateczce śródplazmatycznej oddziałują w sposób niefizjologiczny z białkami tego przedziału komórkowego, co może mieć wpływ na funkcje metaboliczne, np. metabolizm kwasów tłuszczowych w adipocytach czy homeostazę wapniową w komórkach mięśniowych [11].

Inny model zakłada, że laminy typu-A oraz białka z nimi związane mogą być zaangażowane w regulację ekspresji genów, również tych specyficznych tkankowo [5,12]. Dlatego też mutacje genu *LMNA* mogą mieć różny skutek w różnych komórkach. Laminy A powstałe ze zmutowanego genu mogą powodować zaburzenia ekspresji genów zarówno bezpośrednio, poprzez oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi, jak i na poziomie epigenetycznym wpływ-

wając na tworzenie heterochromatyny. W grupie regulatorów transkrypcyjnych podejrzewanych o oddziaływanie z laminami lub/i białkami LAP (ang. *lamin associated proteins*) są m.in. białka takie jak OCT-1 (ang. *octamer-binding transcription factor 1*), GCL (ang. *germ cell-less*), SREBP-1 (ang. *steroid response element binding protein-1*), BAF (ang. *barrier to autointegration factor*) oraz białko Rb (ang. *retinoblastoma protein*), niemniej mechanizm molekularny leżący u podstaw regulacji funkcji tych białek przez laminy nie jest jasny [5,11,13].

Niedawno zaproponowano również czwarty model, model cyklu komórkowego, podkreślający rolę lamin typu-A w proliferacji komórek [11]. Zgodnie z tą hipotezą mutacje *LMNA* przyczyniają się do zaburzeń kontroli proliferacji komórek, zwłaszcza ponownego wejścia w cykl komórkowy komórek organizmu dorosłego. Molekularny mechanizm tego procesu nie jest jeszcze znany. Przypuszczalnie laminy uczestniczą w zależnym od białka Rb mechanizmie kontroli równowagi między proliferacją a różnicowaniem komórek. Badania przeprowadzone na mioblastach ze zmutowaną, powodującą dystrofię formą laminy A wykazały, że komórki te nie są w stanie różnicować *in vitro*, zaś w komórkach myszy *LMNA*-null poziom białka Rb jest znacznie obniżony. W komórkach tych myszy białko Rb jest gwałtownie degradowane przez proteasom, zatem najprawdopodobniej kompleksy lamin A/C chronią je przed proteasomalną degradacją [14]. Ponadto wykazano, że *in vivo* hypofosforylowane białko Rb (w tej formie białko Rb działa jako represor transkrypcji) i laminy A/C kolokalizują na obrzeżu jądra zaś *in vitro* Rb wiąże laminy A/C. Oznacza to, że aktywność tego białka jako represora transkrypcji koreluje z wiązaniem przez nie lamin [12]. Białko Rb odgrywa bardzo ważną rolę w procesie starzenia replikacyjnego (opisano w dalszej części tego artykułu oraz Ryc. 5), zatem fakt, iż laminy wpływają na funkcje tego białka może tłumaczyć obserwowane w przypadku niektórych mutacji genu *LMNA* symptomy przedwczesnego starzenia.

Zaproponowane modele nie wykluczają się wzajemnie, a wręcz przeciwnie, wydaje się, że najprawdopodobniej to właśnie kombinacja wszystkich tych mechanizmów – przyczyniających się w różnym stopniu – odpowiada za różnorodność patologicznych fenotypów obserwowanych u pacjentów z laminopatiami.

PROGERIA HUTCHINSON-GILFORD CHOROBA „DOJRZEWANIA LAMINY”

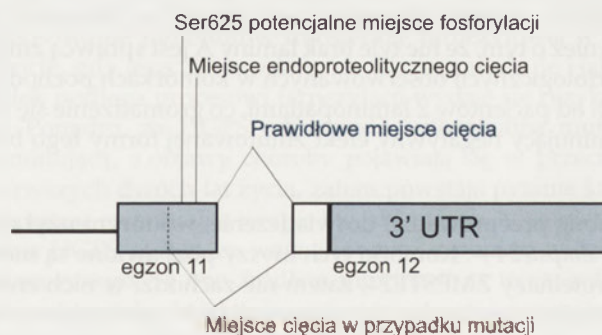
Progeria Hutchinson-Gilford (HGPS), rzadka choroba warunkowana genetycznie (autosomalna dominująca), charakteryzująca się wzmocnionym i przedwczesnym starzeniem, została opisana ponad sto lat temu [15,16]. Szacuje się, że jedna osoba na osiem milionów zapada na tą chorobę [2]. Osoby dotknięte HGPS wydają się zdrowe w momencie urodzenia, jednakże zazwyczaj już w przeciągu pierwszych dwóch lat życia pojawiają się pierwsze oznaki choroby takie jak spowolniony wzrost, utrata włosów, rzęs, brwi oraz lipodystrofia (w szczególności znaczna utrata podskórnej tkanki tłuszczowej), a w późniejszych latach problemy ze stawami, co prowadzi do upośledzenia zdolności ruchowych [2,17]. Średnia długość życia chorych na HGPS to 13,4

roku, a najczęstszą przyczyną śmierci jest zawał serca lub zastoinowa niewydolność serca [17,18].

Cechą charakterystyczną jąder fibroblastów pacjentów z HGPS jest zmieniony kształt (często wielopłatowość, wpułkienia czy przepuklina jądrowa), wzrost uszkodzeń DNA oraz spadek ekspresji licznych białek jądrowych m.in. HP1 (ang. *heterochromatin protein 1*) oraz białek związanych z laminami A -LAP2 (ang. *lamin associated protein 2*) [19]. Ponadto zaobserwowano, że w komórkach osób z HGPS zmianie ulega wzór modyfikacji histonów, ze spadkiem specyficznej dla heterochromatyny metylacji reszty lizyny dziewiątej histonu H3 (Tri-Me-K9H3) [19,20]. Również aktywność transkrypcyjna tych komórek jest nieznacznie niższa mimo masowej dekondensacji chromatyny [21].

U podłoża progerii Hutchinson-Gilford leży mutacja genu *LMNA* kodującego laminę A. Najczęstszą mutacją w HGPS jest heterozygotyczna Gly⁶⁰⁸ → Gly⁶⁰⁸ z zamianą cytozyny na tyminę, powodująca zaburzenia różnicowego cięcia i składania mRNA, a w konsekwencji powstawanie skróconej o 50 aminokwasów, dominującej pod względem funkcji wersji laminy A, laminy AΔ50, zwanej też progeryną [2,5,19]. Przewidywana sekwencja aminokwasowa progeryny posiada miejsce farnesylicacji, natomiast jest pozbawiona motywu RSY↓LLG niezbędnego by metaloproteinaza ZMP-STE24 mogła dokonać endoproteolizy, co blokuje ostatni etap dojrzewania laminy A oraz potencjalnego miejsca fosforylacji na serynie 625 [2,21] (Ryc.4). W przeciwieństwie do prelamin A z niefarnesylowaną cysteiną CaaX, progeryna gromadzi się w postaci nukleoplazmatycznych agregatów nie związanych z błonami [8].

Inną chorobą objawiającą się przedwczesnym starzeniem, w której wykryto mutacje genu *LMNA*, jest nietypowy syndrom Wernera. Klasyczny syndrom Wernera (WS) został opisany jako autosomalna recesywna choroba dziedziczna, będąca skutkiem mutacji genu *WRN* kodującego helikazę DNA. Syndrom Wernera jest chorobą częstszą niż HGPS, dotyka 1:100000 osób. Wiele objawów klinicznych występuje zarówno w HGPS, jak i w syndromie Wernera, natomiast objawy te u pacjentów z HGPS pojawiają się zazwyczaj w pierwszych latach życia, podczas gdy u chorych z syndromem Wernera znacznie później (w dorosłym życiu). Wśród



Rycina 4. Krytyczne miejsce alternatywnego cięcia i składania produktu genu *LMNA*. Na schemacie zaznaczono miejsca cięcia produktu prawidłowego genu *LMNA* oraz allelu *LMNA* powstającego w wyniku punktowej mutacji występującej w HGPS. W wyniku mutacji powstaje mRNA, którego produkt białkowy pozbawiony jest drugiego miejsca cięcia (oznaczonego na schemacie jako miejsce endoproteolitycznego cięcia) niezbędnego w procesie dojrzewania laminy A (patrz Ryc. 2) oraz miejsca fosforylacji na reszcie Ser 625 na podstawie [21].

pacjentów z syndromem Wernera, w przeciwieństwie do pacjentów z HGPS, zanotowano wysoki odsetek zachorowań na nowotwory, aczkolwiek średnia długość życia osób z syndromem Wernera jest dłuższa (średnio 47 lat) niż w przypadku osób z HGPS (13,4 lat) [2,18].

U 15% osób, u których na podstawie kryteriów klinicznych rozpoznano syndrom Wernera, nie znaleziono mutacji genu *WRN*, natomiast wykryto mutację genu *LMNA*. Takie przypadki nazwano nietypowym syndromem Wernera [6].

POTENCJALNE STRATEGIE TERAPEUTYCZNE

W komórkach pacjentów z HGPS obecności zmutowanej formy laminy A towarzyszy spadek poziomu prawidłowej formy tego białka, zatem obserwowane zmiany w komórkach mogą być spowodowane zarówno spadkiem poziomu funkcjonalnej, prawidłowej formy laminy A, jak też dominującym negatywnym efektem laminy A Δ 50 [22]. Przeprowadzono serię doświadczeń polegających na wprowadzeniu dzikiej formy laminy A do komórek pobranych od pacjentów z HGPS i zaobserwowano, że podwyższenie poziomu prawidłowej formy laminy A nie jest w stanie przywrócić prawidłowej morfologii komórki, a ponadto obecność zmutowanej formy laminy wpływa na właściwości dzikiej formy. Zmiana właściwości laminy A w obecności laminy A Δ 50 sugeruje, iż ta druga wywiera negatywny dominujący wpływ w komórkach osób z HGPS. Ponadto wprowadzenie laminy A Δ 50 do zdrowych fibroblastów indukuje zmiany morfologii jąder komórkowych przypominające te obserwowane w komórkach HGPS [22]. Zatem, aby przywrócić prawidłową morfologię komórkom chorych na HGPS należy usunąć z tych komórek laminę A Δ 50.

Fong i wsp. [23] wyhodowali myszy ze zmutowanym allelem genu *Lmna*^{LCO/LCO}, posiadające jedynie laminę C, nie produkujące transkryptu pre-laminy A. Zarówno zdolność wzrostu, długość życia, struktura kości i mięśni tych myszy nie odróżnia ich od myszy dzikich. Podobnie analiza histopatologiczna nie wykazała żadnych nieprawidłowości w tkankach pobranych od tych zwierząt. Natomiast zwierzęta z mutacją *Lmna*^Δ pozbawione zarówno laminy A jak i C przejawiają symptomy dystrofii mięśniowej i żyją krócej [24]. Wydaje się zatem, że sama lamina C w zupełności wystarczy by zapewnić myszom dobrą kondycję zdrowotną, zaś lamina A nie pełni istotnej funkcji, przynajmniej w warunkach przeprowadzonego doświadczenia. Świadczy to również o tym, że nie tyle brak laminy A jest sprawcą zmian morfologicznych obserwowanych w komórkach pochodzących od pacjentów z laminopatiami, co gromadzenie się lub dominujący negatywny efekt zmutowanej formy tego białka.

Fong przeprowadził doświadczenie, w którym użył myszy *Zmpste24*^{-/-}. Komórki tych myszy pozbawione są metaloproteinazy ZMPSTE24, zatem nie zachodzi w nich endoproteoliza pre-laminy A, co prowadzi do gromadzenia się farnezylowanej pre-laminy A. Zwierzęta *Zmpste24*^{-/-} przejawiały liczne symptomy przedwczesnego starzenia przypominające zmiany obserwowane u pacjentów z HGPS. Natomiast myszy *Zmpste24*^{+/-}/*Lmna*^{LCO/LCO} były zdrowe, mimo braku laminy A, prawdopodobnie dzięki obniżeniu poziomu patogennie działającej pre-laminy A [24]. Badania

Fonga ponadto wykazały, że niejako lamina C jest w stanie funkcjonalnie zastąpić laminę A. Potencjalną strategią terapeutyczną mogłoby być zatem wyeliminowanie pre-laminy A przy pomocy np. antysensownych oligonukleotydów lub RNAi.

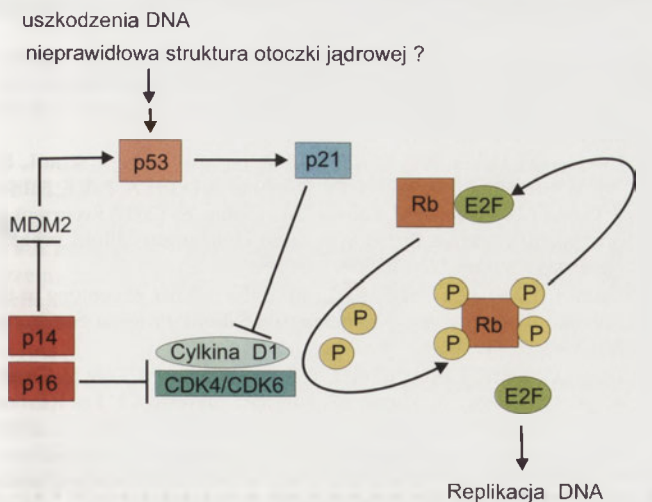
Inny sposób usunięcia laminy A Δ 50 z komórki zaproponowali Scaffidi i Misteli [19,22]. Jako że za powstawanie laminy A Δ 50 odpowiedzialna jest mutacja prowadząca do powstania kryptycznego miejsca cięcia i składania mRNA, zatem zaprojektowali oni oligonukleotyd (morfolino *exo11*), który komplementarnie blokuje region w egzonie 11, zawierający mutację uniemożliwiając maszynieri różnicowego cięcia i składania mRNA dostęp do niego [22]. Badania z użyciem morfolino *exo11* wykazały, iż przy jego zastosowaniu możliwe jest przywrócenie prawidłowego różnicowego cięcia i składania mRNA minigenu laminy A w komórkach HeLa [22]. Aby sprawdzić, czy przy pomocy *exo11* możliwe jest przywrócenie prawidłowego różnicowego cięcia i składania mRNA endogennego transkryptu genu *LMNA*, wprowadzono *exo11* do fibroblastów HGPS. Wykazano, że po czterech dniach od wprowadzenia *exo11* udało się wyeliminować nawet do 90% błędnie ciętego i składanego mRNA laminy A. Podobny efekt uzyskano również w pięciu innych liniach komórkowych wyprowadzonych z komórek pobranych od pacjentów HGPS (trzech liniach fibroblastów skóry i limfocytach B). Przywrócenie prawidłowego cięcia i składania produktu genu *LMNA* doprowadziło do wyeliminowania laminy A Δ 50, przywrócenia prawidłowej morfologii jąder oraz prawidłowego poziomu metylacji reszty lizyny dziewiątej histonu H3 (Tri-Me-K9), a także regulacji licznych genów, których deregulacja charakteryzuje komórki HGPS [22].

Krótko po odkryciu, że laminy ulegają farnezytacji wykazano, iż podobnie modyfikowane jest również białko Ras [8]. Liczne badania na drożdżach wykazały, że modyfikacja potranslacyjna białka Ras wymagana jest by białko to mogło pełnić funkcje sygnałowe, zaś farnezytacja jest niezbędna by mogła zajść transformacja nowotworowa w onkogennych mutantach Ras [8]. Obserwacja ta zwróciła uwagę badaczy na możliwość zastosowania inhibitorów transferazy farnezylowej (FTI, ang. *farnesyl transferaze inhibitor*) w leczeniu nowotworów. Liczne FTI zostały zsyntezowane [25], a badania z ich zastosowaniem objęły także HGPS.

Patologiczny fenotyp obserwowany w HGPS jest powodowany obecnością farnezylowanej pre-laminy A, zatem przypuszczano, że zahamowanie farnezytacji mogłoby odwrócić ten fenotyp. Zachęcające wyniki uzyskano traktując FTI fibroblasty pobrane od pacjentów z HGPS. Okazało się, że liczne wypuklenia błony jądrowej tych komórek pod wpływem działania FTI zanikają [8,26], jednakże trzeba zaznaczyć, że nie wykazano wprost, że farnezytacja została zahamowana. Ponadto, z roku na rok odkrywano kolejne białka, na których funkcję wpływa proces farnezytacji, zatem specyficzne zahamowanie tego procesu w przypadku tylko jednego z nich wydaje się trudne, zaś globalne może mieć nieprzewidywalne skutki.

LAMINY W PROCESIE STARZENIA FIZJOLOGICZNEGO

Ponad 40 lat temu Hayflick i Moorhead [27] zauważyli, że fibroblasty hodowane *in vitro* dzielą się tylko określoną liczbą



Rycina 5. Regulacja cyklu komórkowego. Na uproszczonym schemacie przedstawiono mechanizm regulacji cyklu komórkowego, z uwzględnieniem białek istotnych w procesie starzenia. W komórkach ulegających procesowi starzenia obserwuje się wzrost poziomu białka p14, które wiążąc ligazę ubikwitylową MDM2 powoduje wzrost poziomu białka p53, a to z kolei jest aktywatorem transkrypcyjnym genu p21. Białka p21 oraz p16 są inhibitorami kinaz cyklicznych, przez co ograniczają fosforylację białka Rb, które w formie hypofosforylowanej pozostaje w kompleksie z czynnikiem transkrypcyjnym E2F, uniemożliwiając aktywację podległych mu genów. W rezultacie cykl komórkowy zostaje zatrzymany. Szlak zależny od białka p53 zostaje aktywowany także poprzez uszkodzenia DNA, a prawdopodobnie również przez nieprawidłowości struktury otoczki jądrowej obserwowane w laminopatiach.

bę razy. Obecnie zjawisko to zwane jest limitem Hayflicka, zaś szereg zmian, które zachodzą w komórce prowadząc do nieodwracalnego zatrzymania jej podziałów określane są jako starzenie replikacyjne (ang. *replicative senescence*). Komórki, które uległy starzeniu replikacyjnemu są nieodwracalnie zatrzymane w fazie G1 cyklu komórkowego, co następuje na skutek skracania z każdą rundą replikacji końców chromosomów – tzw. telomerów [28]. Ostatnio wykazano, że nie tylko samo skracanie telomerów, co uszkodzenia DNA generowane w nich, wywołują odpowiedź komórki prowadzącą do wzrostu poziomu i aktywności białka p53 [29]. Z kolei białko p53 aktywuje transkrypcję genu p21, którego produkt białkowy jest inhibitorem kinaz cyklicznych CDK4/CDK6. W komórkach starzejących się replikacyjnie obserwuje się również wzrost ekspresji innego inhibitora CDK4/CDK6, białka p16 oraz białka p14, które wpływa na degradację białka p53 wiążąc ligazę ubikwitylową MDM2. Zarówno p16, jak i p21 przyczyniają się do hypofosforylacji białka Rb, które w tej postaci pozostaje związane z czynnikiem transkrypcyjnym E2F. Białko E2F w kompleksie z Rb nie aktywuje ekspresji genów niezbędnych do przeprowadzenia replikacji DNA, zatem podziały komórki zostają zatrzymane (Ryc. 5).

W 2006 roku ukazała się praca wskazująca na obecność uszkodzeń DNA telomerowego w komórkach starych małp [30]. Wiadomo również, że w skórze osób w podeszłym wieku obserwuje się obecność innego markera starzenia, tzn. SA- β -galaktozydazy (ang. *senescence associated β -galactosidase*) [31]. Wydaje się zatem, że proces starzenia komórkowego ma wpływ na starzenie całego organizmu.

Niedawno Scaffidi i Misteli [19] opublikowali wyniki wskazujące na rolę laminy A w procesie starzenia fizjologicznego. Wykazali oni obecność progeryny w fibroblastach pobranych od ludzi w wieku 81-96 lat. Komórki te miały

zmienioną morfologię w sposób przypominający zmiany obserwowane w komórkach pacjentów z HGPS. Zaobserwowano, że w hodowli komórek zarówno pobranych od młodych (3-11 lat), jak i starszych osób (81-96 lat) przybywa komórek o zmienionej morfologii jąder wraz z każdym kolejnym pasażem. W hodowli komórek pobranych od osób starszych akumulacja komórek ze zdeformowanymi jądrami zachodzi gwałtowniej niż w przypadku komórek pobranych od młodszych osób, jednakże nie zaobserwowano gromadzenia się progeryny wraz z wiekiem, zatem nie tyle wzrost zawartości zmutowanej formy laminy A w komórce, co czas obecności tej formy w jądrze wydaje się być odpowiedzialny za jej patogenny efekt. Prawdopodobnie te same mechanizmy molekularne, które są odpowiedzialne za przedwczesne starzenie komórek HGPS przyczyniają się do starzenia komórek prawidłowych. Różnica polegałaby zatem na tempie zachodzenia wspomnianych procesów. Niewykluczone również, że nieprawidłowości struktury blaszki jądrowej, poprzez mechanizm zależny od białka p53, aktywują program starzenia [19] (Ryc. 5).

UWAGI KOŃCOWE

Chociaż minęło już ponad 100 lat od czasu gdy Hutchinson i Gilford opisali chorobę nazwaną później ich nazwiskami – progerię Hutchinson-Gilford (HGPS) [15,16], przyczyna tego schorzenia pozostawała tajemnicą aż do roku 2003, kiedy to dwie grupy badawcze opublikowały niezależnie wyniki wskazujące, że to mutacja genu *LMNA* kodującego laminy typu-A leży u podstaw HGPS [21,32]. Mimo, iż HGPS jest chorobą niezmiernie rzadką (1 przypadek na 8 milionów urodzeń), od 1889 roku opisano na świecie około 100 przypadków, wzbudza bardzo duże zainteresowanie badaczy. Zaproponowano szereg strategii terapeutycznych, ich zastosowanie *in vitro* w przypadku komórek pobranych od pacjentów oraz *in vivo* w przypadku myszy dało bardzo dobre rezultaty [8,22,23,24]. Jednakże możliwość zastosowania którejkolwiek z nich w przypadku ludzi wydaje się mało realna, przynajmniej w świetle dotychczas posiadanych informacji o laminach i ich funkcji oraz braku wiedzy, np.: co do skali zjawiska farnezytacji w komórce. Lamina A pełni wiele istotnych funkcji, zatem strategia proponująca usunięcie jej z komórki, nawet jeśli w krótkoterminowych badaniach *in vitro* dawała obiecujące rezultaty, uderzałaby w zbyt wiele procesów komórkowych, czego skutki w przypadku całego organizmu trudno przewidzieć. Podobnie zastosowanie inhibitorów transferazy farnezylowej w momencie, gdy jeszcze nie wiadomo tak naprawdę ile i jakich białek podlega procesowi farnezytacji wydaje się ryzykowne. Ponadto, za HGPS odpowiada autosomalna mutacja dominująca, a objawy choroby pojawiają się w przeciągu pierwszych dwóch lat życia, zatem powstaje pytanie kiedy rozpocząć ewentualną terapię i w jaki sposób. Niemniej, badania HGPS są bardzo ważne również z punktu widzenia poznawczego. Są one źródłem informacji na temat roli lamin w komórkach, jak też w pewnym stopniu przyczyniają się do poznania procesu starzenia fizjologicznego.

PIŚMIENNICTWO


1. Broers JLV, Ramaekers FCS, Bone G, Yaou RB, Huthinson CJ (2006) Nuclear Lamins: Laminopathies and Their Role in Premature Ageing. *Physiol Rev* 86: 967-1008

2. Pollex RL, Hegele RA (2004) Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Clin Genet* 66: 375-381
3. Broers JLV, Raymond Y, Rot MK, Kuijpers H, Wagenaar SS, Ramaekers FC (1993) Nuclear A-type lamins are differentially expressed in human lung cancer subtypes. *Am J Pathol* 143: 211-220
4. Tilli CM, Ramaekers FC, Broers JL, Hutchinson CJ, Neumann HA (2003) Lamin expression in normal human skin, actinic keratosis, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 148:102-109
5. Mattout A, Dechat T, Adam SA, Goldman RD, Gruenbaum Y (2006) Nuclear lamins, disease and aging. *Curr Opin Cell Biol* 18: 335-341
6. Burke B, Stewart CL (2006) The Laminopathies: the functional architecture of the nucleus and its contribution to disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7: 369-405
7. Harborth J, Elbashir SM, Beichert K, Tuschl T, Weber K (2001) Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114: 4557-4565
8. Rusinol AE, Sinensky MS (2006) Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors. *J Cell Sci* 119: 3265-3272
9. Mallampalli MP, Huyer G, Bendale P, Gelb MH, Michaelis S (2005) Inhibiting farnesylation reverses the nuclear morphology defect in HeLa cell model for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 14416-1442
10. Young SG, Fong LG, Michaelis S (2005) Thematic review: Lipid post-translational modifications. *J Lipid Res* 46: 1-28
11. Gotzmann J, Foisner R (2006) A-type lamin complexes and regenerative potential: a step towards understanding laminopathic diseases. *Histochem Cell Biol* 125: 33-41
12. Cohen M, Lee KK, Wilson KL, Gruenbaum Y (2001) Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. *Trends Biochem Sci* 26: 41-47
13. Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK, Wilson KL (2005) The nuclear lamina comes of age. *Nature Rev* 6: 21-31
14. Johnson BR, Nitta RT, Frock RL, Mounkes L, Barbie DA, Stewart CL, Harlow E, Kennedy BK (2004) A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9677-9682
15. Gilford H (1904) Ateleiosis and progeria: continuous youth and premature old age. *Br Med J* 2: 914-918
16. Hutchinson J (1886) Case of absence of hair, with atrophic condition of the skin and its appendages, in a boy whose mother had been almost wholly bald from alopecia areata from the age of six. *Lancet* i: 923
17. Bidger JM, Kill IR (2004) Aging of Hutchinson-Gilford progeria syndrome fibroblasts is characterized by hyperproliferation and increased apoptosis. *Exp Gerontol* 39: 717-724
18. Smidth ED, Kudlow BA, Frock RL, Kennedy BK (2005) A-type lamins, progerias and other degenerative disorders. *Mech Aging Develop* 126: 447-460
19. Scaffidi P, Misteli T (2006) Lamin A -dependent nuclear defects in human aging. *Science* 312: 1059-1063
20. Columbaro M, Capanni C, Mattioli E, Novelli G, Parnaik VK, Squarozzi S, Maraldi NM, Lattanzi G (2005) Rescue of heterochromatin organization in Hutchinson-Gilford progeria by drug treatment. *Cell Mol Life Sci* 62: 2669-2678
21. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berqlund P, Durta A, Pak E, Durkin S, Csoka AB, Boehnke M, Glover TW, Collins FS (2003) Recurrent de novo point mutation in lamin-A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423: 293-298
22. Scaffidi P, Misteli T (2005) Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Nat Med* 11: 440-445
23. Fong LG, Ng JK, Lammerding J, Vickers TA, Meta M, Cote N, Gavino B, Qiao X, Chang SY, Young SR, Yang SH, Stewart CL, Lee RT, Bennett CF, Bergo MO, Young SG (2006) Prelamin A and lamin A appear to be dispensable in the nuclear lamina. *J Clin Invest* 116: 743-752
24. Scaffidi P, Misteli T (2006) Good news in the nuclear envelope, loss of lamin A might be a gain. *J Clin Invest* 116: 632-634
25. Basso AD, Kirschmeier P, Bishop WR (2006) Thematic review series: lipid posttranslational modifications, farnesyl transferase inhibitors. *J Lipid Res* 47: 15-31
26. Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, Gruenbaum Y, Khuon S, Mendez M, Varga R, Collins FS (2004) Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8963-8968
27. Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621
28. Itahana K, Campisi J, Dimri GP (2004) Mechanism of cellular senescence in human and mouse cell. *Biogerontology* 5: 1-10
29. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Flegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426: 194-198
30. Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM (2006) Cellular senescence in aging primates. *Science* 311: 1257
31. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9363-9367
32. De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amieli J, Boccaccio I, Lyinnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M, Levy N (2003) Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300: 2055

The role of lamins and mutations of *LMNA* gene in physiological and premature aging

Małgorzata Alicja Śliwińska 

The Nencki Institute of Experimental Biology, Laboratory of Molecular Bases of Aging, 3 Pasteura St., 02-093 Warszawa, Poland

 e-mail: m.sliwinska@nencki.gov.pl

Key words: lamins, laminopathies, Hutchinson-Gilford progeria syndrome

ABSTRACT:

Lamins belong to type V intermediate filaments superfamily. They are the main structural constituencies of the nuclear lamina but they also influence on chromatin structure, regulation of gene expression, localization and probably protein degradation. Because lamins play many different roles within the cell, mutations in their genes can result in variety of pathological phenotypes. Mutations in *LMNA* gene are the cause of many different diseases, called laminopathies. Among laminopathies are muscle tissue diseases, adipose tissue diseases and also progerias, the premature aging syndromes. One of the progerias, which results from mutation in *LMNA* gene, is Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS). It seems that the same molecular mechanisms which are responsible for premature aging of cells of HGPS patients, are involved in physiological aging.

STRESZCZENIE

Mitochondria pełnią w komórkach podstawową rolę w metabolizmie energetycznym, termogenezie, utrzymaniu homeostazy wapniowej oraz apoptozie. Następujące na przemian fuzja i fragmentacja mitochondriów zapewniają prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów, szczególnie w komórkach tkanek z dużym zapotrzebowaniem na energię, np. w mięśniach szkieletowych, sercu czy układzie nerwowym. Fuzja mitochondriów odgrywa istotną rolę w rozwoju płodu i utrzymaniu puli mtDNA w formie nienaruszonej pomimo ciągłego zagrożenia stresem oksydacyjnym. Mitochondria w formie rozbudowanej sieci obserwuje się w komórkach szczególnie niewrażliwych na działanie czynników apoptogennych. Z kolei zjawisko odwrotne do fuzji - fragmentacja mitochondriów poprzedza programowaną śmierć komórki. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy mechanizm tworzenia sieci mitochondriów lub ich dzielenia się jest następstwem zintegrowanego współdziałania kilku białek, z których Drp1, Mfn1, Mfn2 i Opa1 pełnią najistotniejsze funkcje. Zgodnie z najnowszymi doniesieniami białka odpowiedzialne za procesy fuzji i fragmentacji mitochondriów pełnią dodatkowo zadania inne niż te związane z dynamiką przekształceń błon. Niejednokrotnie właśnie dodatkowa rola, jaką odgrywają, jest niezwykle istotna dla prawidłowego funkcjonowania komórki. W niniejszej pracy opisano najnowszą wiedzę na temat zmian strukturalnych mitochondriów ze szczególnym uwzględnieniem transbłonowych GTPaz i ich roli w metabolizmie komórki.

WPROWADZENIE - W JAKI SPOSÓB MITOCHONDRIA ULEGAJĄ FUZJI?

Formowanie się sieci mitochondriów zaobserwowano po raz pierwszy w komórkach drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) i muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*). Z tych organizmów wyizolowano również po raz pierwszy białka odpowiedzialne za fuzję i fragmentację mitochondriów. W komórkach drożdży zidentyfikowano białko Dnm1p zlokalizowane po cytoplazmatycznej stronie zewnętrznej błony mitochondrialnej, białko Fzo1p zakotwiczone w zewnętrznej błonie mitochondrium, a na wewnętrznej błonie zlokalizowano białko Mgm1p. Dnm1p i Fzo1p to GTPazy, które prowadzą do przeciwstawnych w skutkach procesów. Białko Dnm1p powoduje fragmentację mitochondriów, natomiast fuzja zewnętrznych błon mitochondrialnych podlega regulacji przez Fzo1p [1]. Mgm1p odpowiada prawdopodobnie za fuzję wewnętrznych błon mitochondrialnych, choć jego funkcja nie jest jeszcze dokładnie poznana. Zasugerowano wstępnie model fuzji mitochondriów w komórkach drożdży, zachodzący z udziałem wymienionych białek, który to model jest dotychczas powszechnie uznawany, choć w świetle nowszych doniesień wymaga pewnych modyfikacji. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa białko Fzo1p, które współdziała z białkiem pomostowym Ugo1p zlokalizowanym podobnie jak Fzo1p w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Kompleks Fzo1p-Ugo1p wiąże się z białkiem Mgm1p, zakotwiczonym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [2]. Dzięki oddziaływaniom pomiędzy białkami kompleksu proces fuzji może podlegać koordynacji w obrębie czterech błon białkowo-lipidowych należących do sąsiadujących ze sobą mitochondriów. Homologi wszystkich wymienionych białek, oprócz Ugo1p, zidentyfikowano w komórkach ssaków (Ryc. 1). Białku Dnm1p odpowiada białko Drp1 [1]. Istnieją dwa różne homologi białka Fzo1p: Mfn1 (ang. *mitofusin 1*) i Mfn2 (ang. *mitofusin 2*), oraz odpowiadające Mgm1p białko Opa1 zakotwiczone w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (Ryc. 1). Dodatkowo zidentyfikowano czynnik Fis1, za pośrednictwem którego Drp1 ulega translokacji do zewnętrznej błony mitochondrialnej.

MECHANIZM FRAGMENTACJI MITOCHONDRIÓW

Na zewnętrznej błonie mitochondrialnej zlokalizowano ostatnio GTPazy odpowiedzialne za fuzję i fragmentację mitochondriów. Okazało się, że białka uczestniczące w dwóch przeciwstawnych procesach zakotwiczone są w błonie w bliskim sąsiedztwie, tworząc tzw. loci. Wykazano m. in. współwystępowanie białek Drp1 i Mfn2 [3]. Odkrycia te dowodzą, że fuzja (na drodze zależnej

Patrycja Pawlikowska

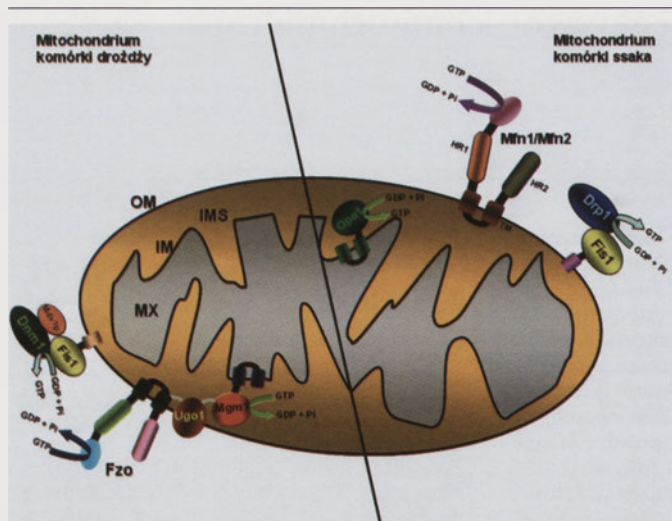
Arkadiusz Orzechowski[✉]

Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

[✉]Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: arkadiusz_orzechowski@sggw.pl, tel./faks: (022) 847 24 52

Artykuł otrzymano 12 września 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 7 listopada 2006 r.

Słowa kluczowe: mitochondrium, fuzja, Mfn2



Rycina 1. Schemat umiejscowienia w błonach mitochondrium białek odpowiedzialnych za procesy fuzji lub fragmentacji mitochondriów w komórkach ssaków i drożdży. Oznaczenia: OM – zewnętrzna błona mitochondrialna; IMS – mitochondrialna przestrzeń międzybłonowa; IM – wewnętrzna błona mitochondrialna; MX – macierz mitochondrialna; TM – domena transbłonowa; HR – ang. *heptad repeat*.

od Mfn2), jak i fragmentacja mitochondriów (dzięki białku Drp1) zachodzą w obrębie zewnętrznej błony w tych samych miejscach. Mechanizm dzielenia się mitochondriów jest w porównaniu z fuzją słabiej poznany. Obecnie istnieją trzy różne wytłumaczenia przyczyn fragmentacji mitochondriów. Zgodnie z pierwszym z nich mitochondria ulegają cyklicznym dynamicznym zmianom strukturalnym, co pozwala na prawidłowy rozwój i funkcjonowanie komórki i jest zjawiskiem, które występuje stale, ale z różnym nasileniem. Druga z możliwych przyczyn, to fragmentacja mitochondriów towarzysząca stanom stresu w komórkach (np. zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu, RFT), która prawdopodobnie stanowi istotny etap w indukcji programowanej śmierci komórki. Skoordynowane podziały mitochondriów według niektórych autorów stanowią mechanizm adaptacyjny, dzięki któremu w stanach zagrożenia stresem oksydacyjnym komórka „eliminuje” mitochondria produkujące nadmierne ilości reaktywnych form tlenu. Wreszcie, trzecia prawdopodobna przyczyna to ostatnio opisane zjawisko mitoptozy (programowanej śmierci mitochondriów), które polega na selektywnym „zanimaniu” nieprawidłowo funkcjonujących organelli. Usunięcie z komórki mitochondriów na drodze „samobójczej” śmierci jest często poprzedzone ich fragmentacją i stanowiąc może mechanizm chroniący komórki przed czynnikami apoptogennymi [4].

Jednym z głównych i do tej pory najlepiej poznanych białkiem zaangażowanym w proces dzielenia się mitochondriów jest Drp1 (ang. *dynamamin-related protein 1*). Drp1 jest homologiem Dnm1p, białka zidentyfikowanego u drożdży. Sekwencja aminokwasów Drp1 w odróżnieniu od dynaminy nie zawiera C-końcowej domeny PH (ang. *pleckstrin homology*), posiada natomiast dodatkowo bogatą w prolinę domenę SH3, która prawdopodobnie pełni funkcję regulatorową [5]. Białko Drp1 zlokalizowane jest w cytoplazmie, a w odpowiedzi na czynniki pobudzające fragmentację mitochondriów ulega przemieszczeniu do zewnętrznej błony mitochondrialnej. Przemieszczanie się Drp1 w kierunku błony odbywa się za pośrednictwem białka Fis1, ponieważ sek-

wencja aminokwasowa Drp1 nie zawiera peptydu sygnałowego, rozpoznawanego przez klasyczne białka opiekuńcze transportujące produkty translacji do mitochondrium [6]. W dalszych etapach fragmentacji mitochondriów Fis1 pełni rolę białka adaptorowego, stabilizującego polipeptydowy kompleks „wykonawczy”. Ostatnie badania dowodzą również, że jest czynnikiem limitującym wystąpienie procesów fragmentacji, a nadekspresja genu kodującego białko Fis1 wydaje się wystarczająca do zainicjowania podziałów mitochondriów [7]. Badania prowadzone na modelu *Saccharomyces cerevisiae* dostarczyły dowodów na istnienie kolejnego składnika kompleksu białek zaangażowanych w podział mitochondriów – białka Mdv1p. Czynniki te ulega translokacji do zewnętrznej błony mitochondrialnej razem z wcześniej wspomnianym Dnm1p. Badania Mozdego i wsp. [6] dowodzą, że kolokalizacja białek Dnm1p i Mdv1p jest warunkiem koniecznym zainicjowania fragmentacji mitochondriów. Do tej pory w komórkach ssaków nie rozpoznano białka, które odpowiadałoby charakterystycznemu dla drożdży czynnikowi Mdv1p.

Na obecnym etapie badań brak wystarczających danych na temat mechanizmów molekularnych regulujących i inicjujących procesy fragmentacji mitochondriów. Postuluje się udział Ca^{2+} jako wtórnego przekaźnika sygnału regulującego podziały mitochondriów [8]. Przekonujących dowodów na poparcie tej hipotezy dostarczyły badania, w których stwierdzono, że w odpowiedzi na uwolnienie Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej (ER) indukowane jest przemieszczanie Drp1 do zewnętrznej błony mitochondrialnej. Z kolei zablokowanie wypływu jonów wapnia z siateczki śródplazmatycznej hamuje fragmentację mitochondriów [9].

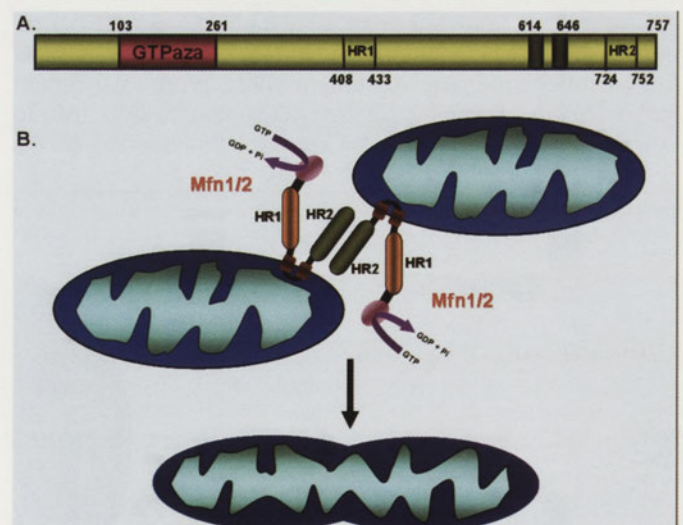
UDZIAŁ BIAŁEK MFN1/2 W FUZZI MITOCHONDRIÓW

Obydwa zidentyfikowane homologi Fzo u kręgowców: białka Mfn1 i Mfn2 biorą udział w regulacji fuzji mitochondriów, a ich aktywność jest niezbędna do prawidłowego rozwoju płodu ssaka. Mutacje jądrowego DNA kodującego białka Mfn są letalne. Okazało się, że dla prawidłowego rozwoju płodu niezbędna jest produkcja obu homologów Fzo, a ich działanie jest niezależne i skutki braku jednego z białek nie mogą być wyrównane zwiększeniem poziomu drugiego. Pomimo że zarówno płody myszy z nokautem *mfn1* jak i ze znokautowanym genem *mfn2* umierały około 11 d.p.c. (łac. *dies post coitum* = dni po kopulacji), to różne były przyczyny śmierci każdego z nich. Płody ze znokautowanym genem dla Mfn1 miały w chwili śmierci wyraźnie mniejszą masę ciała w porównaniu do płodów prawidłowych WT (ang. *wild type*). Dodatkowo, rozpoznano u nich poważne zaburzenia rozwojowe. Z kolei u płodów z nokautem genu *mfn2*, który również spowodował zmniejszenie masy ciała, nie stwierdzono deformacji, które wskazywałyby na obecność zaburzeń rozwojowych [10]. Skutki zablokowania ekspresji *mfn1* i *mfn2* sumowały się, a obumarcie płodów następowało wcześniej. Ponadto, w kulturach pierwotnych fibroblastów wprowadzonych z płodów stwierdzono zmianę kształtu i zmniejszenie rozmiarów mitochondriów. Prawidłowy wygląd organelli przywróciła transfekcja komórek białkami Mfn1 lub Mfn2 [10]. Bliższe przyjrzenie się mechanizmom regulującym aktywność genów *mfn1* i *mfn2*

przeprowadzone przez Santela i wsp. [11] wykazało, że u ludzi ekspresja genów kodujących Mfn1 i Mfn2 na poziomie transkrypcji jest różna w poszczególnych tkankach organizmu. Wysoki poziom mRNA dla Mfn1 i Mfn2 utrzymywał się w mięśniu sercowym. Natomiast w mięśniach szkieletowych wyższa była ekspresja *mfn2*. W trzustce i wątrobie, w przeciwieństwie do mięśni szkieletowych, stwierdzono podwyższony poziom mRNA dla Mfn1. Wysoką ekspresję *mfn1* zaobserwowano również w wielu liniach komórek nowotworowych [11]. W porównaniu z ekspresją na poziomie mRNA, najwyższy poziom białka Mfn2 zaobserwowano w tkankach z dużym zapotrzebowaniem na energię, takich jak serce czy mięśnie szkieletowe. Występowanie względnie dużej zawartości Mfn2 w pewnych tkankach może wskazywać na szczególną rolę tego białka w regulacji fuzji i aktywności mitochondriów charakterystycznej dla komórek wymagających większej podaży energii.

Sekwencja reszt aminokwasowych w białkach Mfn1 i Mfn2 jest identyczna w 60%. Oba białka są dużymi, transbłonowymi GTPazami, zlokalizowanymi w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Domeny C-końcowa i N-końcowa tych białek zwrócone są w stronę cytoplazmy. Za zakotwiczenie Mfn2 w zewnętrznej błonie mitochondrialnej odpowiada domena transbłonowa i domena C-końcowa (Ryc. 2). Białko pozbawione tych domen pozostaje w cytoplazmie i jest niezdolne do współwystępowania z białkami błon mitochondrium [12]. Obydwa homologi Fzo posiadają domenę GTPazową zlokalizowaną przy końcu NH₂ oraz dwie zachowane w ewolucji, hydrofobowe domeny HR1 i HR2 (ang. *heptad repeats domain*). Najważniejszych do tej pory informacji na temat sposobu łączenia się za pośrednictwem białek Mfn błon zewnętrznych sąsiadujących ze sobą mitochondriów dostarczyły badania przeprowadzone przez Koshibę i wsp. [13]. Badacze ci udowodnili, że początkowym etapem fuzji jest oddziaływanie leżących naprzeciwko siebie domen HR2 białek Mfn należących do sąsiadujących mitochondriów (Ryc. 2). Po ustawieniu przeciwległe dwóch domen HR2 mitochondria pozostają przez pewien czas w bliskim kontakcie, jednak nie ulegają fuzji. Domeny HR2 mogą tworzyć kompleksy homotypowe, w których skład mogą wchodzić dwa białka Mfn1 lub dwa Mfn2, albo heterotypowe, składające się z Mfn1 i Mfn2. Jednocześnie wykazano, że warunkiem koniecznym dalszych etapów fuzji mitochondriów jest aktywność GTPazowa białek Mfn [13,14]. Kolejnym istotnym rejonem decydującym o fuzji jest krótka, złożona z 2-3 reszt aminokwasowych, o zachowanej w ewolucji sekwencji, pętla wewnątrzbłonowa, zawierająca resztę tryptofanu [15]. Rejon ten uważany jest za niezbędny do prawidłowego połączenia zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej podczas fuzji, a punktowa mutacja eliminująca tryptofan zarówno w Mfn1 jak i Mfn2 uniemożliwia tworzenie sieci połączonych mitochondriów. Pomimo dużego podobieństwa w budowie wymienionych białek homologicznych dla Fzo, według ostatnich doniesień to Mfn1 poprzez oddziaływanie z Opa1 wydaje się odgrywać istotniejszą rolę niż Mfn2 w bezpośrednim łączeniu błon mitochondrialnych, jak również w regulacji fuzji błony wewnętrznej z zewnętrzną. Wprowadzenie antysensownego RNA w celu zahamowania transkrypcji genu kodującego Opa1 zwiększa fragmentację mitochondriów i dowodzi, że białko to pełni ważną funkcję w procesie fuzji błon mi-

tochondrialnych. Siatkówka oka człowieka odznacza się bardzo wysoką ekspresją białka Opa1, a mutacje w genie tego białka odpowiadają za rozwój choroby zwanej atrofią wzrokową typu 1 (ang. *optic atrophy type 1*, OPA1) [16]. Wyniki badań dotyczących zależności pomiędzy aktywnością Opa1, a stopniem fuzji mitochondriów są niejednoznaczne. W ostatnich latach Cipolat i wsp. [2] wykazali, że do prawidłowej fuzji mitochondriów niezbędne jest współdziałanie białek Opa1 i Mfn1. Nadekspresja genu kodującego białko Opa1 prowadzi do wykształcenia mitochondriów o wydłużonym kształcie jedynie w przypadku, gdy towarzyszy jej wysoka ekspresja genu kodującego białko Mfn1. Jednoczesna nadekspresja genów kodujących białka Opa1 i Mfn2 nie sprzyja fuzji mitochondriów. Zależność funkcjonalna pomiędzy Opa1 i Mfn1 została potwierdzona w doświadczeniach z nadekspresją genu kodującego Mfn1 przy równoczesnym zahamowaniu ekspresji genu kodującego białko Opa1. W komórkach nie dochodziło wówczas do wykształcenia zintegrowanej sieci mitochondriów [2]. Wpływ pobudzający Opa1 na fuzję mitochondriów uzależniony jest, jak się wydaje, od funkcjonalnej domeny GTPazy i prawidłowej domeny C-końcowej CC (ang. *coiled-coil*), jak również od dostępności Mfn1. Stwierdzono, że w przeciwieństwie do Mfn1, Mfn2 nie oddziałuje z białkiem Opa1 [2]. A zahamowanie jego produkcji przy utrzymanym wysokim poziomie Mfn1 nie wpływa istotnie na fuzję mitochondriów [17]. W świetle przytoczonych doniesień wydaje się, iż białko Mfn1 pełni nadrzędną w stosunku do Mfn2 rolę regulatora fuzji mitochondriów. Dodatkowych dowodów, przemawiających za takim scenariuszem zdarzeń dostarczają badania, w których wykazano, że GTPazę Mfn1 charakteryzuje około ośmiokrotnie większa aktywność katalityczna w porównaniu z Mfn2 [3]. Ponadto największą trwałość wiązania i skuteczność działania w procesie fuzji mitochondriów stwierdza się w przypadku homodimeru Mfn1/Mfn1 [17]. Zdaniem niektórych badaczy główną rolę, jaką pełni Mfn2 w procesie fuzji, może być działanie sprzyjające agregacji mitochondriów, natomiast dalsze etapy warunkowane są



Rycina 2. A. Schemat położenia domen białka Mfn2 myszy, wg Hondy i wsp. [14]. Cyfry określają położenie reszt aminokwasowych liczonych od początku do końca danej domeny. Oznaczenia: GTPaza – domena enzymatyczna, HR – domeny tzw. *heptad repeat*. B. Pierwszy etap fuzji zewnętrznych błon mitochondrialnych za pośrednictwem białek Mfn1/2, wg. Koshiby i wsp. [13].

aktywnością Mfn1 [18]. Niezależnie jednak od przytoczonych obserwacji, przynajmniej w komórkach miogennych ze zmutowanym genem *mfn2* obserwuje się małe i podzielone mitochondria, niezdolne do fuzji. Dodatkowo wykazano, że główną przyczyną choroby neurodegeneracyjnej Charcot-Marie-Tooth typu 2, odznaczającej się stopniowym zanikiem aksonów nerwów obwodowych są mutacje w sekwencji kodującej domenę GTPazową białka Mfn2 [19]. Obserwowany związek pomiędzy dynamiką struktury mitochondriów a metabolizmem komórek oraz różnice w zależności od typu komórki i jej stanu fizjologicznego interakcje białek uczestniczących w fuzji sprawiły, że transbłonowe GTPazy stały się przedmiotem badań w aspekcie innym niż wyłącznie zmiany morfologiczne mitochondriów.

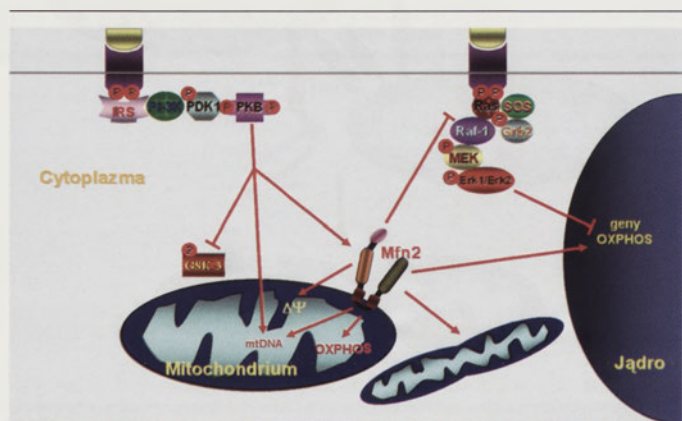
Mfn2 JAKO REGULATOR AKTYWNOŚCI MITOCHONDRIÓW I MEDIATOR SYGNAŁU WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO

Badania Brocarda i wsp. [1] sugerują, że białka odpowiedzialne za procesy fuzji i fragmentacji mitochondriów biorą udział w regulacji potencjału elektrycznego błon mitochondrialnych, który z kolei wpływa na natężenie procesów energetycznych w mitochondriach. Obniżenie potencjału błonowego prowadziło do nasilonej fragmentacji mitochondriów zależnej od Drp1 [1]. Do określenia zależności pomiędzy aktywnością białek Mfn a zmianami potencjału błonowego mitochondriów posłużyły badania z wykorzystaniem kultur pierwotnych fibroblastów mysich otrzymanych z płodów, u których zablokowano transkrypcję genów dla Mfn1 i/lub Mfn2 [10]. Jak wcześniej wspomniano, ekspresja genów dla obydwu tych białek jest warunkiem koniecznym do prawidłowego rozwoju embrionalnego; dlatego też dalsze badania przeprowadzono na kulturach komórek pierwotnych. W fibroblastach pochodzących z mysich płodów z zablokowaną ekspresją Mfn2 stwierdzono obniżenie mitochondrialnego potencjału błonowego. Podobne zjawisko zaobserwowano po wyciszeniu genu dla Mfn2 w kulturach komórek miogennych [15].

Obecnie wiele uwagi zwraca się na Mfn2 jako białko regulatorowe, dzięki któremu można łączyć zmiany w morfologii mitochondriów ze stanem energetycznym i typem metabolizmu komórki (aerobowy-anaerobowy). Mimo pewnych przesłanek, nie wykazano istnienia zależności

przyczynowo-skutkowej pomiędzy obniżeniem całkowitego poziomu ATP lub hamowaniem oddychania mitochondrialnego a stopniem fuzji mitochondriów. Zahamowanie aktywności mitochondrialnego łańcucha oddechowego, jak również zablokowanie z użyciem cykloheksymidu translacji białek kodowanych przez DNA jądrowe, pozostawało bez wpływu na fuzję mitochondriów w komórkach HeLa [18]. Obserwacje własne potwierdzają te doniesienia. W komórkach miogennych linii C2C12 poddanych działaniu insuliny, w których dodatkowo zahamowano aktywność kompleksu I mitochondrialnego łańcucha oddechowego lub syntazy ATP obserwowano rozbudowaną sieć mitochondriów (dane niepublikowane). Przytoczone wyniki pozwalają więc uznać, że fuzja mitochondriów nie jest wymuszana przez prawidłowo funkcjonujący łańcuch oddechowy, ale jest w dużym stopniu zależna od zmian potencjału błonowego mitochondriów.

W jednej z prac Bacha i wsp. [20] opisano obniżone utlenianie glukozy i zmniejszenie oddychania mitochondrialnego w komórkach miogennych L6E9 z zahamowaną ekspresją Mfn2. W tkankach mięśni szkieletowych pobranych od otyłych ludzi i szczurów autorzy pracy stwierdzili obniżoną ekspresję genu dla białka Mfn2. Uzyskane wyniki świadczą o istotnej roli Mfn2 w regulacji przemian pośrednich z udziałem mitochondriów (Ryc. 3). Obniżenie ekspresji genu dla Mfn2 towarzyszące otyłości może częściowo tłumaczyć genozę miopatii mitochondrialnych (np. zanik mitochondriów na obwodzie włókien mięśniowych [21-24] w przypadku cukrzycy lub oporności na insulinę występującej w zespole metabolicznym [20,25]). Mięśnie szkieletowe osobników otyłych charakteryzuje obniżone utlenianie glukozy i kwasów tłuszczowych z towarzyszącym zahamowaniem aktywności oksydazy cytochromowej. Podobne anomalie mitochondriów obserwowano w komórkach w przypadku zablokowania ekspresji genu dla białka Mfn2 w warunkach *in vitro* [20]. Sugerowano wcześniej, że różnice w poziomie wspomnianych białek Mfn uczestniczących w fuzji mitochondriów mogą sprzyjać wystąpieniu określonych chorób, w szczególności związanych z opornością na insulinę lub zmianami zwyrodnieniowymi w narządach mięsnych. Przypuszczenia te znajdują coraz więcej świadectw w pracach klinicznych opublikowanych w ostatnim czasie. Obniżoną ekspresję mRNA i produkcję białka Mfn2 niezależnie od płci chorego stwierdzono w mięśniach szkieletowych ludzi z otyłością oraz u chorych na cukrzycę typu 2 [25]. Poziom ekspresji Mfn2 był pozytywnie skorelowany z wrażliwością mięśni na insulinę [25]. Istnieje coraz więcej przesłanek, by sądzić, że istnieje związek pomiędzy obniżoną ekspresją genu dla białka Mfn2 a stanami niewrażliwości na insulinę w cukrzycy i w otyłości z towarzyszącą upośledzoną aktywnością metaboliczną mitochondriów [20,26]. Równoległe ze zmianami w poziomie białka Mfn2 obserwowano zmiany w ekspresji poszczególnych podjednostek mitochondrialnego łańcucha oddechowego [19]. Zablokowanie ekspresji *mfn2* hamuje utlenianie pirogronianu, β -oksydację kwasów tłuszczowych, cykl kwasów trójkarboksylowych (cykl Krebsa) i fosforylację oksydacyjną [25]. Podsumowując zebrane doniesienia wydaje się, że deficyt Mfn2 w komórkach w stanach oporności na insulinę może stanowić jeden z głównych czynników sprzyjających wystąpieniu niepożądanych zmian w działaniu mitochondriów. Poziom



Rycina 3. Schemat wewnątrzkomórkowego działania białka Mfn2 (opracowano wg Santela [33]).

Mfn2 w przypadku otyłości może zostać przywrócony do stanu prawidłowego przez zredukowanie masy ciała do zakresu fizjologicznego. Podobnie, nasilona aktywność metaboliczna mitochondriów będąca wynikiem zwiększonej aktywności fizycznej prowadzi do wzrostu ekspresji genu dla Mfn2 [27].

Obecnie prowadzone są również intensywne prace nad rolą Mfn2 w wewnątrzkomórkowym systemie przekazywania sygnału zależnego od insuliny na modelu mięśni szkieletowych *in vitro*. Zgodnie z doniesieniami opublikowanymi przez Bacha i wsp. [25] w proliferujących komórkach L6E9 po 2, 4 i 48 godzinach traktowania, insulina nie powoduje zmian w produkcji Mfn2. Przeciwnie, długotrwałe działanie insuliny (od 2 do 10 dni) nasila ekspresję genu dla badanego białka w różnicujących się komórkach mięśniowych [28]. Otrzymane wyniki wskazują ponadto, że wzrost ekspresji genu dla Mfn2 pod wpływem insuliny uzależniony jest od aktywności 3-kinazy fosfatydoinozytolu (PI3-K), kluczowej dla procesów transportu glukozy i różnicowania się komórek (Ryc. 3). Zebrane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań nad udziałem białek odpowiedzialnych za zmiany strukturalne mitochondriów w rozwoju chorób związanych z niewrażliwością na insulinę.

Badania nad transbłonowymi białkami mitochondrialnymi prowadzone są również w kierunku określenia ich roli w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnału. Istnieją doniesienia, że białko Mfn2 może pełnić funkcję pośredniego elementu sygnałowego. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały na przykład, że nadekspresja genu dla Mfn2 hamuje proliferację komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Mechanizm zahamowania podziałów komórkowych był zależny od MAPK (ERK1/2) [29]. Zdaniem autorów białko Mfn2 łączy się z nadrzędnym regulatorem ścieżki MAP kinaz – małą GTPazą Ras blokując sygnał mitogenowy (Ryc. 3) i indukując tym samym zatrzymanie cyklu komórkowego, co uniemożliwia zapoczątkowanie fazy G1 [29]. Podobny mechanizm molekularny działania Mfn2 zaobserwowano w komórkach mięśni szkieletowych, w których zainicjowano proces terminalnego różnicowania [28]. Wyniki doświadczeń *in vitro* z nadekspresją genu dla białka Mfn2 sugerują ponadto, że białko Mfn2 hamuje podziały komórek nowotworowych poprzez opisany powyżej szlak hamowania białka Ras [29]. Obecnie przypisuje się białku Mfn2 rolę regulatora aktywności oddechowej mitochondriów w odpowiedzi na wysokie zapotrzebowania energetyczne komórek. Dodatkowo zaburzenie funkcji Mfn2 prawdopodobnie odgrywa istotną rolę w patogenezie cukrzycy typu 2 [25] oraz może być przyczyną zaburzeń regulacji cyklu komórkowego [29].

ZMIANY STRUKTURALNE MITOCHONDRIÓW A APOPTOZA

Ze względu na podstawową rolę, jaką odgrywa mitochondrium w genecie programowanej śmierci komórki (ang. *programmed cell death*), od dawna poszukiwano odpowiedzi na pytanie, czy fragmentacja/fuzja mitochondriów wpływa na apoptozę, lub czy jest odwrotnie. Uważa się obecnie, że może istnieć zależność przyczynowo-skutkowa pomiędzy zmianami morfologicznymi mitochondriów

a apoptozą. Występujące cyklicznie fuzja i fragmentacja stabilizują strukturę mitochondriów i są niezbędne do ich prawidłowego funkcjonowania [26]. Zaburzenie tej równowagi w kierunku przewagi fragmentacji nad fuzją przyczynia się do podwyższenia wrażliwości komórek na działanie czynników apoptogennych. Wykazano na przykład, że w komórkach COS7 i HeLa apoptoza wywołana przez staurosporynę (swoisty inhibitor kinaz białkowych typu C) poprzedzona jest fragmentacją mitochondriów. Podział mitochondriów i apoptozę udało się powstrzymać przez zahamowanie transkrypcji genu kodującego białko Drp1, wskazując tym samym na znaczenie tego białka dla prawidłowego przebiegu apoptozy indukowanej staurosporyną [1]. Ostatnio zasugerowano również udział Mfn2 w regulacji apoptozy, w której rolę pośrednika pełni proapoptotyczne białko Bax [30]. Nadekspresja genu białka Mfn2 hamuje aktywność proapoptotyczną Bax i wpływ cytochromu *c* z mitochondrium [15]. Bax w odpowiedzi na czynniki apoptogenne tworzy megakanaly w zewnętrznej błonie mitochondrialnej umożliwiając dalsze etapy programowanej śmierci komórki, w tym uformowanie się apoptosomu i następczą aktywację kaspaz wykonawczej fazy programowanej śmierci komórki. W ostatnich latach zwrócono również uwagę na fakt, że agregacja Bax z zewnętrzną błoną mitochondrialną towarzyszy procesowi fragmentacji mitochondriów. Co więcej, podczas indukcji apoptozy wytworzony za pośrednictwem Bax kanał lipidowy w zewnętrznej błonie mitochondrialnej budową przypomina kanały powstające w pierwszych etapach fragmentacji mitochondriów. Karbowski i wsp. [30] wykazali, że Bax współwystępuje z białkami Drp1 i Mfn2 w zewnętrznej błonie mitochondrium, co dodatkowo wskazuje na udział tego białka w procesach fragmentacji mitochondriów. Zwiększona oporność komórek na działanie czynników apoptogennych, będąca wynikiem fuzji mitochondriów, nie jest jedynym mechanizmem chroniącym komórki przed szkodliwymi wpływami środowiska. W komórkach mięśni szkieletowych, intensywne przemiany oksydacyjne, w tym podwyższone wytwarzanie anionorodnika nadadtlenkowego, sprzyjają powstawaniu mutacji w mtDNA. Wykazano, że Mfn2 chroni mitochondria przed zwiększeniem przepuszczalności błon mitochondrialnych (ang. *permeability transition pore*, PTP) wywołanym przez reaktywne formy tlenu [15]. Ostatnio zwrócono również uwagę na udział innego białka transbłonowego – Opa1 w utrzymaniu prawidłowej struktury grzebieni mitochondrialnych, aktywności syntazy ATP i zahamowaniu wypływu cytochromu *c* z mitochondrium [3], co może stanowić podstawę mechanizmu oporności na działanie niektórych czynników apoptogennych. Fuzja mitochondriów wydaje się zatem stanowić jeden z podstawowych mechanizmów chroniących mitochondria przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu, a w konsekwencji przed powstawaniem i kumulowaniem się mutacji w mtDNA [31]. Utrzymanie równowagi pomiędzy rozmiarami fuzji i fragmentacji mitochondriów odgrywa również istotną rolę w procesie starzenia się organizmu, kiedy wiadomo, że obrona antyoksydacyjna ulega upośledzeniu [32]. W badaniach na modelu *Drosophila* stwierdzono, że mutacja genu *fzo1*, w wyniku którego hamowana jest aktywność Fzo1, przyspiesza kumulowanie się uszkodzeń w materiale genetycznym mitochondrium i zmniejsza natężenie oddychania komórkowego [31].

PERSPEKTYWY

Różnice pomiędzy mitochondriami dotyczące rozmiarów i kształtu obserwowane są nie tylko w zależności od typu komórki i stadium jej rozwoju, ale również w obrębie tej samej komórki pod wpływem działających na nią czynników środowiska zewnętrznego. Obecnie uważa się, że fuzja i fragmentacja, decydując o kształcie i aktywności mitochondriów, warunkują biologiczne funkcje, jakie organelle te mają do wypełnienia w komórce, chociaż brak jeszcze pełnego rozeznania co do znaczenia każdego z wymienionych procesów. Zebrane dotychczas obserwacje, w szczególności dotyczące działania transbłonowych GTPaz mitochondrialnych, wskazują na pilną potrzebę podjęcia badań ukierunkowanych na poznanie mechanizmów patogenezy i przeciwdziałanie rozwojowi niektórych chorób degeneracyjnych, u podłoża których leżą zaburzenia czynności mitochondriów. Obniżona ekspresja białka Mfn2 obserwowana u chorych na cukrzycę i osób otyłych wskazuje, że zaburzenia aktywności tego białka mogą stanowić jedną z przyczyn insulinooporności. Zależności pomiędzy ekspresją genów dla poszczególnych białek uczestniczących w integracji błon mitochondrialnych a stanami chorobowymi oraz dane dotyczące mechanizmów fuzji i dzielenia się mitochondriów są niezwykle cenne, jednakże nadal bez odpowiedzi pozostają pytania, w jaki sposób i za pośrednictwem jakich sygnałów wewnątrzkomórkowych indukowane są zmiany strukturalne mitochondriów. Do tej pory naukowcy nie potrafili również wykazać związku przyczynowo skutkowego pomiędzy dynamiką przekształceń strukturalnych mitochondriów a aktywnością metaboliczną komórki.

PIŚMIENICTWO

1. Brocard JB, Rintoul GL, Reynolds IJ (2003) New perspectives on mitochondrial morphology in cell function. *Biol Cell* 95: 239-242
2. Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15927-15932
3. Meeusen SL, Nunnari J (2005) How mitochondria fuse. *Curr Opin Cell Biol* 17: 389-394
4. Skulachev VP (2006) Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* 11: 473-485
5. Bossy-Wetzel E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA (2003) Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol* 15: 706-716
6. Mozdy AD, McCaffery JM, Shaw JM (2000) Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* 151: 367-380
7. Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA (2003) The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 23: 5409-5420
8. Scorrano L (2003) Divide et impera: Ca²⁺ signals, mitochondrial fission and sensitization to apoptosis. *Cell Death Differ* 10: 1287-1289
9. Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC (2003) Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* 160: 1115-1127
10. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160: 189-200
11. Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT (2003) Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 116: 2763-2774
12. Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombès A (2002) Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 115: 1663-1674
13. Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305: 858-862
14. Honda S, Aihara T, Hontani M, Okubo K, Hirose S (2005) Mutational analysis of action of mitochondrial fusion factor mitofusin-2. *J Cell Sci* 118: 3153-3161
15. Neuspiel M, Zunino R, Gangaraju S, Rippstein P, McBride H (2005) Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem* 280: 25060-25070
16. Satoh M, Hamamoto T, Seo N, Kagawa Y, Endo H (2003) Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 300: 482-493
17. Ishihara N, Eura Y, Mihara K (2004) Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* 117: 6535-6546
18. Legros F, Lombès A, Frachon P, Rojo M (2002) Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 13: 4343-4354
19. Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacin M, Zorzano A (2005) The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Gen* 14: 1405-1415
20. Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Dagaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacin M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A (2003) Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. *J Biol Chem* 278: 17190-17197
21. Gellerich FN, Trumbeckaite S, Müller T, Deschauer M, Chen Y, Gizaullina Z, Zier S (2004) Energetic depression caused by mitochondrial dysfunction. *Mol Cell Biochem* 256/257: 391-405
22. Chaturvedi S, Bala K, Thakur R, Suri V (2005) Mitochondrial encephalomyopathies: advances in understanding. *Med Sci Monit* 11: RA238-246
23. Oldfors A, Tulinius M (2003) Mitochondrial encephalomyopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 217-227
24. Smeitink JAM (2003) Mitochondrial disorders: clinical presentation and diagnostic dilemmas. *J Inher Metab* 26: 199-207
25. Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Reusset J, Laville M, Guillet C, Boirie Y, Wallberg-Henricsson H, Manco M, Calvani M, Castagneto M, Palacin M, Mingrone G, Zierath JR, Vidal H, Zorzano A (2005) Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* 54: 2685-2689
26. Chen H, Chomyn A, Chan DC (2005) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 280: 26185-26192
27. Cartoni R, Leger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, Ziltener JL, Luthi F, Deriaz O, Zorzano A, Gobelet C, Kralli A, Russel AP (2005) Mitofusins 1/2 and ERR α expression are increased in human skeletal muscle after physical activity. *J Physiol* 567: 349-358
28. Pawlikowska P, Orzechowski A (2006) Mitofusin 2 (Mfn2) – a key player in insulin-dependent myogenesis *in vitro*. *Cell Tissue Res* (w druku)
29. Chen KH, Guo X, Ma D, Guo Y, Li Q, Yang D, Li P, Qiu X, Wen S, Xiao RP, Tang J (2004) Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nat Cell Biol* 6: 872-883
30. Karbowski M, Lee YJ, Gaume B, Jeong SY, Frank S, Nechushtan A, Santel A, Fuller M, Smith CL, Youle RJ (2002) Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* 159: 931-938
31. Westermann B (2002) Merging mitochondria matters. Cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep* 3: 527-531

32. Vasiliaki A, Mansouri A, Remmen H, van der Meulen JH, Larkin L, Richardson AG, McArdle A, Faulkner JA, Jackson ML (2006) Free radical generation by skeletal muscle of adult and old mice: effect of contractile activity. *Aging Cell* 5: 109-117

33. Santel A (2006) Get the balance right: Mitofusins roles in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1763: 490-499

Role of transmembrane GTPases in mitochondrial morphology and activity

Patrycja Pawlikowska, Arkadiusz Orzechowski✉

Department of Physiological Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw Agricultural University, 159 Nowoursynowska St., 02-776 Warsaw, Poland

✉e-mail: arkadiusz_orzechowski@sggw.pl

Key words: mitochondrion, fusion, Mfn2

ABSTRACT

Mitochondria play crucial role in the energetic metabolism, thermogenesis, maintenance of calcium homeostasis and apoptosis. Cyclic changes in fusion and fission of mitochondria are required for properly functioning organelles, especially in tissues with high dependence on energy supply such as skeletal muscles, heart, or neurons. The key role of mitochondrial fusion is observed in embryonic development and maintaining unchanged mtDNA pool under conditions of oxidative stress. There is a large number of data indicating that mitochondrial networks often accompany the resistance to apoptotic stimuli. In contrast to fusion – the mitochondrial fission precedes apoptosis. According to the newest knowledge precise interactions between a few proteins are required for mitochondrial fusion and division. Among them Drp1, Mfn1, Mfn2 and Opa1 are considered the most important. Recent reports shed some light on the physiological importance of proteins participating in mitochondrial membrane dynamics in energy production, apoptosis and cellular signaling. In this review the authors report on the recent knowledge concerning structural changes of mitochondria with a particular interest to transmembrane GTPases and their role in cellular physiology.

Anna Wardowska^{1,2*}

Krystyna Dzierzbicka²

Andrzej Myśliwski¹

¹Katedra Histologii i Immunologii, Akademia Medyczna, Gdańsk

²Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk

*Anna Wardowska, Katedra Histologii i Immunologii, Akademia Medyczna, ul. Dębinki 1, 80-210 Gdańsk e-mail: anna.wardowska@amg.gda.pl, tel. (058) 349 14 44

Artykuł otrzymano 6 czerwca 2006 r.

Artykuł zaakceptowano 11 września 2006 r.

Słowa kluczowe: tuftsyna, immunomodulator, analogi tuftsyny, aktywność biologiczna

Wykaz skrótów: AIDS - zespół nabytego upośledzenia odporności; AZT - azydodotymidyna; CD (ang. *cluster of differentiation*) - kompleks różnicowania (tym symbolem i odpowiednią cyfrą oznaczone są struktury powierzchniowe komórek, głównie leukocytów); GMDP - *N*-acetylo-glukozamino-muramylo-dipeptyd; IgM - przeciwciało klasy IgM; IL-1 - interleukina 1; IL-2 - interleukina 2; IFN- γ - interferon γ ; MDP - *N*-acetylo-muramylo-L-alanylo-D-izoglutamina; nor-MDP - *N*-acetylo-nor-muramylo-L-alanylo-D-izoglutamina; Pap - *p*-aminofenylalanina; THF γ 2 (ang. *thymic humoral factor*) - polipeptydowy czynnik humoralny grasicy; TLR (ang. *Toll-like receptors*) - receptory Toll-podobne; WBC (ang. *white blood cells*) - krwinki białe

Podziękowanie: Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego KBN 2PO5A00428

STRESZCZENIE

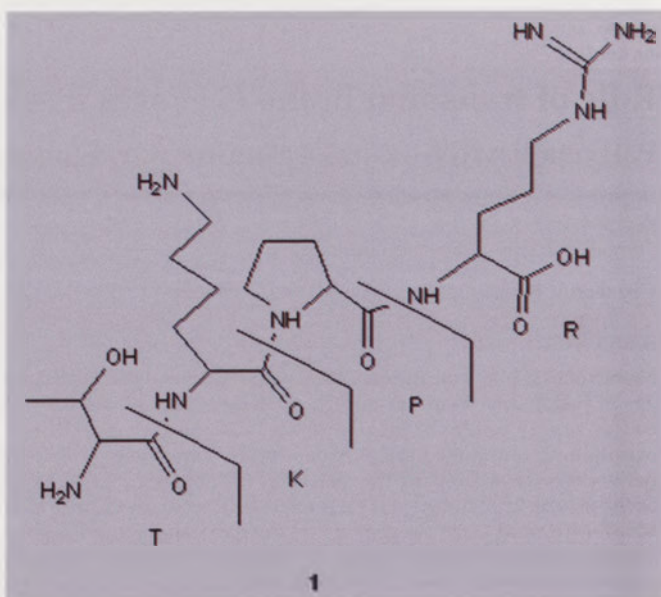
Tuftsyna, zbudowana z czterech reszt aminokwasowych (TKPR), jest najmniejszym endogennym immunomodulatorem występującym w naturze we krwi człowieka i innych ssaków. Została wyizolowana w 1970 roku na Uniwersytecie Tufts w Bostonie (USA) przez Najjara i Nishioka [1]. Tuftsyna jest związkiem o bardzo szerokim spektrum aktywności biologicznej, aktywuje wiele elementów układu immunologicznego, powodując wzrost cytotoksyczności makrofagów oraz granulocytów. Wykazuje ona działanie nie tylko immunostymulujące, ale również przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe oraz przeciwgrzybicze. W artykule opisano nowe właściwości i analogi tuftsyny.

WPROWADZENIE

Tuftsyna jest tetrapeptydem (Ryc. 1) zlokalizowanym w łańcuchu ciężkim Fc immunoglobuliny G (IgG) i uwalniana jest w wyniku działania dwóch specyficznych enzymów: endokarboksy-peptydazy tuftsynowej śledziony, rozszczepiającej wiązanie peptydowe pomiędzy R²⁹² i E²⁹³ oraz leukokininazy, znajdującej się w błonach komórek fagocytujących, hydrolizującej wiązanie między K²⁸⁸ i T²⁸⁹ [1,2]. Najważniejszą aktywnością biologiczną tuftsyny jest aktywacja fagocytozy granulocytów i makrofagów. Indukuje ona również pinocytozę czy wybuch tlenowy fagocytów, co w efekcie prowadzi do zwiększonej aktywności bakteriobójczej tych komórek, a także niszczenia komórek transformowanych nowotworowo [3]. Wykazano, że poprzez aktywację procesów immunologicznych, a w szczególności fagocytozy, tuftsyna może w sposób pośredni wpływać na układ nerwowy. Zatem z powodzeniem można nazwać ten tetrapeptyd łącznikiem pomiędzy obydwoma układami: odpornościowym i nerwowym [4,5]. Opisano również, że istnieje bezpośrednia zależność między prawidłowym funkcjonowaniem śledziony a aktywnością tuftsyny. Badania prowadzone na organizmach żywych pokazały, że u osobników, którym usunięto śledzionę występuje niekorzystny dla organizmu nabyty deficyt tuftsyny powodując jego osłabienie i podatność na wiele infekcji [6]. Ze względu na swoje właściwości tuftsyna jest wciąż bardzo interesującym tematem badań w wielu ośrodkach na świecie. W tej publikacji omówimy interesujące naszym zdaniem prace opublikowane po 1999 roku.

WŁAŚCIWOŚCI TUFTSYNY

Pomimo wielu, bo ponad 30-tu lat badań nad aktywnością tuftsyny, okazało się, że nie wszystkie jej właściwości zostały poznane. Pavlov i Samonina [7] w swojej pracy zwrócili uwagę na całkowicie nową, dotychczas nie eksplorowaną zdolność tego tetrapeptydu do zmniejszania owrzodzeń. Wykazano, że profilaktyczne i terapeutyczne podawanie tuftsyny powoduje



Rycina 1. Tuftsyna (TKPR).

ograniczenie miejsca owrzodzenia oraz szybsze wygojenie chorej tkanki.

Wronski i wsp. [8] odkryli, że tuftsyna wiąże się selektywnie z neuropiliną-1 blokując wiązanie VEGF (naczyniowego, endotelialnego czynnika wzrostu). Sugerują oni, że obecność receptorów dla tuftsyny na komórkach śródbłonna odzwierciedla zdolność tych komórek do udziału w reakcji zapalnej. Zatem stosowanie odpowiednich sond mogłoby okazać się użyteczne w uwidacznianiu zapaleń naczyń *in vivo*. Trevisani i wsp. [9] stwierdzili, że aktywność i stężenie tuftsyny jest niższe w przypadku marskości wątroby czy uszkodzenia funkcji śledziony i przyczynia się do osłabienia aktywności fagocytarnej granulocytów. Potwierdzili oni niedobór tego tetrapeptydu w przypadku wycięcia wątroby (splenektomia), przewlekłej białaczki szpikowej, zwłóknienia szpiku, płamicy małopłytkowej, niedokrwistości sierpowatej oraz AIDS. W ostatnich latach ukazało się kilka prac podejmujących kwestię wpływu transplantacji śledziony i wątroby na aktywność układu immunologicznego i zdolność do obrony przed infekcjami. Foschi i wsp. [10] wykazali, że ortotropowe przeszczepienie wątroby prowadzi do odbudowy naturalnych sił obronnych organizmu poprzez podwyższenie aktywności tuftsyny skutkujące zwiększoną aktywnością fagocytarną neutrofilii. Efekt przywrócenia prawidłowego poziomu tuftsyny i IgM w surowicy pacjentów po częściowej autotransplantacji śledziony, zaobserwowali również Zhang i wsp. [11]. Z kolei Brandt i wsp. [12] przebadali grupę dzieci z uszkodzoną śledzioną. Wykazali, że wprowadzenie autologicznej tkanki śledziony prowadzi do znacznego zwiększenia odpowiedzi immunologicznej na szczepionkę przeciw pneumokokom, jak również do podniesienia poziomu tuftsyny w surowicy.

Siemion i wsp. [3] opisali wpływ nie tylko tuftsyny, ale również innych immunopeptydów, np. tymuliny, tymopoetyny, tymozyny i czynnika humoralnego grasicy (jeden z czynników grasicy wpływający na proces dojrzewania limfocytów T) na centralny system nerwowy (CNS). Podkreślili oni w swojej pracy, badaną od lat 80-tych XX w., zdolność tuftsyny do znoszenia czucia bólu. Za tę aktywność, jak też osłabienie efektu odstawienia morfiny obserwowanego u uzależnionych od tego leku szczurów, odpowiada dipeptyd o sekwencji prolilo-arginina. Kozlovskaya i wsp. [13] testowali tuftsynę i niektóre jej analogi podawane dootrzewnowo (i.p) szczurom i myszom na działanie antystresowe. Natomiast radiofarmaceutyczny związek Tc-99m-RP128 [14], zbudowany z Tc i tripeptydu *N,N*-dimetylo-GSC(Acm) połączony poprzez resztę glicyny z penta-peptydem TKPPR, który wiąże się *in vivo* ze specyficznym błonowym receptorem dla tuftsyny [15,16], zastosowano do wykrywania i oznaczania miejsc zapalnych w centralnym systemie nerwowym [17]. Związek ten przeszedł do I fazy badań klinicznych [18]. Okazało się, że jest on bezpiecznym i skutecznym środkiem znajdującym zastosowanie w uwidacznianiu zmienionych chorobowo miejsc u pacjentów z długotrwałym reumatoidalnym zapaleniem stawów [18]. Wang i wsp. [19] stwierdzili, że fragment 1-3 tuftsyny (TKP) działa jako inhibitor makrofagów/mikrogleju odgrywający ważną rolę ochronną zapobiegającą krwotokowi śródmózgowemu w badaniach na modelu zwierzęcym. Tripeptyd (TKP) obniża również produkcję wolnych rodników oraz

ilość neuronów ulegających degradacji, czego efektem jest zmniejszenie obszaru uszkodzenia, a także poprawia działanie układu nerwowego [19]. Raibon i wsp. [20] udowodnili, że inhibitor 1-3 tuftsyny podany do ciała szklatego oka powoduje zwiększoną regenerację aksonów warstwy zwojowej siatkówki oraz zmniejszenie ilości fagocytów w siatkówce.

TUFTSYNA W LIPOSOMACH

Agrawal i Gupta [21] oraz Gupta i Haq [22] wykazali, że umieszczenie tuftsyny w liposomach lub na powierzchni liposomów niosących antybiotyki, np. amfoterycynę B czy nystatynę, zwiększa specyficzne wiązanie tych nośników z komórkami układu fagocytów jednojądrzastych oraz aktywność cytotoksyczną tych komórek, a także efekt terapeutyczny leku. Temat nośników podjęli również Ahsan i wsp. [23] skupiając się bardziej na rodzajach nośników i ich oddziaływaniu z makrofagami. Owais i wsp. [24] badali wpływ liposomów zbudowanych z dietylokarbamazy (DEC) zawierających tuftsynę przeciw infekcji *Brugia malayi* (nitkowiec) u myszy. Tuftsyna kapsułkowana w liposomach zwiększała skuteczność zwalczania nawet dorosłych pasożytów. Zespół Khana [25-27] badał wpływ tuftsyny w liposomach zawierających nystatynę (Tuft-Lip-Nystat) w zwalczaniu eksperymentalnej kandydozy wywołanej przez *Candida albicans*, wykazującej oporność *in vivo* na amfoterycynę B (AmpB). Wykazali oni również, że podanie polienowego antybiotyku, jakim jest nystatyna lub amfoterycyna B razem z tuftsyną myszom Balb/c z neutropenią zakażonych kandydozą, aktywuje układ immunologiczny i prowadzi do całkowitego wyleczenia. Ważną rolę w aktywowaniu makrofagów odegrała tutaj profilaktyka z użyciem tuftsyny kapsułkowanej w liposomach. Wydaje się, że liposomy niosące tuftsynę mogą być dobrymi nośnikami dla leków w leczeniu infekcji, podczas których odpowiedź układu immunologicznego bazuje na aktywacji makrofagów. Do powyższych prac nawiązało w ostatnich latach wiele zespołów naukowych [24-32]. Wykorzystali oni w swoich badaniach liposomy jako nośniki leków. Dodatkowo zwiększyli specyficzność oddziaływania liposomów z makrofagami poprzez inkorporację tuftsyny do wnętrza nośników lub na ich powierzchnię. Wykazali również, że profilaktyczne podawanie zwierzętom liposomów z samą tuftsyną zwiększa odporność na malarię [22], leiszmaniozę [32] i infekcje grzybicze [24-30]. Natomiast obecność odpowiedniego antybiotyku w takich liposomach podnosi efekt terapeutyczny leku [22,24,32].

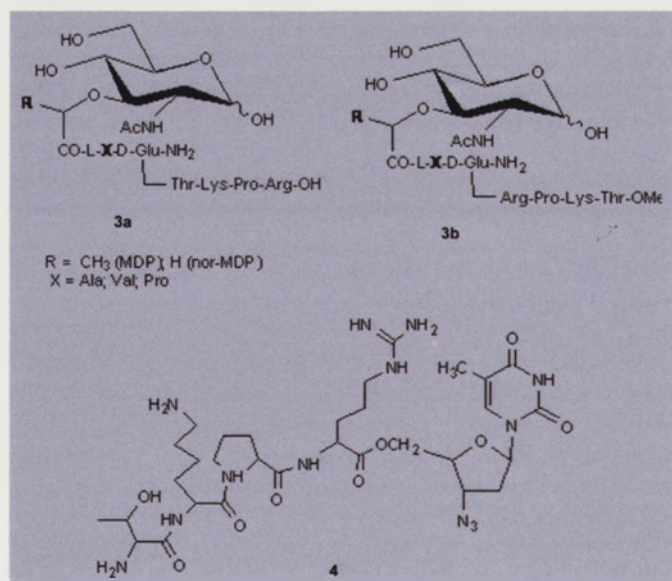
ANALOGI TUFTSYNY I ICH AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

Tuftsyna jest związkiem bardzo podatnym na biodegradację i to było jednym z głównych powodów do poszukiwania jej analogów o dłuższym czasie działania, wyższej aktywności biologicznej, bardziej trwałych i potencjalnie przydatnych w terapii. Zsyntetyzowano wiele analogów tuftsyny, między innymi: różniących się składem i sekwencją aminokwasów w łańcuchu [2,6,33,34], o przedłużonym łańcuchu peptydowym [2,6,35,36], analogi zawierające pochodne kwasu 1-aminocyklobutano-1-karboksyłowego [2,6,37], tioanalogi [38], analogi posiadające wiązanie izo-

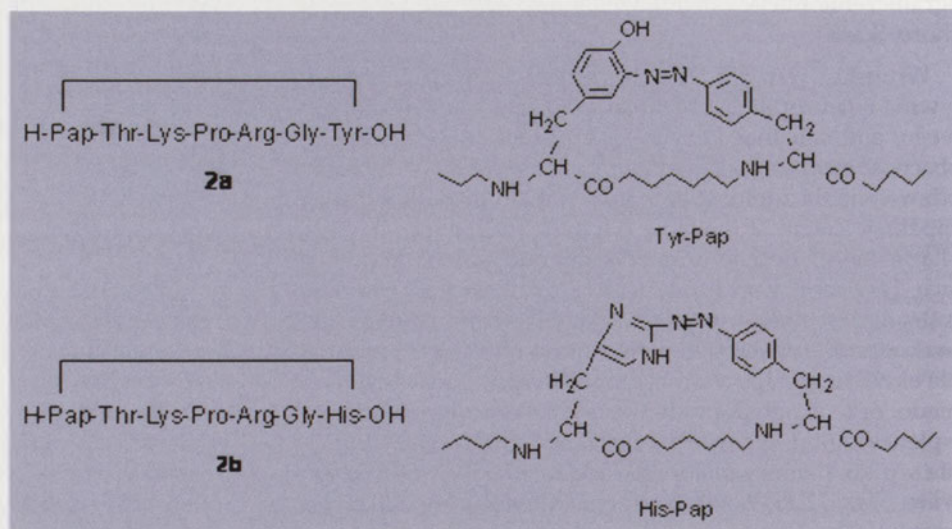
peptydowe [2,6,39], cykliczne analogi, np. cykliczny peptyd c-[T-K-P-R-G] o aktywności porównywalnej do tuftsyny w stężeniu 50-ciokrotnie niższym [40], analogi *retro-inverso* zawierające nie tylko białkowe, ale i niebiałkowe aminokwasy [2,6,41,42] oraz analogi modyfikowane cukrami, między innymi dicukrową pochodną muramylo-dipeptydu (GMDP) [43]. Ostatnio opisano syntezę cyklicznych azo peptydów w tym także analogów tuftsyny (Ryc. 2a i 2b) [44].

Podjęto również próby modyfikacji tuftsyny przez przyłączenie do niej naturalnych peptydów, np. THF γ 2 [45]. Opierając się na danych dotyczących tych analogów w ostatnim czasie zsyntetyzowano koniugaty tuftsyny z biologicznie czynnymi związkami, takimi jak: muramylo-dipeptyd (MDP, związek 3a na Ryc. 3), nor-muramylo-dipeptyd (nor-MDP, związek 3b na Ryc. 3) [46,47] czy azydodymidyna (AZT, związek 4 na Ryc. 3) [48].

Dzierzbicka i wsp. [46,47] przy projektowaniu koniugatów tuftsyny z muramylo-dipeptydem i nor-muramylo-dipeptydem (związki 3a i 3b na Ryc. 3) wychodzili z założenia, że połączone cząsteczki o zbliżonej aktywności biologicznej mogą okazać się w swoim działaniu bardziej przydatne farmakologicznie niż obie składowe, tzn. muramylo-peptyd i tuftsyna osobno, a ich łączny efekt działania może mieć charakter nie tylko addytywny, ale wręcz synergiczny. Działanie muramylo-dipeptydu obejmuje aktywację monocytów i makrofagów. Muramylo-dipeptyd jako analog fragmentów ściany bakterii działa na receptory dla lipopolisacharydu (LPS) typu CD14 oraz rodzinę receptorów TLR. Jak wiadomo, pobudzenie tych receptorów wywołuje szereg aktywności komórek. Działanie tuftsyny skierowane jest głównie na aktywację nieswoistych elementów układu



Rycina 3. Koniugaty tuftsyny (3a) i retro-tuftsyny (3b) z muramylo-dipeptydem (MDP) lub nor-muramylo-dipeptydem (nor-MDP) [46,47] oraz z AZT (4) [48].



Rycina 2. Cykliczne azo analogi tuftsyny [44].

immunologicznego, przede wszystkim na pobudzenie syntezy wolnych rodników przez granulocyty i w mniejszym stopniu przez makrofagi oraz syntezy monokin przez monocyty. Koniugaty tuftsyny z muramylo-dipeptydem i nor-muramylo-dipeptydem poddano badaniom, których celem była: ocena wpływu tych związków na żywotność mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC), limfocytów krwi obwodowej (PBL) i monocytów, ocena sekrecji czynnika martwicy nowotworu (TNF α) i interleukiny 6 (IL-6) w hodowlach komórek stymulowanych badanymi związkami. Zbadanie wpływu na cytotoksyczność naturalnych komórek zabójczych (NK) oraz ocena wybuchu tlenowego w subpopulacjach krwi obwodowej pod wpływem badanych związków. Zaletą badanych koniugatów było ich szybsze działanie i większa skuteczność w porównaniu do tuftsyny. Planowane testy *in vivo* na modelu zwierzęcym będą mogły potwierdzić potencjalną użyteczność tych połączeń. Do syntezy koniugatów tuftsyny z muramylo-dipeptydem i nor-muramylo-dipeptydem zastosowano metodę mieszanich bezwodników z wykorzystaniem chloromrówczanu izobutyli i *N*-metylomorfoliny [46,47].

W 2002 roku Zhang i wsp. [49] zsyntetyzowali analogi tuftsyny (związki 5a-j na Ryc. 4), między innymi z muramylo-dipeptydem, wykorzystując syntezę na nośniku stałym o nazwie „Meshed-Bag Gathered-Bunch” (MBGB).

Zsyntetyzowany przez Fridkina i wsp. [48] koniugat AZT, leku stosowanego w terapii AIDS, z tuftsyną (AZT-tuftsyna) (związek 4 na Ryc. 3) również wykazywał właściwości obu komponentów. Podobnie jak AZT hamował on aktywność odwrotnej transkryptazy i ekspresję antygeny HIV i podobnie do tuftsyny pobudzał uwalnianie IL-1 przez mysie makrofagi. Badania wykazały, że koniugat AZT-tuftsyna nie jest cytotoksyczny w stosunku do komórek T (limfocytów T) i może mieć potencjalne zastosowanie w terapii AIDS. Często w końcowej fazie choroby AIDS obejmującej infekcje spowodowane przez drobnoustroje oportunistyczne (*Toxoplasma gondii*, *Candida albicans*, cytomegalowirus) czy nowotwory (mięsak Kaposiego, chłoniak wywodzący się z limfocytów B czy rak szyjki macicy) pojawia się u pacjentów

- 5a. Mur/VAc-Ala-D-izoGln-Thr-Arg-Pro-Lys-OH
- 5b. Mur/VAc-Ala-D-izoGln-Lys-Thr-Arg-Pro-Lys-OH
- 5c. Ala-D-izoGln-Thr-Arg-Pro-Lys-OH
- 5d. Ala-D-izoGln-Lys-Thr-Arg-Pro-Lys-OH
- 5e. Mur/VAc-Thr-Arg-Pro-Lys-OH
- 5f. Mur/VAc-Lys-Thr-Arg-Pro-Lys-OH
- 5g. Mur/VAc-Thr-D-izoGln-Thr-Arg-Pro-Lys-OH
- 5h. Mur/VAc-Thr-D-izoGln-Lys-Thr-Arg-Pro-Lys-OH
- 5i. Mur/VAc-Ala-D-Glu(OBzl)-Thr-Arg-Pro-Lys-OH
- 5j. Mur/VAc-Ala-D-Glu(OBzl)-Lys-Thr-Arg-Pro-Lys-OH

Rycina 4. Analogi tuftsyny zsyntetyzowane na nośniku stałym (MBGB) [49].

leukopenia (zmniejszenie liczby krwinek białych we krwi), powoduje to, że terapia AZT (pierwszy lek hamujący swoiście replikację wirusa) nie może być stosowana. Tuftsyna wpływająca na leukocytozę prowadzi do podwyższenia liczby WBC, dlatego też podawanie jej np. z AZT lub innymi lekami może wpływać korzystnie na rezultaty leczenia.

Gokulan i wsp. [50] zsyntetyzowali polituftsynę (TKPR)₄₀ jako nośnik dla syntetycznych peptydów wywodzących się z białek gp41 i gp120 wirusa HIV. Stwierdzono, że zastosowanie polituftsynowego nośnika może zwiększyć odpowiedź immunologiczną przeciw słabo immunogennym syntetycznym peptydom, które są determinantami antygenowymi naturalnych fragmentów mikroorganizmów chorobotwórczych. Zainteresowanie polituftsyną jest duże, ponieważ wykazuje ona taką samą aktywność biologiczną jak tuftsyna, zwiększa produkcję IL-2 i IFN- γ , a przy tym posiada dłuższy czas półtrwania w organizmie.

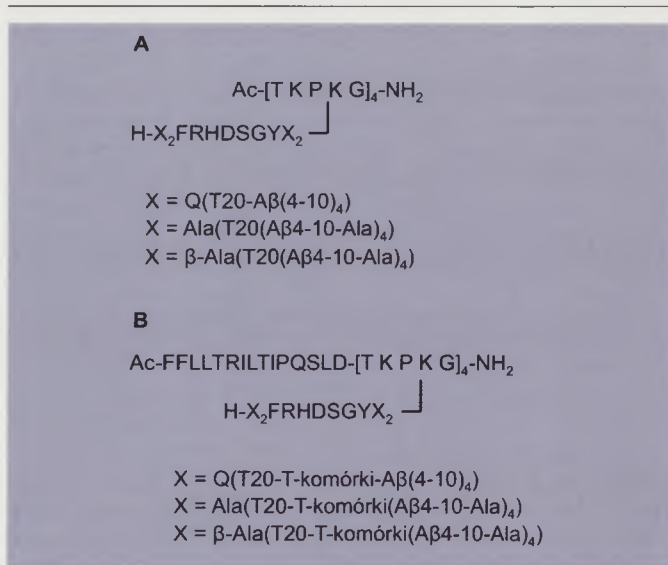
Mezo i wsp. [51] opisali syntezę i immunoaktywność nowych nośnikowych cząsteczek opartych na sekwencji tuftsyno-podobnej. Oligopeptydy bazujące na pentapeptydzie (TKPKG)_n (n=2,4,6,8), pochodnej tuftsyny o różnej długości łańcucha, zostały zsyntetyzowane na nośniku stałym. Te dobrze rozpuszczalne oligomery były nietoksyczne w stosunku do mysich komórek śledziony, nie były immunogenne, a ich immunostymulatorowe efekty powodowały wzrost odpowiedzi przeciwciał na antygen (SRBC) u myszy. Otrzymane dane sugerują, że nowe oligotuftsynowe pochodne mogą być obiecującymi nośnikami dla syntetycznych szczepionek.

Jednym ze sposobów leczenia i zapobiegania chorobie Alzheimerera jest immunoterapia. Uważa się, że główną przyczyną choroby Alzheimerera są płytki starcze, utworzone z białka zwanego β -amyloidem powstającego z białka prekursorowego, APP, występującego we wszystkich komórkach organizmu. Ważnym celem badań nad lekami przeciw tworzeniu złożeń β -amyloidu jest enzym sekretaza. Poszukuje się związków zarówno aktywujących α -sekretezę promującą tworzenie nieszkodliwego APP, jak i inhibitory β -i γ -sekreazy. Szuka się również leków utrudniających tworzenie lub rozbijanie złożeń β -amyloidu, a także próbuje się otrzymać szczepionki przeciw β -amyloidowi. Manea i wsp. [52,53] zsyntetyzowali na nośniku stałym koniugaty zawierające peptydowe determinanty antygenowe B-komórki β -amyloidu A β (4-10) (FRHDSGY) połączone wiązaniem amidowym poprzez resztę pentaglicyny czy α -, β -alaniny

z pochodną tetratuftsyny (Ac-[TKPKG]₄-NH₂) lub z peptydowym nośnikiem wydłużonym przez przyłączenie antygenu komórek T-pomocniczych (Ac-FLLLRILTRILIPQSLD-[TKPKG]₄-NH₂) zapalenia wątroby typu B (Ryc. 5). Okazało się, że modyfikacja peptydowego epitopu β -amyloidu przez przyłączenie do nośnika lub poprzez wprowadzenie dimeru zbudowanego z alaniny, prowadzi do otrzymywania syntetycznych antygenów rozpoznawanych przez przeciwciała. Badania te odgrywają ważną rolę w projektowaniu syntetycznych szczepionek o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu choroby Alzheimerera.

PODSUMOWANIE

Tuftsyna jest naturalnym tetrapeptydem aktywującym monocyty, makrofagi i polimorfonuklearne leukocyty wzmacniając ich naturalną zabójczą aktywność przeciw licznym patogenom i nowotworom. Antymikrobiologiczna aktywność tego peptydu wzrasta przez przyłączenie do jego C-końca fragmentu etylenodiaminy z resztą acylową kwasu tłuszczowego, np. palmitynowego i włączenie tak zmodyfikowanej tuftsyny (palmitoilo-tuftsyny, TKPR-NH-(CH₂)₂-NH-CO-C₁₅H₃₁) w liposomy [22]. Tuftsyna w liposomach nie tylko podnosi odporność gospodarza przeciw chorobom zakaźnym, takim jak np. gruźlica czy leiszmanioza, ale także pozwala na efektywne dotarcie leku do miejsca infekcji. Tuftsyna jako lek nie znalazła do tej pory większego zastosowania, głównie z uwagi na jej szybką biodegradację w organizmie (okres półtrwania wynosi około 16 minut). Powstające w wyniku biodegradacji enzymatycznej tripeptydy TKP i KPR wykazują działanie hamujące aktywność tuftsyny. Dlatego też w dalszym ciągu poszukuje się aktywniejszych i trwalszych jej analogów, np. poprzez otrzymywanie koniugatów z biologicznie czynnymi związkami czy szukanie odpowiednich nośników.



Rycina 5. Struktura koniugatów zawierających A β (4-10)-tetratuftsyno-pochodne (A) oraz modyfikowane antygenem komórek T-pomocniczych (B) [53].

PIŚMIENNICTWO

1. Najjar VA, Nishioka K (1970) Tuftsins: a natural phagocytosis stimulating peptide. *Nature* 228: 672-673

2. Siemion Z, Kluczyk A (1999) Tuftsin: On the 30-year anniversary of Victor Najjar's discovery. *Peptides* 20: 647-674
3. Siemion Z, Kluczyk A, Cebrat M (2005) The peptide molecular links between the central nervous and the immune systems. *Amino Acids* 29: 161-176
4. Herman ZS, Stachura Z, Siemion IZ, Nawrocka E (1980) Anelgestic activity of some tuftsin analogs. *Naturwissenschaften* 67: 613-614
5. Herman ZS, Stachura Z, Opielka L, Siemion IZ, Nawrocka E (1981) Tuftsin and D-Arg3- tuftsin possess analgesic action. *Experientia* 37: 76-77
6. Dzierzbicka K, Rakowski T, Kołodziejczyk AM (2000) Tuftsyna - endogenous immunomodulator. *Post Biochem* 46: 327-335
7. Pavlov TS, Samonina GE (2004) A new property of endogenous immunostimulator tuftsin. *B Exp Biol Med* 138: 163-164
8. von Wronski M, Raju N, Pillai R, Bogdan NJ, Marinelli ER, Nanjappan P, Ramalingam K, Arunachalam T, Eaton S, Linder KE, Yan F, Pochon S, Tweedle MF, Nunn AD (2006) Tuftsin binds neuropilin-1 through a sequence similar to that encoded by exon 8 of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 281: 5702-5710
9. Trevisani F, Castelli E, Foschi FG, Parazza M, Loggi E, Betelli M, Melotti C, Domenicali M, Zoli G, Bernardi M (2002) Impaired tuftsin activity in cirrhosis: relationship with splenic function and clinical outcome. *Gut* 50: 707-712
10. Foschi FG, Trevisani F, Loggi E, Parazza M, Melotti C, Badeschi E, Mingazzini L, Cappa FM, Cescon M, Andreone P, Grazi G, Stefani GF, Bernardi M (2005) Effect of liver transplantation on tuftsin activity and phagocytic activity of neutrophil granulocytes in patients with liver cirrhosis. *Int Arch Allergy Immunol* 137: 258-262
11. Zhang H, Chen J, Kaiser GM, Mapudengo O, Zhang J, Exton MS, Song E (2002) The value of partial splenic autotransplantation in patients with portal hypertension. *Arch Surg* 137: 89-93
12. Brandt CT, Maciel DT, Caneca OAF, Barbadosa de Castro CMM, Bragante de Araujo L (2001) Autotransplant of spleen tissue in children with schistosomiasis: evaluation of splenic function after splenosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96 Suppl: 117-122
13. Kozlovskaya MM, Kozlovskii H, Valdman EA, Seredenin SB (2003) Selank and short peptides of the tuftsin Family in the regulation of adaptive behavior in stress. *Neurosci Behav Physiol* 33: 853-860
14. Wong E, Bennett S, Lawrence B, Fauconnier T, Lu LFL, Bell RA, Thornback JR, Eshima D (2001) Tuftsin receptor-binding peptide labeled with technetium: chemistry and preliminary in vitro receptor-binding study. *Inorg Chem* 40: 5695-5700
15. Bump NJ, James L, Wleklik M, Reichler J, Najjar VA (1986) Isolation and subunit composition of tuftsin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7187-7191
16. Bump NJ, Najjar VA, Reichler J (1990) The characteristics of purified HL60 tuftsin receptors. *Mol Cell Biochem* 92: 77-84
17. Paul C, Peers SH, Woodhouse LE, Thornback JR, Goodbody AE, Bolton C (2000) The detection and quantitation of inflammation in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis using the radiopharmaceutical Tc-99m-RP128. *J Neurosci Methods* 98: 83-90
18. Caveliers V, Goodbody AE, Tran LL, Peers SH, Thornback JR, Bossuyt A (2001) Evaluation of ^{99m}Tc-RP128 as a potential inflammation imaging agent: human dosimetry and first clinical results. *J Nucl Med* 42: 154-61
19. Wang J, Rogove AD, Tsirka AE, Tsirka SE (2003) Protective role of tuftsin fragment 1-3 in an animal model of intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol* 54: 655-664
20. Raibon E, Sauve Y, Carter DA, Gaillard F (2002) Microglial changes accompanying the promotion of retinal ganglion cell axonal regeneration into peripheral nerve grafts. *J Neurocytol* 31: 57-71
21. Agrawal AK, Gupta CM (2000) Tuftsin-bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections. *Adv Drug Delivery Rev* 41: 135-146
22. Gupta CM, Haq W (2005) Tuftsin-bearing liposomes as antibiotic carriers in treatment of macrophage infections. *Methods Enzymol* 391: 291-304
23. Ahsan F, Rivas IP, Khan MA, Torres Suarez AI (2002) Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers-liposomes and microspheres-on the phagocytosis of macrophages. *J Control Release* 79: 29-40
24. Owais M, Misra-Bhattacharya S, Haq W, Gupta CM (2003) Immunomodulator tuftsin augments antifilarial activity of diethylcarbamazine against experimental burgian filariasis. *J Drug Target* 11: 247-251
25. Khan MA, Firoz A, Jabeen R, Owais M (2004) Prophylactic role of immunomodulators in treatment of systemic candidiasis in leucopenic mice. *J Drug Target* 12: 425-433
26. Khan MA, Faisal SM, Haque W, Owais M (2002) Immunomodulator tuftsin augments anti-fungal activity of amphotericin B against experimental murine candidiasis. *J Drug Target* 10: 185-192
27. Khan MA, Ahmad N, Moin S, Mannan A, Haq W, Pasha ST, Khan A, Owais M (2005) Tuftsin-mediated immunoprophylaxis against an isolate of *Aspergillus fumigatus* shows less in vivo susceptibility to amphotericin B. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44: 269-276
28. Khan MA, Owais M (2005) Immunomodulator tuftsin increases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to liposomal amphotericin B in immunocompetent BALB/c mice. *J Drug Target* 13: 423-429
29. Khan MA, Khan A, Owais M (2006) Prophylactic use of liposomized tuftsin enhances the susceptibility of *Candida albicans* to fluconazole in leucopenic mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 46: 63-69
30. Khan MA, Nasti TH, Khanam S, Mallick AI, Ahmad I, Haq W, Ahmad N, Owais M (2004) Co-administration of immunomodulatory tuftsin and liposomized nystatin can combat less susceptible *Candida albicans* infections in temporarily neutropenic mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41: 249-258
31. Khan MA, Syed FM, Nasti HT, Saima K, Haq W, Shehbaz A, Owais M (2003) Use of tuftsin bearing nystatin liposomes against an isolate of *Candida albicans* showing less *in vivo* susceptibility to amphotericin B. *J Drug Target* 11: 93-99
32. Agrawal AK, Agrawal A, Pal A, Guru PY, Gupta CM (2002) Superior chemotherapeutic efficacy of amphotericin B in tuftsin-bearing liposomes against *Leishmania donovani* infections in hamsters. *J Drug Target* 10: 41-45
33. Fridkin M, Stabinsky Y, Zakuth V, Spierer Z (1977) Tuftsin and some analogs. Synthesis and interaction with human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 496: 203-211
34. Konopińska D, Nawrocka E, Siemion IZ, Ślopek S, Szymaniec S, Klonowska E (1977) Partial sequence of histones with tuftsin activity. *Int J Protein Peptide Res* 9: 71-77
35. Konopińska D, Najjar VA, Callery M (1982) Synthesis of tuftsinyltuftsin with potential tumoricidal activity. *Polish J Chem* 56: 1063-1066
36. Konopińska D, Siemion IZ, Szymaniec S, Ślopek S (1979) Tuftsin and its analogs. Part VII. Experimental proof of the hypothesis on functional conservatism in coding of tuftsin sequence. *Polish J Chem* 53: 343-351
37. Gershonov E, Granoth R, Tzeheval E, Gaoni Y, Fridkin M (1996) 1-Aminocyclobutane- carboxylic acid derivatives as novel structural elements in bioactive peptides: application to tuftsin analogs. *J Med Chem* 39: 4833-4843
38. Zacharic B, Sauve G, Penny C (1993) Thioacylating agents. Use of thio-benzimidazolone derivatives for the preparation of thiotuftsin analogs. *Tetrahedron* 49: 10489-10500
39. Mezo G, Szekerke M, Sarmay G, Gergely J (1990) Synthesis and functional studies of tuftsin analogs containing isopeptide bond. *Peptides* 11: 405-415
40. Nishioka K, Obeyesekere NU, McMurray JS (1995) Enhanced phagocytosis activity of cyclic analogs of tuftsin. *Biochem Pharmacol* 49: 735-738
41. Arcoleo F, Milano S, D'Agostino P, Misiano G, Cappelletti S, Gromo G, Marcucci F, Leoni F, Cillari E (1997) Effect of partially modified retro-inverso-analogues derived from C-reactive protein on the induction of nitric oxide synthesis in peritoneal macrophages. *Br J Pharmacol* 120: 1383-1389

42. Kraus-Berthier L, Ferry G, Combe-Perez V, Visalli M, Remond G, Vincent M, Bounti JA (1991) Approaches to some biochemical mechanism of action of tuftsin and analogues. *Biochem Pharmacol* 41: 1411-1418
43. Titov VM, Meshcheryakova EA, Balashova TA, Andronova TM, Ivanov VT (1995) Synthesis and immunological evaluation of the conjugates composed from a muramyl peptide GMDP and tuftsin. *Int J Peptide Protein Res* 45: 348-355
44. Fridkin G, Gilon C (2002) Azo cyclization: peptide cyclization via azo bridge formation. *J Pept Res* 60: 104-111; Correction: (2003) *J Pept Res* 61: 158-158
45. Granoth R, Vadai E, Burstein Y, Fridkin M, Tzeheval E (1997) Tuftsin-THF-gamma 2 chimeric peptides: potential novel immunomodulators. *Immunopharmacology* 37: 43-52
46. Dzierzbicka K (2004) Synthesis of conjugates of muramyl dipeptide and nor-muramyl dipeptide with retro-tuftsin (Arg-Pro-Lys-ThrOMe) as potential immunostimulants. *Pol J Chem* 78: 409-416
47. Dzierzbicka K, Trzonkowski P, Sewerynek P, Kołodziejczyk AM, Myśliwski A (2005) Synthesis and biological activity of tuftsin, its analogue and conjugates containing muramyl dipeptides or nor-muramyl dipeptides. *J Peptide Sci* 11: 123-135
48. Fridkin M, Tsubery H, Tzeheval E, Vonsover A, Biondi L, Filira F, Rocchi R (2005) Tuftsin-AZT conjugates: potential macrophage targeting for AIDS therapy. *J Peptide Sci* 11: 37-44
49. Zhang SD, Liu G, Xia SQ, Wu P, Zhang L (2002) „Meshed-Bag Gathered-Bunch“ method for solid-phase synthesis of small molecular diverse compounds. *J Comb Chem* 4: 131-137
50. Gokulan K, Khare S, Rao DN (1999) Increase in the immunogenicity of HIV peptide antigens by chemical linkage to polytuftsin (TKPR40). *DNA Cell Biol* 18: 623-630
51. Mezo G, Kalaszi A, Remenyi J, Majer Z, Hilbert A, Lang O, Kohidai L, Barna K, Gaal D, Hudecz F (2004) Synthesis, conformation, and immunoreactivity of new carrier molecules based on repeated tuftsin-like sequence. *Biopolymers* 73: 645-656
52. Manea M, Mezo G, Hudecz F, Przybylski M (2004) Conjugates containing a β -amyloid plaque specific epitope as lead structure for vaccines against Alzheimer's disease. *Biopolymers* 76: 503-511
53. Manea M, Hudecz F, Przybylski M, Mezo G (2005) Synthesis, solution conformation, and antibody recognition of oligotuftsin-based conjugates containing a β -amyloid(4-10) plaque-specific epitope. *Bioconjugate Chem* 16: 921-928

Tuftsin - new analogues and properties

Anna Wardowska^{1,✉}, Krystyna Dzierzbicka², Andrzej Myśliwski¹

¹Department of Histology and Immunology, Medical University of Gdańsk, Dębinki 1 St., 80-210 Gdańsk, Poland

²Department of Organic Chemistry, Gdansk University of Technology, 11/12 G. Narutowicza St., 80-952 Gdańsk, Poland

✉e-mail: anna.wardowska@amg.gda.pl

Key words: tuftsin, immunomodulator, tuftsin analogues, biological activity

ABSTRACT

Tuftsin, a natural tetrapeptide of sequence TKPR, occurring in the blood of humans and other mammals, capable of stimulating certain white blood cells (monocytes, macrophages, and neutrophils), was isolated at Tufts University in 1970 by Najjar and Nishioka [1]. Tuftsin is a compound with a wide spectrum of biological activities, notable enhances phagocytosis, immune response, bactericidal, tumoricidal and antifungal activities. This article concerns new analogues and properties of tuftsin.

Kamil Frankowski[✉]

Jacek Kęsy

Jan Kopcewicz

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

[✉]Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; e-mail: Kamil.Frankowski@uni.torun.pl, tel.: (056) 611 44 46, faks: (056) 611 47 72

Artykuł otrzymano 19 maja 2006 r.

Artykuł zaakceptowano 11 września 2006 r.

Słowa kluczowe: etylen, biosynteza etylenu, syntaza ACC, oksydaza ACC

Wykaz skrótów: ACC – kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy; ACO – oksydaza ACC; ACS – syntaza ACC; CDPK (ang. *calcium-dependent protein kinase*) – kinaza białkowa zależna od wapnia; MACC – malonylo-ACC; MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*) – kinaza MAP; MTA – metyloioadenozyna; PLP – 5'-fosforan pirydoksalu, SAM – S-adenozylometionina

Podziękowania: Praca powstała w trakcie realizacji grantu badawczego UMK nr 305-B. Autorzy dziękują prof. dr hab. Stanisławowi Kowalczykowi za cenne uwagi dotyczące niniejszej pracy na etapie jej powstawania

STRESZCZENIE

Etylen jest hormonem roślinnym uczestniczącym w kontroli wielu procesów wzrostu i rozwoju roślin. Reguluje on także reakcje rośliny na wiele czynników środowiskowych. Zrozumienie mechanizmów tej regulacji przyniósł dokonany w ostatnim czasie postęp badań nad biosyntezą i szlakami sygnalizacyjnymi tego hormonu. Istotne znaczenie w tej regulacji ma wielorako kontrolowana, zróżnicowana czasowo i przestrzennie ekspresja rodziny genów kodujących enzymy uczestniczące w jego biosyntezie. Bardzo ważna jest również specyficzna potranslacyjna regulacja samych białek enzymatycznych. Istnienie wielu mechanizmów regulujących poziom etylenu umożliwia temu hormonowi tak szeroki udział w kontrolowaniu funkcjonowania rośliny.

WPROWADZENIE

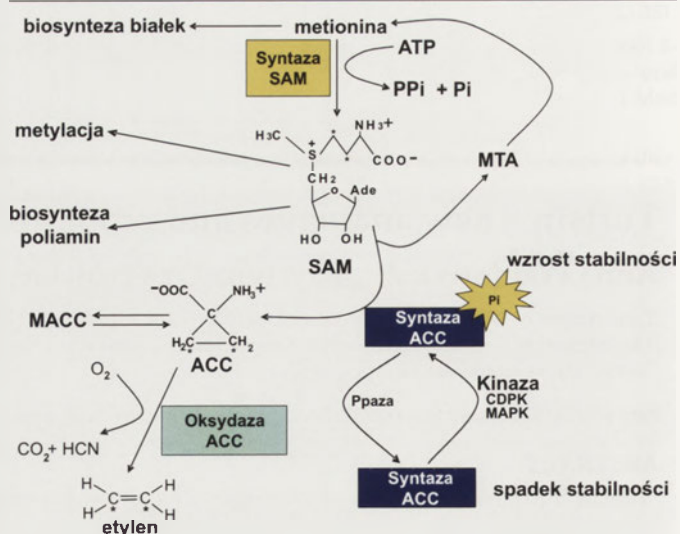
Pomimo swojej prostej dwuwęglowej struktury, etylen jest efektywnym modulatorem wzrostu i rozwoju roślin [1]. Niemal każda tkanka roślinna jest w stanie produkować etylen, jednak w większości przypadków jego produkcja utrzymuje się na stosunkowo niskim poziomie, a wzrasta jedynie w pewnych okresach rozwoju (kiełkowanie nasion, starzenie i odcinanie kwiatów i liści, dojrzewanie owoców). Wpływ na produkcję etylenu mają zarówno biotyczne (patogeny), jak i abiotyczne (zranienia, susza, niedotlenienie, O₃ i SO₂) czynniki zewnętrzne oraz hormony roślinne. Produkcja etylenu jest kontrolowana przez światło i ulega rytmicznym zmianom w cyklu dobowym [2].

Poznanie szlaku biosyntezy etylenu stało się możliwe dzięki odkryciu prekursorów tego hormonu: S-adenozylometioniny (SAM) i kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (ACC) [3] oraz wyizolowaniu i opisaniu enzymów biorących udział w jego biosyntezie – syntazy i oksydazy ACC (ACS, ACO). Po zsekwencjonowaniu genów kodujących syntazę i oksydazę ACC u różnych roślin [4-6] okazało się, że tworzą one wielogenowe rodziny, których ekspresja podlega zróżnicowanej regulacji. Szybki rozwój badań dotyczących regulacji biosyntezy etylenu spowodował brak aktualnych danych w tej dziedzinie w polskiej literaturze. Wcześniejsze prace przeglądowe na ten temat zostały opublikowane przez Jakubowicz [7,8].

SZLAK BIOSYNTETY ETYLENU

Prekursorem etylenu u roślin jest metionina, występująca w 80% w postaci S-adenozylometioniny [9], która w wielu reakcjach w komórkach pełni funkcję donora grup metylowych (Ryc. 1). Pierwszym etapem biosyntezy etylenu z S-adenozylometioniny jest jej przekształcenie do kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego.

Ten etap biosyntezy, katalizowany przez syntazę ACC (S-adenozylometionino mety-



Rycina 1. Szlak biosyntezy etylenu. Szczegółowy opis w tekście (wg [16] zmodyfikowane).

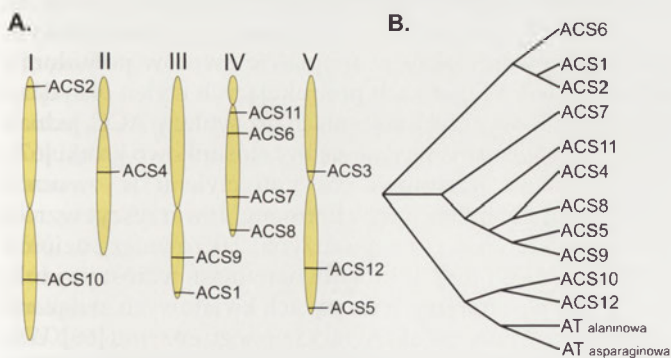
lotioadenozyno-liazę), jest jednocześnie istotnym punktem regulacji tempa biosyntezy etylenu [3,10]. Aktywność tego enzymu może być regulowana zarówno przez kinazy, jak i fosfatazy białkowe (PPazy). Powstająca jako produkt uboczny reakcji 5'-metylotioadenozyna (MTA) ulega wtórnemu przekształceniu do metioniny [11], co pozwala zachować grupę metylową oraz siarkową do następnego cyklu produkcji etylenu bez konieczności zwiększania puli metioniny. Końcowy etap biosyntezy etylenu, stanowiący zarazem drugie miejsce regulacji, katalizuje oksydaza ACC. Powstający w reakcji HCN jest przekształcany przez syntazę β -cyanoalaninową do β -cyanoalaniny. Kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy może być także przekształcony do malonylo-ACC (MACC). Reakcja ta pozwala na regulację puli wolnego kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego.

W zależności od gatunku i warunków środowiska, kontrola produkcji etylenu może odbywać się zarówno na poziomie ekspresji genów, jak i aktywności enzymów syntazy i oksydazy ACC [12-15]. Kluczowym etapem tej regulacji wydaje się być jednak katalizowana przez syntazę ACC konwersja S-adenozylometioniny do kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego [10].

GENY ENZYMÓW FUNKCJONUJĄCYCH W BIOSYNTYZIE ETYLENU

SYNTAZY ACC

Pierwszą sklonowaną syntazą ACC była syntaza cukini [4]. Zidentyfikowano i zsekwencjonowano również geny ACS z pomidora, goździka, jabłka, *Arabidopsis thaliana* i wielu innych gatunków, co zostało szeroko opisane w pracach przeglądowych [17,18]. Spośród badanych gatunków roślin najlepiej poznano rodzinę 12 genów oznaczonych jako ACS u *A. thaliana* [19-22]. Wykazano, że geny ACS u tej rośliny rozmieszczone są na pięciu chromosomach (Ryc. 2A) [19] oraz, że tworzą 3 gałęzie drzewa filogenetycznego (Ryc. 2B) [23]. Szczegółowe badania wykazały jednak, że nie wszystkie z tych genów kodują funkcjonalne białka. Produkt genu ACS1 jest nieaktywny [23], a ACS3 to pseudogen stanowiący częściowo zdeletowaną [24] lub, według innych, zduplikowaną [23,25] formę ACS1. Geny oznaczone jako ACS10 i ACS12 wykazują natomiast silne podobieństwo do aminotransferaz [23]. W pełni aktywne białka kodowane są przez 8 genów (ACS2, ACS4-ACS9, ACS11) [20-24].



Rycina 2. Schemat rozmieszczenia genów ACS na chromosomach *A. thaliana* (A) oraz drzewo filogenetyczne, obrazujące pochodzenie syntaz ACC i aminotransferaz (AT) (B) (wg [23] zmodyfikowane).

Tabela 1. Wpływ różnych czynników na ekspresję genów z rodziny syntaz ACC u *Arabidopsis thaliana*.

Czynniki wpływające na ekspresję genów ACS	Wpływ na ekspresję	Piśmiennictwo
Auksyny	indukcja ekspresji ACS2, ACS4-ACS12	[20, 22, 23, 29-34]
Cykloheksimid (CHX)	wzmoczona akumulacja mRNA wszystkich genów ACS za wyjątkiem ACS1	[23]
Etylen	stymulacja ekspresji: ACS6 ACS2 (traktowanie etylenem powyżej 2h zwrotnie hamuje ekspresję ACS2) negatywna regulacja: ACS8	[31] [21, 35] [2]
Zranienia	indukcja ekspresji ACS2, ACS4, ACS6	[20, 21, 30, 31, 35]
Czynniki środowiskowe (cyjanek, O ₃ , bodźce mechaniczne)	indukcja ekspresji ACS6	[22, 31-33]
Światło	indukcja ekspresji ACS2, ACS5, ACS8, ACS9	[2]
Zegar okołodobowy	indukcja ekspresji ACS8	[2]

Wykazano, że ekspresja genów kodujących poszczególne izoformy syntaz ACC regulowana jest w sposób zróżnicowany [26-28], zarówno przez czynniki wewnętrzne, jak i zewnętrzne (Tab. 1). Ekspresja poszczególnych genów ACS jest także zróżnicowana tkankowo. W korzeniach siewek *A. thaliana* rosnących na świetle wykazano ekspresję genów ACS2, ACS4-ACS12, podczas gdy w liściach ekspresji ulegają ACS1, ACS2, ACS4-ACS8, ACS11 i ACS12 [23, 29]. Ekspresja ACS1 i ACS5 zachodzi w hypokotylach. W kwiatach natomiast ekspresji ulegały ACS1, ACS2, ACS4-ACS9 i ACS11, w łuszczykach ACS1, ACS2, ACS5, ACS8-ACS12.

OKSYDAZY ACC

Oksydazy ACC należą do rodziny dioksygenaz. U *A. thaliana* obejmuje ona 17 genów, z których tylko dwa zostały scharakteryzowane funkcjonalnie [36,37]. Ekspresja genów ACO jest również zróżnicowana tkankowo. Pokazano, że odgrywa ona istotną rolę w tworzeniu haczykowatego zagięcia pędu. Akumulacja transkryptu *AtACO2* u rzodkiewnika ma miejsce w komórkach znajdujących się po jego zewnętrznej stronie, co koreluje z wcześniejszymi doniesieniami Schwark'a i Bopp'a dotyczącymi ilościowego rozkładu kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego w pędach siewek fasoli [37,38]. Mimo że u grochu akumulacja mRNA *PsACO1* występuje po wewnętrznej stronie haczykowatego zagięcia pędu [27], to jednak różnice te mogą być wynikiem odmiennego mechanizmu tworzenia się tej struktury u obu gatunków [37]. U grochu zagięcie tworzy się powyżej liścieni (roślina epigeiczna), a u *A. thaliana* poniżej liścieni (roślina hypogeiczna).

W genomie pomidora zidentyfikowano cztery geny kodujące oksydazy ACC: *LeACO1-LeACO4* [39-42]. W dojrzewających owocach i starzejących się liściach tej rośliny zaobserwowano wzmożoną akumulację transkryptów *LeACO1* i *LeACO3*, a zranienia stymulują ekspresję *LeACO1* [39]. W pylnikach po zapyleniu obserwowano wzrost poziomu mRNA *LeACO2*, natomiast w znamieniu słupka, słupku i w płatkach korony *LeACO3*. Postępujący proces starzenia organów kwiatowych pomidora koreluje ze wzrostem akumulacji mRNA *LeACO1* [43]. Spośród trzech zidentyfikowanych genów ACC u melona, ekspresja *CMeACO1* zachodzi w dojrziałych owocach oraz w liściach, natomiast w etiolo- wanych hypokotylach obserwowano podwyższoną akumulację mRNA *CMeACO2*, a w kwiatach *CMeACO3* [44].

BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI ENZYMÓW BIOSYNTETY ETYLENU

SYNTAZY ACC

Syntazy ACC należą do rodziny białek, których struktura przypomina podgrupę aminotransferaz zależnych od 5'-fosforanu pirydoksalu (PLP) [45]. PLP jest kofaktorem wiążącym się do miejsca aktywnego syntaz przed związaniem liganda. Syntazy ACC są enzymami cytosolowymi, o krótkim czasie półtrwania [3,11,46], regulowanymi zarówno na poziomie transkrypcyjnym [11,16,47], jak i potranslacyjnym, m. in. w szlaku degradacji zależnym od ubikwitylacji [47,48]. Masy cząsteczkowe polipeptydów kodowanych przez geny ACS u *A. thaliana*, podobnie jak syntazy innych gatunków roślin, mieszczą się w granicach 50 – 61 kDa [10,23,49]. Stopień identyczności ich sekwencji aminokwasowych wynosi 32 – 91%, co wskazuje na dużą różnorodność tych białek [23]. W badaniach ekspresji poszczególnych form ACS w komórkach *E. coli* stwierdzono, że za wyjątkiem ACS1, ACS10 i ACS12, wszystkie inne syntazy wykazują aktywność enzymatyczną [23]. Brak aktywności ACS1 tłumaczy się brakiem specyficznej trójki aminokwasów Thr-Asn-Pro (TNP), bądź Pro-Ser-Asn (PSN) w ewolucyjnie zachowywanym regionie IV polipeptydów (Ryc. 3), który jest częścią wypełnienia znajdującego się bardzo blisko reszty Asn²⁰⁹, wchodzącej w skład centrum aktywnego [50,51]. Usunięcie tego tripeptydu z ACS2 powoduje utratę aktywności enzymatycznej [24]. Wydaje się, że TNP odgrywa istotną rolę w pozycjonowaniu Lys²⁷⁸ (region V) wewnątrz centrum aktywnego, gdyż wprowadzenie TNP do ACS1 przywraca jej aktywność [24,50,51].

ACS10 i ACS12, podobnie jak ACS1, były początkowo uważane za pseudogeny. Analiza filogenetyczna oraz analiza komplementacji z użyciem mutantu ATazy DL39 *E. coli* wykazały jednak, że funkcjonalnie ACS10 i ACS12 są aminotransferazami o wysokiej specyficzności względem asparagianinu i aminokwasów aromatycznych (funkcjonalne izoformy syntazy ACC nie wykazują aktywności aminotransferaz) [23]. W związku z tym, rodzina genów ACS u *A. thaliana* obejmuje 8 genów funkcjonalnych i 1 gen niefunkcjonalny.

Na podstawie struktury krystalograficznej oraz w oparciu o SDS-PAGE, filtrację żelową i analizę komplementacji mutacji ustalono, że aktywne syntazy ACC tworzą homo- i

heterodimery, a ich centrum aktywne tworzone jest wskutek oddziaływań poszczególnych monomerów [23,25,50,52-54]. Reszta Tyr⁹² (region II) oddziałuje ze znajdującą się w centrum aktywnym Lys²⁷⁸, która z kolei tworzy kowalencyjną zasadę Shiff'a z PLP pochodzącym z drugiej podjednostki [50]. U *A. thaliana* heterodimery mogą powstawać jedynie między polipeptydami należącymi do tej samej gałęzi filogenetycznej (Ryc. 2B) [25]. Wskazuje to na fakt istnienia strukturalnego podobieństwa centrów aktywnych zarówno homo-, jak i heterodimerów. Wyjątkiem jest ACS7, która może tworzyć funkcjonalne heterodimery z syntazami obu gałęzi filogenetycznych, np. z ACS6, ACS4, ACS8, ACS9 [25]. Nawet nieaktywna enzymatycznie ACS1 tworzy aktywne enzymatycznie heterodimery z ACS2 i ACS6, jednak w tym wypadku donorem reszty Lys²⁷⁸ nie może być ACS1 [25]. Ostatecznie wykazano, że polipeptydy syntazy ACC mogą utworzyć 45 homo- i heterodimerów, z czego jedynie 8 homo- i 17 heterodimerów jest aktywnych enzymatycznie, pozostałe zaś są nieaktywne [25].

Wszystkie izozymy syntazy ACC zawierają 7 zachowanych w ewolucji regionów oraz 11 zachowanych w ewolucji reszt aminokwasowych charakterystycznych dla syntaz i aminotransferaz (Ryc. 3) [49,55-58]. W ACS10 Tyr⁹² została zastąpiona przez resztę Ser, a w ACS12 przez Phe. Większość zachowanych w ewolucji reszt aminokwasowych zgrupowana jest na powierzchni dimerów, blisko centrum aktywnego [50]. Odpowiedzialna za specyficzność substratową reszta Glx (region I) jest obecna we wszystkich syntazach ACC z wyjątkiem ACS10, gdzie została zastąpiona przez Gln [59]. Wydaje się, że reszta Glx nie jest jedynym czynnikiem nadającym specyficzność substratową, gdyż posiadająca ją ACS12 nie wykazuje aktywności syntazy. Ze względu na silnie skrócony C-końcowy fragment ACS7, ACS10 i ACS12 nie posiadają, mającej istotne znaczenie dla regulacji aktywności, konserwatywnej reszty Ser [60].

OKSYDAZY ACC

Z powodu trudności z izolacją aktywnego enzymu oksydazę ACC nazywano początkowo enzymem tworzącym etylen (ang. *ethylene-forming enzyme*) i przyjmowano, że jest on związany z frakcją błonową [3,61]. Pierwszą aktywną oksydazę ACC wyizolowano z melona i stwierdzono, że należy ona do rodziny oksygenaz [62]. Oksydazy ACC do swojej aktywności wymagają Fe²⁺ jako kofaktora, O₂ i askorbinianu jako kosubstratów oraz CO₂ jako aktywatora, który prawdopodobnie chroni centrum aktywne enzymu przez tworzenie kompleksu z Fe(II) [63,64]. Obecnie wydaje się, że oksydazy ACC są białkami cytosolowymi, chociaż enzym ten lokalizowano także w apoplacie owoców pomidora i jabłka [65,66]. W tkankach produkujących etylen oksydazy występują w wyższych stężeniach niż syntazy ACC, jednak ich okres półtrwania wydaje się być stosunkowo krótki [67]. Endogennemu wzrostowi poziomu etylenu w owocach brzoskwini po aplikacji tego hormonu, towarzyszył wzrost zarówno aktywności samego enzymu, jak również poziomu mRNA *PPACO1* [68]. U broku natomiast, wzrost produkcji etylenu w starzejących się pąkach kwiatowych związany był tylko ze wzrostem aktywności samego enzymu [69]. Wydaje się, że podobnie jak w przypadku syntaz ACC, poziom ekspresji, jak i aktywności oksydaz ACC jest zależny od organu oraz warunków rozwojowych i środowiskowych.

ACS1	... I Q MGLAENQL FQDYHGL FCLADP GDAFLv PTPYY s N - - - P L G T ...
ACS2	... I Q MGLAENQL FQDYHGL FCLADP GDVFLi Ps PYY T NPSNPL G T ...
ACS4	... I Q MGLAENQL FQDYHGL FCLADP GDAFLi PTPYY T NPSNPL G T ...
ACS5	... I Q MGLAENQL FQDYHGm FCLAc P GDAFLi PTPYY T NPSNPL G T ...
ACS6	... I Q MGLAENQL FQDYHGL FCLAn P G Dg FLv PTPYY T NPSNPL G T ...
ACS7	... I Q MGLAENQv FQDYHGL F ILADP NDALLv PTPYY T NPSNPL G A ...
ACS8	... I Q MGLAENQL FQDYHGL FCLADP GDAFLi PTPYY T NPSNPL G T ...
ACS9	... I Q MGLAENQL FQDYHGL FCLAc P GDAFLi PTPYY T NPSNPL G T ...
ACS10	... I Q I GLAqNn K ye P S DGL FCLADs Gn AFLv PT PCS s NPSNP mG s ...
ACS11	... v Q MGLAENQL FQDYHGL FCLAn P GDAFLi PAPYY T NPSNPL G T ...
ACS12	... I Q I GLAESTL yK P f EGL FCLADHGn AFLi PTPYY s NPSNP v G N ...
	Region I	Region II	Region III		Region IV
ACS1	... DEIY YS LSKDmGLP GFRVG MS SFGLVSSQTQ EP GWFRVCFAN Lk LSL ...
ACS2	... DEIY YS LSKDmGLP GFRVG MS SFGLVSSQTQ EP GWFR i CFAN LRLSf ...
ACS4	... DEIY CS LSKDL GLP GFRVG MS SFGLVSSQTQ EP GWFRVCFAN FRLSf ...
ACS5	... DEIY YS LSKDL GLP GFRVG MS SFGLVSSQTQ EP GWFRVCFAN FRv Sw ...
ACS6	... DEIY YS LSKDmGLP GLRVG MS SFGLVSSQTQ EP GWFRVCFAN LRLSf ...
ACS7	... DEIY YS LSKDL GLP GFRVG MS SFTLVSSQTQ EVGWFRVCFAN - - - - - ...
ACS8	... DEIY YS LSKDL GLP GFRVG MS SFGL i SSQTQ EP GWFRVCFAN FRLSf ...
ACS9	... DEIY YS LSKDL GLP GFRVG MS SFGLVSSQTQ EP GWFRVCFAN FRv Sw ...
ACS10	... n EI f YDLSKDL S FRGLRS a I t tLS PVSSP TQ EP GWFR i CF s N - - - - - ...
ACS11	... DEIY YS LSKDL GLP GFRVG MS SFGL i SSQTQ EP GWFRVCFAN Sk LSS ...
ACS12	... DEI f YGLSKDL S i PGFRAG I MRFS SVPVLVQ EP GWFRCCFTA - - - - - ...
		Region V	Region VI	Region VII	

Rycina 3. Zestawienie fragmentów sekwencji aminokwasowych syntaz ACC z *A. thaliana* z zaznaczeniem 7 ewolucyjnie zachowywanych regionów (Region I - VII), 11 ewolucyjnie zachowywanych reszt aminokwasowych (niewypełnione trójkąty), reszty Glx (wypełniony trójkąt) nadającej specyficzność substratową oraz reszty Ser (gwiazdka), będącej miejscem fosforylacji. Szczegółowy opis w tekście (wg [23] zmodyfikowane).

REGULACJA BIOSYNTETY ETYLENU

Obserwowane zmiany produkcji etylenu wywołane czynnikami wewnętrznymi i środowiskowymi spowodowane są skomplikowaną regulacją na poziomie ekspresji genów, jak i regulacją potranslacyjną. Istotne znaczenie w regulacji biosyntezy etylenu mają auksyny, cytokiny oraz zegar okołodobowy. Kontrola biosyntezy etylenu odbywa się także na zasadzie sprzężenia zwrotnego poprzez autokatalityczny lub autoinhibycyjny wpływ na ekspresję genów zaangażowanych w jego biosyntezę, jednakże molekularne mechanizmy tych interakcji są słabo poznane.

REGULACJA PRZEZ AUKSYNĘ

Auksyny stymulują produkcję etylenu poprzez aktywację genów syntaz ACC. U rzodkiewnika ekspresja ACS4 w odpowiedzi na egzogenne podanie IAA następuje już po 25 minutach i jest niewrażliwa na inhibitory biosyntezy białek, co sugeruje, że jest to pierwotna odpowiedź na auksyny [30]. Promotor ACS4 zawiera cztery motywy charakterystyczne dla grupy czynników pierwotnej odpowiedzi na auksyny [30]. Postulowany model działania auksyny zakłada, że wiąże się ona bezpośrednio do jednego z białek kompleksu ligazy E3 typu SCF, przez co aktywuje proteolizę białek AUX/IAA, blokujących działanie czynników transkrypcyjnych ARF (ang. *auxin response factor*) [70-72]. Jedno z takich białek, ARF19, po uwolnieniu z kompleksu ARF-AUX/IAA, wiąże się z sekwencją promotorową ACS4, aktywując jego

ekspresję [73]. Interakcja auksyn z etylenem ma jednak bardziej złożony charakter. Zauważono, że aktywacja białka ARF19 następuje również pod wpływem etylenu oraz, że etylen powoduje stymulację biosyntezy IAA [73]. Mechanizm tej interakcji polega na aktywacji przez etylen genów syntazy antranilowej, odpowiedzialnej za syntezę IAA. Wzrost poziomu IAA prowadzi z kolei do wzrostu poziomu etylenu. Efekt ten może być podstawą wspomnianego wyżej mechanizmu pozytywnego sprzężenia zwrotnego w biosyntezie etylenu.

REGULACJA EKSPRESJI ACS I ACO PRZEZ ŚWIATŁO I ZEGAR OKOŁODOBOWY

Zegar okołodobowy odpowiedzialny jest za regulację 24 godzinnych rytmów takich zjawisk, jak np. ruchy liści czy elongacja hypokotyli [48,49]. Cyklicznym zmianom ulega również produkcja etylenu [14,50]. Wykazano, że fluktuacjom tym towarzyszą zmiany aktywności zarówno syntazy, jak i oksydazy ACC [13,52]. Rolę zegara w regulacji produkcji etylenu u roślin potwierdziły badania prowadzone na mutantach *A. thaliana toc1-1* i *cca1-ox* [2]. Cykliczne uwalnianie etylenu u rzodkiewnika jest skorelowane z fluktuacjami poziomu transkryptów ACS2, ACS5, ACS8, ACS9, przy czym ACS8 zachowuje rytmiczność ekspresji zarówno po przeniesieniu roślin na ciągłe światło, jak i na ciągłą ciemność, podczas gdy ACS5 i ACS9 jedynie po przeniesieniu na ciągłe światło [2]. Ekspresja genu ACS2 charakteryzuje się natomiast 12 godzinnym przesunięciem w fazie w stosunku

do ACS8. Analiza promotora genu ACS8 ujawniła obecność w nim charakterystycznego regionu CAANNNNATC odpowiedzialnego za dobową regulację ekspresji genów *LHC/CAB* – kodujących białka związane z fotosyntezą [2,56,57]. Uważa się zatem, że dobowe zmiany produkcji etylenu u *A. thaliana* są związane z cykliczną ekspresją genu ACS8.

Choć w większości przypadków to syntazy ACC są odpowiedzialne za generowanie rytmów produkcji etylenu w cyklu dobowym, to jednak można przypuszczać, że u pewnych gatunków, czy też na pewnych etapach rozwoju, biosynteza etylenu może być również regulowana na poziomie oksydaz ACC. Towarzyszący przeniesieniu siewek *A. thaliana* do ciemności spadek uwalniania etylenu skorelowany jest ze spadkiem poziomu transkryptów *ACO* [2]. Po przeniesieniu siewek na światło ciągle następuje wzrost akumulacji mRNA *ACO*. Fizjologiczne znaczenie rytmicznej produkcji etylenu u roślin pozostaje niejasne, choć przypuszcza się, że etylen odgrywa istotną rolę w regulacji wydłużania się pędu [50,58,59].

REGULACJA POTRANSLACYJNA

Na istnienie potranslacyjnego mechanizmu regulującego aktywność syntazy ACC wskazują badania, w których obserwowano wzrost aktywności tych enzymów po jednoczesnym podaniu elicitora i inhibitorów transkrypcji [74,75]. Szczegóły tego zjawiska zostały poznane dzięki badaniom mutantów szlaku biosyntezy etylenu *cin* (ang. *cytokinin-insensitive*) [76,77] oraz *eto* (ang. *ethylene-overproducer*), u których obserwowano anomalie w biosyntezie tego hormonu [77,78]. Mutanty *cin* charakteryzują się brakiem produkcji etylenu w odpowiedzi na aplikację cytokinin, podczas gdy mutanty *eto* mają podwyższony poziom biosyntezy etylenu i wykazują wzmożoną odpowiedź na etylen.

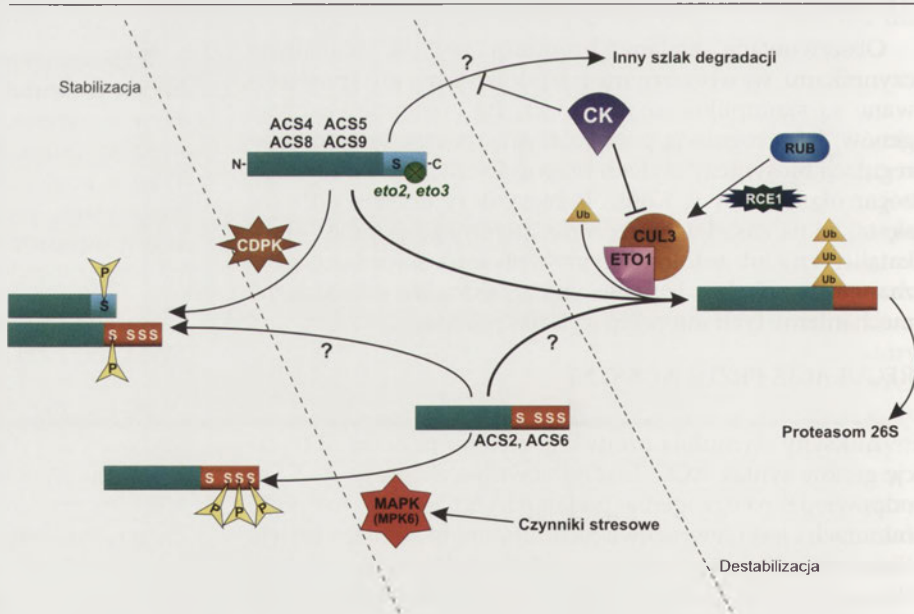
Zidentyfikowano trzy mutanty *eto*: *eto1* – recesywny [78], *eto2* i *eto3* – dominujące [79]. Ustalono, że mutacja *eto2*, polegająca na insercji pojedynczej pary zasad na końcu 3' ACS5, prowadzi do zmiany dwunastu C-końcowych aminokwasów białka [76]. Zmiana ta w konsekwencji powoduje stabilizację enzymu, nie wpływając przy tym na poziom jego mRNA [47]. Mutacja *eto3*, natomiast, polega na zamianie Val⁴⁵⁷ na Asp w C-końcowej części ACS9 [47]. Zamiana ta również prowadzi do wzrostu stabilności enzymu, nie wpływając na poziom transkryptu.

Po zsekwencjonowaniu *ETO1* [80] okazało się, że koduje on białko zawierające domenę BTB (ang. *broad-complex, tramtrack, bric-à-brac*) i należy do rodziny białek tworzących kompleksy ligaz E3 ubikwityny typu BTB (Ryc. 4) [81,82]. Wykazano, że *ETO1* bezpośrednio oddziałuje zarówno z ACS5 jak i *CUL3* [80]. Wydaje się więc, że pełni ono rolę substratowo specyficznego białka adaptorowego wyznaczającego

ACS5 (być może też inne izoformy syntazy ACC) do degradacji z udziałem proteasomu 26S. Za interakcję z *ETO1* odpowiada prawdopodobnie C-końcowy fragment ACS5, gdyż mutacja *eto2* zaburza oddziaływanie tych dwóch białek. Doświadczenia *in vitro*, wykazujące hamujący wpływ *ETO1* na aktywność ACS5 [80] sugerują, że *ETO1* nie tylko uczestniczy w degradacji ACS5, ale również obniża jego aktywność enzymatyczną. Tak więc, większa stabilność ACS5 i ACS9 u mutantów *eto2* i *eto3* wydaje się być wynikiem braku możliwości interakcji między tymi białkami a składnikiem kompleksu ligazy E3, *ETO1*.

Po poznaniu sekwencji genu *CIN5* okazało się, że jest on, podobnie jak *ETO2*, zmutowanym allelem ACS5 [76]. Podanie cytokininy etiolowanym siewkom *A. thaliana* prowadzi do wzrostu czasu półtrwania ACS5 [47], co sugeruje, że hormon ten wpływa na biosyntezę etylenu przez zwiększenie stabilności białka ACS5. Na podstawie analiz mutantów *eto* można przypuszczać, że indukcja biosyntezy etylenu przez cytokininy polega na blokowaniu interakcji ACS5 z *ETO1* poprzez modyfikację C-końcowej domeny tego enzymu. Okazuje się jednak, że cytokininy dodatkowo zwiększają stabilność ACS5 również u mutantów *eto2* i *eto3* [47,80]. Wskazuje to na istnienie dodatkowego mechanizmu, za pomocą którego cytokininy zwiększają produkcję etylenu u *A. thaliana* (Ryc. 4).

Istotnym elementem mechanizmu proteolitycznej degradacji białek z udziałem proteasomu 26S w komórkach jest rubinyllacja, polegająca na koniugacji białek RUB (ang. *related to ubiquitin*) do kompleksu ligazy ubikwityny E3 [83]. Zauważono, że mutanty *A. thaliana* z niefunkcyjnymi białkami RUB1 i RUB2 charakteryzują się zwiększoną produkcją etylenu [84]. Aczkolwiek u mutantu *rce1* (ang. *rub*



Rycina 4. Model regulacji biosyntezy etylenu. Ze względu na różnice C-końcowych domen dwu klas syntaz ACC, regulacja ich aktywności przebiega w odmienny sposób (kolor czerwony i jasnoniebieski). Reszty Ser zlokalizowane na końcach C tych enzymów, stanowią miejsca docelowe dla kinaz białkowych zależnych od wapnia (CDPK) lub kinaz MAP (MAPK). Fosforylacja może hamować zachodzącą z udziałem proteasomu 26S proteolityczną degradację syntaz ACC, blokując oddziaływanie kompleksu ligazy ubikwityny E3 typu BTB (*ETO1-CUL3*) z ACS. Nie wiadomo czy ACS2 i ACS6 są również degradowane przez proteasom 26S (strzałki ze znakiem zapytania). Kompleks *ETO1-CUL3* katalizuje kowalencyjne przyłączenie ubikwityny (Ub) do ACS. Aktywność *ETO1-CUL3* jest modyfikowana przez przyłączenie białek RUB do kompleksu, co katalizuje enzym koniugujący *RCE1*. Zmienione w wyniku mutacji C-końcowe fragmenty ACS5 i ACS9 uniemożliwiają proteolizę tych białek (kolor zielony). Szczegółowy opis w tekście (wg [93] zmodyfikowane).

conjugating enzyme), wykazującego defekt w przyłączeniu RUB do kompleksu ligazy E3, wzrost produkcji etylenu korelował ze zwiększoną aktywnością oksydazy ACC [85]. Może to wynikać z faktu, że sam etylen stymuluje aktywność oksydaz ACC [36,86]. Wydaje się zatem, że podniesiony poziom biosyntezy etylenu u *rce1* jest rezultatem wzrostu stabilności syntaz ACC, spowodowanej defektem ligazy ubikwityny E3.

Innym mechanizmem regulującym tempo degradacji białek z udziałem ubikwityny jest proteoliza składników samego kompleksu ubikwitylującego poprzez mechanizm autoubikwitylacji [87,88]. Potraktowanie cytokininami transgenicznych roślin *A. thaliana* z nadekspresją *ETO1* nie prowadzi do stabilizacji syntaz ACC, co sugeruje, że dostępność *ETO1* odgrywa także istotną rolę w regulacji degradacji syntazy ACC [80].

Istotne znaczenie dla stabilności enzymów biorących udział w biosyntezie etylenu mają również procesy fosforylacji i defosforylacji białek. Inhibitory kinaz Ser/Thr obniżają produkcję etylenu, podczas gdy aplikacja inhibitora fosfataz białkowych powoduje wzrost jego produkcji [89,90]. Wykazano również, że katalizowana przez CDPK fosforylacja reszty Ser⁴⁶⁰ w LeACS2 z pomidora stanowi istotny etap regulacji jej aktywności [60]. Na podstawie porównania sekwencji aminokwasowych syntaz ACC z różnych gatunków roślin ustalono, że w regionie końca C większości enzymów zachowywany jest charakterystyczny tripeptyd Arg/Lys-Leu/Val-Ser [60]. Ufosforylowana reszta Ser⁴⁶⁰ w LeACS2 jest odpowiednikiem reszty Ser⁴⁶¹ ACS5 z *A. thaliana*, zmutowanej u *eto2* [60]. Można zatem przypuszczać, że regulacja aktywności syntaz ACC, mających ewolucyjnie zachowywaną sekwencję końca C (u *A. thaliana* są to ACS4, ACS5, ACS8, ACS9), odbywa się w podobny sposób. Substratami dla CDPK mogą być także izozymy syntazy ACC nie posiadające konserwatywnego C-końcowego fragmentu, a mające resztę Ser [91].

W genetycznych i biochemicznych badaniach odpowiedzi na czynniki stresowe wykazano, że również kinazy MAP regulują stabilność syntaz ACC [92]. Aktywacja szlaku kinaz MAP prowadzi do stabilizacji ACS6, a fosforylacja trzech reszt seryny w ACS2 i ACS6 przez MPK6 z tytoniu (ortolog indukowanej stresem kinazy SIPK z *A. thaliana*) blokuje ich degradację (Ryc. 4). Docelowe miejsca fosforylacji dla kinaz MAP występują na C-końcowych fragmentach ACS1, ACS2 i ACS6, co wskazuje na specyficzną regulację aktywności tych enzymów.

PODSUMOWANIE

Przedstawiona w niniejszej pracy wielopoziomowa regulacja biosyntezy etylenu wynika z udziału tego hormonu w kontroli szerokiego spektrum procesów fizjologicznych: od kiełkowania nasion, przez całą ontogenezę, po reakcje roślin na bodźce środowiskowe. Wielogenowa rodzina syntaz ACC, w której poszczególne geny podlegają zróżnicowanej ekspresji, a ich produkty cechują się zróżnicowanymi właściwościami biochemicznymi, mogą tworzyć homo- i heterodimery, pozwala roślinom reagować na zmieniające się warunki w sposób czasowo i przestrzennie specyficzny.

W etylenową regulację wpisuje się dodatkowo sam szlak sygnalizacyjny tego hormonu, jak i jego oddziaływania z innymi szlakami sygnalizacyjnymi. Z pewnością na tym nie kończy się złożoność tej regulacji. Należy się spodziewać, że w niedalekiej przyszłości poznamy więcej szczegółów tych skomplikowanych współzależności.

PIŚMIENNICTWO

1. Ecker JR (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 268: 667-675
2. Thain SC, Vandenbussche F, Laarhoven LJJ, Dowson-Day MJ, Wang ZY, Tobin EM, Harren FJM, Millar AJ, Van Der Straeten D (2004) Circadian rhythms of ethylene emission in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136: 3751-3761
3. Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 35: 155-189
4. Sato T, Theologis A (1989) Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6621-6625
5. Hamilton AJ, Bouzayen M, Grierson D (1991) Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7434-7437
6. Spanu P, Reinhardt D, Boller T (1991) Analysis and cloning of the ethylene-forming enzyme from tomato by functional expression of its mRNA in *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J* 10: 2007-2013
7. Jakubowicz M (1996) Etylen - jego udział w regulacji dojrzewania owoców i starzenia się kwiatów. *Aspekty biotechnologiczne. Postępy Biochem* 42: 65-72
8. Jakubowicz M (2002) Structure, catalytic activity and evolutionary relationships of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme of ethylene synthesis in higher plants. *Acta Biochim Polon* 49: 757-774
9. Ravanel S, Gakiere B, Job D, Douce R (1998) The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7805-7812
10. Kende H (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 283-307
11. Bleeker AB, Kende H (2000) Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 1-18
12. Kathiresan A, Reid DM, Chinnappa CC (1996) Light-entrained and temperature-entrained circadian regulation of activity and messenger RNA accumulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase in *Stellaria longipes*. *Planta* 199: 329-335
13. Kathiresan A, Nagarathna KC, Moloney MM, Reid DM, Chinnappa CC (1998) Differential regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family and its role in phenotypic plasticity in *Stellaria longipes*. *Plant Mol Biol* 36: 265-274
14. Machackova I, Chauvaux N, Dewitte W, van Onkelen H (1997) Diurnal fluctuations in ethylene formation in *Chenopodium rubrum*. *Plant Physiol* 113: 981-985
15. Finlayson SA, Lee IJ, Mullet JE, Morgan PW (1999) The mechanism of rhythmic ethylene production in *Sorghum*. The role of phytochrome B and simulated shading. *Plant Physiol* 119: 1083-1089
16. Wang KLC, Li H, Ecker JR (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14: Suppl. S131-S151
17. Johnson PR, Ecker JR (1998) The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annu Rev Genet* 32: 227-254
18. Ge L, Liu JZ, Wong WS, Hsiao WLW, Chong K, Xu ZK, Yang SF, Kung SD, Li N (2000) Identification of a novel multiple environmental factor-responsive 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene, *NT-ACS2*, from tobacco. *Plant Cell Environ* 23: 1169-1182
19. The Arabidopsis Genome Initiative (2000) *Nature* 408: 796-815
20. Liang X, Abel S, Keller JA, Shen NF, Theologis A (1992) The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11046-11050
21. Van der Straeten D, Rodrigues-Pousada RA, Villarroel R, Hanley S, Goodman HM, Van Montagu M (1992) Cloning, genetic mapping, and expression analysis of an *Arabidopsis thaliana* gene that encodes 1-ami-

- nocyclopropane-1-carboxylate synthase. Proc Natl Acad Sci USA 89: 9969-9973
22. Arteca JM, Arteca RN (1999) A multi-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (*ACS6*) in mature *Arabidopsis* leaves. Plant Mol Biol 39: 209-219
 23. Liang X, Oono Y, Shen NF, Kohler C, Li K, Scolnik PA, Theologis A (1995) Characterization of two members (*ACS1* and *ACS3*) of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. Gene 167: 17-24
 24. Yamagami T, Tsuchisaka A, Yamada K, Haddon WF, Harden LA, Theologis A (2003) Biochemical diversity among the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the *Arabidopsis* gene family. J Biol Chem 278: 49102-49112
 25. Tsuchisaka A, Theologis A (2004) Heterodimeric interactions among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase polypeptides encoded by the *Arabidopsis* gene family. Proc Natl Acad Sci USA 101: 2275-2280
 26. Oetiker JH, Olson DC, Shiu OY, Yang SF (1997) Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Mol Biol 34: 275-286
 27. Peck SC, Kende H (1998) Differential regulation of genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (*ACC*) synthase in etiolated pea seedlings: Effects of indole-3-acetic acid, wounding, and ethylene. Plant Mol Biol 38: 977-982
 28. Barry CS, Llop-Tous MI, Grierson D (2000) The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. Plant Physiol 123: 979-986
 29. Tsuchisaka A, Theologis A (2004) Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. Plant Physiol 136: 2982-3000
 30. Abel S, Nguyen MD, Chow W, Theologis A (1995) *ACS4*, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 270: 19093-19099
 31. Vahala J, Schlaghaufer CD, Pell EJ (1998) Induction of an *ACC* synthase cDNA by ozone in light-grown *Arabidopsis thaliana* leaves. Physiol Plant 103: 45-50
 32. Overmyer K, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, Sandermann H Jr, Kangasjärvi J (2000) Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. Plant Cell 12: 1849-1862
 33. Smith JM, Arteca RN (2000) Molecular control of ethylene production by cyanide in *Arabidopsis thaliana*. Physiol Plant 109: 180-187
 34. Tian Q, Uhlir NJ, Reed JW (2002) *Arabidopsis* *SHY2/IAA3* inhibits auxin regulated gene expression. Plant Cell 14: 301-319
 35. Liang X, Shen NF, Theologis A (1996) Li(+)-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 10: 1027-1036
 36. Gomez-Lim MA, Valdes-Lopez V, Cruz-Hernandez A, Saucedo-Arias LJ (1993) Isolation and characterization of a gene involved in ethylene biosynthesis from *Arabidopsis thaliana*. Gene 134: 217-221
 37. Raz V, Ecker JR (1999) Regulation of differential growth in the apical hook of *Arabidopsis*. Development 126: 3661-3668
 38. Schwark A, Bopp M (1993) Interaction of ethylene and auxin in the regulation of hook growth II. The role of ethylene in different growing regions of the hypocotyls hook of *Phaseolus vulgaris*. J Plant Physiol 142: 585-592
 39. Alexander L, Grierson D (2002) Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. J Exp Bot 53: 2039-2055
 40. Bidonde S, Ferrer MA, Zagzouti H, Ramassamy S, Latche A, Pech JC, Hamilton AJ, Grierson D, Bouzayen M (1998) Expression and characterization of three tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase cDNAs in yeast. Eur J Biochem 253: 20-26
 41. Nakatsuka A, Murachi S, Okumishi H, Shiomi S, Nakano R, Inaba KY (1998) Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. Plant Physiol 118: 1295-1305
 42. Pech JC, Latche A, Bouzayen M (2004) Ethylene biosynthesis, W: Davies PJ (red) Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, London, str. 115-136
 43. Fluhr R, Mattoo AK (1996) Ethylene biosynthesis and perception. Crit Rev Plant Sci 15: 479-523
 44. Lelievre JM, Latche A, Jones B, Bouzayen M, Pech JC (1997) Ethylene and fruit ripening. Physiol Plant 101: 727-739
 45. Mehta PK, Hale TI, Christen P (1993) Aminotransferases: Demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. Eur J Biochem 214: 549-561
 46. Yip WK, Dong JG, Kenny JW, Thompson GA, Yang SF (1990) Characterization and sequencing of the active site of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. Proc Natl Acad Sci USA 87: 7930-7934
 47. Chae HS, Faure F, Kieber JJ (2003) The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of *ACS* protein. Plant Cell 15: 545-559
 48. Woeste KE, Ye C, Kieber JJ (1999) Two *Arabidopsis* mutants that overproduce ethylene are affected in the posttranscriptional regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase. Plant Physiol 119: 521-530
 49. Rottmann WE, Peter GF, Oeller PW, Keller JA, Shen NF, Nagy BP, Taylor LP, Campbell AD, Theologis A (1991) 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. J Mol Biol 222: 937-961
 50. Capitani G, Hohenester E, Feng L, Storici P, Kirsch JF, Jansonius JN (1999) Structure of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in the biosynthesis of the plant hormone ethylene. J Mol Biol 294: 745-756
 51. Tarun AS, Lee JS, Theologis A (1998) Random mutagenesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase: A key enzyme in ethylene biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA 94: 9796-9801
 52. Huai Q, Xia YH, Chen YQ, Callahan B, Li N, Ke HM (2001) Crystal structures of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (*ACC*) synthase in complex with aminoethoxyvinylglycine and pyridoxal-5'-phosphate provide new insight into catalytic mechanisms. J Biol Chem 276: 38210-38216
 53. Li Y, Feng L, Kirsch JF (1997) Kinetic and spectroscopic investigations of wild-type and mutant forms of apple 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. Biochemistry 36: 15477-15488
 54. Tarun AS, Theologis A (1998) Complementation analysis of mutants of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase reveals the enzyme is a dimer with shared active sites. J Biol Chem 273: 12509-12514
 55. Yang SF, Dong JG (1993) Recent progress in research of ethylene biosynthesis. Bot Bull Acad Sini 34: 89-101
 56. Huang PL, Parks JE, Rottmann WE, Theologis A (1991) Two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in zucchini (*Cucurbita pepo*) are clustered and similar but differentially regulated. Proc Natl Acad Sci USA 88: 7021-7025
 57. Mehta PK, Hale TI, Christen P (1989) Evolutionary relationships among aminotransferases. Eur J Biochem 186: 249-253
 58. Mehta PK, Christen P (1994) Homology of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 8-amino-7-oxononanoate synthase, 2-amino-6-caprolactam racemase, 2,2-dialkylglycine decarboxylase, glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase and isopenicillin-N-epimerase with aminotransferases. Biochem Biophys Res Commun 198: 138-143
 59. McCarthy DL, Capitani G, Feng L, Gruetter MG, Kirsch JF (2001) Glutamate 47 in 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase is a major specificity determinant. Biochemistry 40: 12276-12284
 60. Tatsuki M, Mori H (2001) Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, *LE-ACS2*, at the C-terminal region. J Biol Chem 276: 28051-28057
 61. Liebermann M (1979) Biosynthesis and action of ethylene. Ann Rev Plant Physiol 30: 533-591
 62. Hamilton AJ, Lycett GW, Grierson D (1990) Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. Nature 346: 284-287

63. Prescott AG, John P (1996) Dioxygenases: molecular structure and role in plant metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 245-271
64. Zhou J, Rocklin AM, Lipscomb JD, Que L Jr, Solomon EI (2002) Spectroscopic studies of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: molecular mechanism and CO₂ activation in the biosynthesis of ethylene. *J Amer Chem Soc* 124: 4602-4609
65. Chung MC, Chou SJ, Kuang LY, Charng Y, Yang SF (2002) Subcellular localisation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase in apple fruit. *Plant Cell Physiol* 43: 549-554
66. Ramassamy S, Olmos E, Bouzayen M, Pech JC, Latche A (1998) 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase of apple fruit is periplasmic. *J Exp Bot* 49: 1909-1915
67. Barlow JN, Zhang Z, John P, Baldwin JE, Schofield CJ (1997) Inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase involves oxidative modifications. *Biochemistry* 36: 3563-3569
68. Mathooko FM, Tsunashima Y, Kubo Y, Inaba A (2004) Expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene in peach (*Prunus persica*) fruit in response to treatment with carbon dioxide and 1-methylcyclopropene: possible role of ethylene. *African J Biotech* 3: 497-502
69. Kasai Y, Hyodo H, Ikoma Y, Yano M (1998) Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase in broccoli florets and from *Escherichia coli* cells. *Bot Bull Acad Sin* 39: 225-230
70. Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441-445
71. Kępiński S, Leyser O (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 446-451
72. Kowalczyk S, Hadowska E, Piekarska A (2005) Roślinne układy ubikwitylacji i degradacji białek w proteasomach – kluczowe elementy hormonalnych szlaków sygnałowych. *Postępy Biochem* 51: 171-187
73. Li J, Dai X, Zhao Y (2006) A role for Auxin Response Factor 19 in auxin and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 140: 899-908
74. Chappell J, Hahlbrock K, Boller T (1984) Rapid induction of ethylene biosynthesis in cultured parsley cells by fungal elicitor and its relationship to the induction of phenylalanine ammonia lyase. *Planta* 161: 475-480
75. Felix G, Grosskopf DG, Regenass M, Basse CW, Boller T (1991) Elicitor-induced ethylene biosynthesis in tomato cells. Characterization and use as a bioassay for elicitor action. *Plant Physiol* 97: 19-25
76. Vogel JP, Woeste KE, Theologis A, Kieber JJ (1998) Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene *ACS5* of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4766-4771
77. Vogel JP, Schuerman P, Woeste K, Brandstatter I, Kieber JJ (1998) Isolation and characterization of *Arabidopsis* mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin. *Genetics* 149: 417-427
78. Guzman P, Ecker JR (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2: 513-523
79. Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427-441
80. Wang KLC, Yoshida H, Lurin C, Ecker JR (2004) Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein. *Nature* 428: 945-950
81. Pintard L, Willems A, Peter M (2004) Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J* 23: 1681-1687
82. Hejka T, Kowalczyk S (2006) Zależna od ubikwityny proteoliza białek w regulacji procesów wzrostu i rozwoju roślin. *Post Biol Kom* 33: 159-174
83. Dharmasiri N, Estelle M (2004) Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends Plant Sci* 9: 302-308
84. Bostick M, Lochhead SR, Honda A, Palmer S, Callis J (2004) Related to Ubiquitin 1 and 2 are redundant and essential and regulate vegetative growth, auxin signaling, and ethylene production in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2418-2432
85. Larsen PB, Cancel JD (2004) A recessive mutation in the RUB1-conjugating enzyme, RCE1, reveals a requirement for RUB modification for control of ethylene biosynthesis and proper induction of BASIC CHITINASE and PDF1.2 in *Arabidopsis*. *Plant J* 38: 626-638
86. De Paepe A, Vuylsteke M, Van Hummelen P, Zabeau M, Van Der Straeten D (2004) Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. *Plant J* 39: 537-559
87. Mathias N, Johnson S, Byers B, Goeb M (1999) The abundance of cell cycle regulatory protein Cdc4p is controlled by interactions between its F box and Skp1p. *Mol Cell Biol* 19: 1759-1767
88. Galan JM, Peter M (1999) Ubiquitin-dependent degradation of multiple F-box proteins by an autocatalytic mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9124-9129
89. Spanu P, Grosskopf DG, Felix G, Bolle T (1994) The apparent turnover of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato cells is regulated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Plant Physiol* 106: 529-535
90. Tuomainen J, Betz C, Kangasjarvi J, Ernst D, Yin ZH, Langebartels C, Sandermann H Jr (1997) Ozone induction of ethylene emission in tomato plants: regulation by differential accumulation of transcripts for the biosynthetic enzymes. *Plant J* 12: 1151-1162
91. Sebastia CH, Hardin SC, Clouse SD, Kieber JJ, Huber SC (2004) Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. *Arch Biochem Biophys* 428: 81-91
92. Liu Y, Zhang S (2004) Phosphorylation of ACC synthase by MPK6, a stress-responsive MAPK, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 3386-3399
93. Chae HS, Kieber JJ (2005) Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends Plant Sci* 10: 291-296

Regulation of ethylene biosynthesis in plants.

Kamil Frankowski[✉], Jacek Kęsy, Jan Kopcewicz

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

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

Key words: ethylene, ethylene biosynthesis, ACC synthase, ACC oxidase

ABSTRACT

Ethylene is one of the plant hormones that controls growth and development. There are many responses regulated via ethylene in response to exogenous stimuli. Research on ethylene biosynthesis and the signalling pathway enabled us to understand the mechanism of the regulation of these responses. Different temporal and spatial expression of genes encoding enzymes involved in ethylene biosynthesis is of great importance for the regulation of ethylene responses. Also, post-translational regulation of the enzymes seems to be a key regulatory mechanism for the control of their activity. Because of versatile regulation of its production, ethylene can control plant development at many levels.

Nowe spojrzenie na proces degradacji ziaren skrobi w chloroplastach *Arabidopsis thaliana* L.

Dorota Samojedny

Sławomir Orzechowski

Katedra Biochemii Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Katedra Biochemii Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159, Budynek 37, 02-776 Warszawa; e-mail: slawomir_orzechowski@sggw.pl, tel.: (022) 593 25 78, faks: (022) 593 25 63

Artykuł otrzymano 18 lipca 2006 r.

Artykuł zaakceptowano 14 września 2006 r.

Słowa kluczowe: amylaza, *Arabidopsis*, chloroplast, maltoza, rozkład skrobi

Stosowane skróty: AMY - α -amylaza, EC 3.2.1.1; BAM/BMY - β -amylaza, EC 3.2.1.2; DPE - D-enzym, enzym dysproporcjonowania EC 2.4.1.25; GWD - dikanaza: glukan, woda, EC 2.7.9.4; ISA - izoamylaza, EC 3.2.1.68; LDA - pullulanaza, EC 3.2.1.142; MEX1 - transporter maltozy; PHS - fosforylaza skrobiowa, EC 2.4.1.1; PWD - dikanaza: fosfoglukan, woda, EC 2.7.9.5

STRESZCZENIE

Skrobia asymilacyjna jest gromadzona w ciągu dnia i stanowi główne źródło energii dla metabolizmu komórki podczas nocy. Obserwowany cykliczny rozkład skrobi stał się modelem doświadczalnym chętnie wykorzystywanym przez uczonych, a wnioski wysunięte na podstawie wyników badań znajdują wykorzystanie w analizie mechanizmów degradacji zarówno skrobi tranzytorycznej, jak i zapasowej. Rozkład skrobi można podzielić na 2 etapy: zapoczątkowanie degradacji oraz hydroliza i fosforoliza ziaren skrobi do oligosacharydów i ich pochodnych. Kluczowe znaczenie w tym procesie przypisuje się β -amylazie, produkt jej aktywności β -maltoza transportowana jest do cytosolu i tam podlega dalszym przemianom. Degradacja skrobi podlega złożonej i nie do końca jeszcze wyjaśnionej regulacji. Najważniejszymi elementami wpływającymi na szybkość rozkładu skrobi są: cykl dobowy, fosforylacja skrobi oraz regulacja aktywności enzymów. Odbywa się ona poprzez zmianę potencjału redoks, zmianę pH i stężenia substratów jak również fosforylację białek zaangażowanych w rozkład skrobi przez specyficzne fosfatazy. Prezentowana praca ma na celu usystematyzowanie aktualnej wiedzy na temat degradacji skrobi w liściach *Arabidopsis thaliana* L. Wyniki badań ostatnich lat rzucają nowe światło na proces rozkładu skrobi, a także na jego kontrolę.

WPROWADZENIE

Skrobia jest najczęściej występującym materiałem zapasowym u roślin. Jest to polimer zbudowany z reszt sześciowęglowego, redukującego cukru α -D-glukozy. Cząsteczki glukozy połączone są ze sobą wiązaniami α -1,4 i α -1,6 glikozydowymi. Wiązania α -glikozydowe umożliwiają polimerom glukozy tworzenie struktury heliakalnej. Wskutek polimeryzacji glukozy w cząsteczce skrobi dochodzi do wytworzenia dwóch frakcji: amylozy i amylopektyny. Amyloza zbudowana jest głównie z nierozgałęzionych łańcuchów (struktura linearna) połączonych wiązaniami α -1,4 glikozydowymi, podczas gdy amylopektyny są rozgałęzione, a rozgałęzienia utworzone są przez wiązania α -1,6 glikozydowe. Skrobia występuje w komórce roślinnej w postaci nierozpuszczalnych ziaren wytwarzanych w plastydach. W zależności od rodzaju plastydu można wyróżnić skrobię tranzytoryczną lub zapasową, która powstaje odpowiednio w chloroplastach i amyloplastach. Podziału tego można dokonać także w oparciu o pewne cechy charakteryzujące ziarna skrobi, takie jak: wielkość, kształt czy budowa wewnętrzna. Ziarna skrobi asymilacyjnej *A. thaliana* składają się w około 90 % z łańcuchów amylopektyny [1], które tworzą półkryształiczną strukturę granul [2,3]. Podstawą struktury granul jest upakowanie polimerów amylopektyny w zorganizowane szeregi. Ziarna skrobi zbudowane są z promieniście ułożonych łańcuchów, których końce nieredukujące skierowane są do powierzchni. Polimery tworzą na przemian występujące blaszki półkryształiczne i amorficzne o szerokości 9 nm, które zwane są strefami półkryształicznymi. Strefy te są ułożone na przemian ze strefami amorficznymi. Tak powstałe obie strefy nazywa się pierścieniem przyrostu. Budowa ziaren skrobi jest dość dobrze udokumentowana [3-8].

Większość roślin syntetyzuje i degraduje skrobię w zależności od wielu czynników wewnętrznych i zewnętrznych, a także m.in. od stadium rozwoju. Ma to znaczenie w przypadku organów spichrzowych takich jak bulwy czy korzenie. Biosynteza skrobi była przedmiotem wielu badań, których wyniki prezentowano w licznych pracach zarówno oryginalnych, jak i przeglądowych [9-14]. Substratem w syntezie skrobi jest aktywna forma glukozy, w tym przypadku ADP-glukoza powstała w reakcji katalizowanej przez pirofosforylaza ADP-glukozy (ADPGPażę) z glukozo-1-fosforanu i ATP [9]. ADP-glukoza zostaje następnie przyłączona do nieredukującego końca powstającego łańcucha amylozy lub amylopektyny [11,15]. Tworzenie cząsteczek amylopektyny i strukturalne jej upakowanie jest ze sobą ściśle powiązane i podlega precyzyjnej regulacji. Proces ten wymaga uczestnictwa wielu enzymów, m.in. syntazy skrobi (SS) i enzymów rozgałęziających (SBE). Amyloza powstaje wewnątrz ziarna jako przenikająca go pojedyn-

cza helisa i wymaga zaangażowania głównie syntazy skrobi związanej z ziarnem (GBSS) [4,14].

DEGRADACJA SKROBI

Proces degradacji skrobi jest słabiej poznany niż jej biosynteza i wiele danych wskazuje na to, że nie jest taki sam we wszystkich organach danej rośliny, a także różni się pomiędzy tymi samymi organami u różnych gatunków roślin [16]. Degradacja skrobi w chloroplastach ma na celu uwolnienie zmagazynowanej w czasie dnia energii. Podczas nocy rozkład skrobi dostarcza substratów do syntezy cukrów zapewniając tym samym ciągły ich eksport do organów niefotosyntetyzujących, dostarcza także szkieletów węglowych i energii niezbędnej do procesów zachodzących wewnątrz komórki. Zaangażowane są w tym procesie enzymy z klasy hydrolaz i transferaz (Ryc. 1).

Dzięki poznaniu pełnej sekwencji genów *Arabidopsis* [17], naukowcy są w stanie łatwiej uzyskiwać rośliny zmodyfikowane genetycznie. Uzyskuje się mutanty z wyciszonymi genami kodującymi poszczególne enzymy związane z prze-

mianami skrobi. Badanie zmian metabolicznych poszczególnych mutantów oraz postęp w technikach analitycznych umożliwiły zweryfikowanie teoretycznych modeli degradacji skrobi w chloroplastach *A. thaliana*. Dziś wiadomo, że rozkład skrobi asymilacyjnej w *A. thaliana* odbiega od dobrze poznanego modelu rozkładu skrobi zapasowej w ziarniakach zbóż [18-20].

Proces rozkładu skrobi asymilacyjnej (Ryc. 2) można najogólniej podzielić na 2 etapy: zapoczątkowanie degradacji oraz rozkład skrobi do oligosacharydów i ich pochodnych. Uzyskane w wyniku rozkładu skrobi cukry są następnie włączane do szlaków metabolicznych zarówno w chloroplastach, jak i w cytoplazmie.

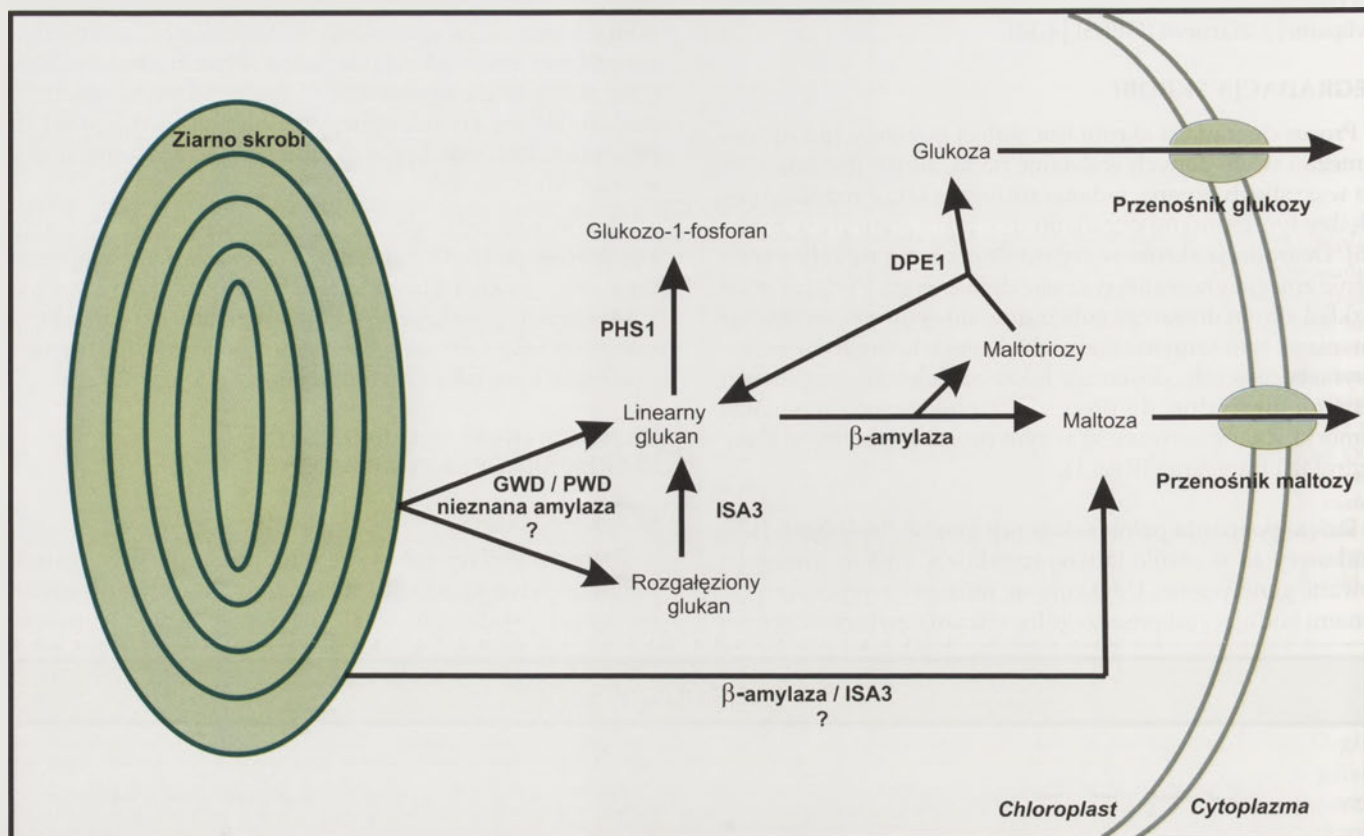
ZAPOCZĄTKOWANIE ROZKŁADU ZIAREN SKROBI ASYMLACYJNEJ

ROLA α -AMYLAZ

Ziarna skrobi wyizolowane z chloroplastów w warunkach natywnych nie są dobrym substratem dla enzymów amylolytycznych [8]. Enzym katalizujący pierwszy etap procesu



Rycina 1. Schemat przedstawiający działanie enzymów biorących udział w degradacji skrobi w chloroplastach. ISA3- izoamylaza 3; PHS1- chloroplastowa izoforma fosforylasy skrobiowej; DPE1- chloroplastowa izoforma enzymu dysproporcjonowania.



Rycina 2. Przepuszczalny przebieg procesu degradacji skrobi w chloroplastach *A. thaliana*. Opis w tekście. GWD – dikinaza glukozy, woda; PWD – dikinaza fosfogluksanu, woda; ISA3 – izoamylaza 3; PHS1 – chloroplastowa izoforma fosforylasy skrobiowej; DPE1 – chloroplastowa izoforma enzymu dysproporcjonowania.

degradacji skrobi musi posiadać zdolność do uwalniania łańcuchów glukozy znajdujących się na powierzchni ziarna. Wykazano, że w warunkach *in vitro* kilka różnych enzymów jest zdolnych do katalizowania takiej reakcji [21,22], ale jedyne prawdziwie podobnymi enzymami zdolnymi do tego typu reakcji *in vivo* w roślinach są endoamylazy- α -amylazy (Ryc. 1). W bielmie kielkujących ziarniaków zbóż α -amylazy hydrolizują wiązania α -1,4 glikozydowe wewnątrz polimerów znajdujących się na powierzchni ziaren lub w kanałach wewnątrz granul, uwalnając łańcuchy poliglukanów, które służą jako substraty w dalszych etapach degradacji. W genomie *A. thaliana* są kodowane trzy białka o sekwencji aminokwasowej homologicznej do innych α -amylaz, a jedna z nich AMY3 posiada lokalizację chloroplastową. Sądzone, że to właśnie AMY3 rozpoczyna degradację powierzchni ziaren podczas nocy. Jednak na podstawie wyników badań nad mutantami okazało się, że żadna z wytypowanych na podstawie sekwencji izoform α -amylazy nie jest wymagana do rozkładu skrobi. Wykorzystując insercję T-DNA blokowano aktywność poszczególnych genów kodujących α -amylazy, a uzyskane mutanty wykazywały prawidłowe tempo degradacji skrobi w liściach w ciągu nocy. Podobne wyniki uzyskano podczas wygaszenia aktywności jednocześnie wszystkich trzech genów [23]. Przedstawione wyniki badań wskazują, że rozpoczęcie degradacji powierzchni ziaren skrobi *A. thaliana* nie odbywa się przy udziale α -amylazy, lub też genom *Arabidopsis* zawiera nową endoamylazę z niezidentyfikowaną do tej pory sekwencją aminokwasową (Ryc. 2). Rola AMY3 pozostaje jednak niewyjaśniona. Zdaje się, że enzym ten mógłby być zaangażowany w mobiliza-

cję skrobi, ale rezultaty dotychczasowych eksperymentów pokazują, że jego brak może być rekompensowany przez aktywność innych enzymów.

ZNACZENIE ENZYMÓW FOSFORYLUJĄCYCH SKROBIĘ

Podczas, gdy mechanizm uwalniania rozpuszczalnych łańcuchów glukanów z ziaren skrobi nie jest wyjaśniony, wiadomo, że w ten proces zaangażowany jest stosunkowo niedawno odkryty enzym, zwany dikinazą: glukozy, woda (GWD). W genomie rzodkiewnika zidentyfikowano 3 geny odpowiedzialne za kodowanie homologów GWD, 2 posiadają sekwencję kierującą je do chloroplastów: GWD1 i PWD (GWD3) [24-26]. Identyfikacja białka GWD pochodzącego z ziemniaka wykazała, że katalizuje on odwracalną reakcję przenoszenia reszty β -fosforanowej z ATP na 6 węgiel w reszcie glukozy wewnątrz amylopektyny [27]. Reszta γ -fosforanowa przenoszona jest na cząsteczkę wody, co ma na celu wytworzenie stechiometrycznej ilości wolnego fosforanu i AMP [28]. Fosforylacja łańcuchów amylopektyny przy udziale GWD ma miejsce zarówno podczas syntezy, jak i degradacji skrobi *in vivo* [28]. Analiza substratów dla GWD wykazała, że enzym ten preferuje cząsteczki amylopektyny bardziej niż cząsteczki amylozy w stosunku 30% dla amylozy i 70% dla amylopektyny. Aktywny enzym wymaga więc obecności wiązań α -1,6 glikozydowych, a jego aktywność zwiększa się wraz ze wzrostem polimeryzacji cząsteczek glukozy [26]. Pomimo dość niskiej częstotliwości, z jaką reszty glukozy są fosforylowane, w liściach *Arabidopsis* jest to około 0,1%, co oznacza, że 1 na 1000 reszt posiada

grupę fosforanową [29], to obecność aktywnej GWD wydaje się być niezbędna do prawidłowego przebiegu procesu.

Białko GWD składa się z dwóch domen: jednej o aktywności dikinazy i drugiej, N-terminalnej domeny o nie w pełni poznanej funkcji. Sugerowana funkcja N-terminalnej domeny GWD, to udział w promowaniu aktywności innych enzymów degradujących skrobię poprzez interakcję z łańcuchami poliglukanu na powierzchni ziaren lub z samymi enzymami [28], jak również decydowanie o specyficzności substratowej GWD [30].

Homolog GWD – PWD, dikinaza: fosfoglukan, woda też zaangażowana jest w metabolizm skrobi [24,25]. Mutacje wyciszające gen PWD powodują, że rośliny nie są w stanie prawidłowo degradować skrobi. U nich jednak w przeciwieństwie do mutantów *sex1* (*starch excess 1*, czyli o zwiększonej zawartości skrobi), u których gen GWD jest nieaktywny, nie ulega redukcji ilość fosforu związanego ze skrobią. W cząsteczce PWD C-końcowa domena wykazuje zbliżoną budowę do C-końcowej domeny GWD i innych dikinaz, natomiast N-końcowa domena PWD znacznie się różni od N-końcowej domeny GWD. Analiza aktywności PWD uzyskanej w wyniku nadekspresji w komórkach *E. coli* dowiodła, że PWD może tylko fosforylować łańcuchy amylopektyny, które zawierają już grupy fosforanowe i w odróżnieniu od GWD nie stwierdzono aktywności transferazowej bez uprzedniego ufosforylowania łańcuchów α -glukanów. Transfer ortofosforanu katalizowany przez ten enzym odbywa się na węgiel w pozycji C3 w cząsteczce glukozy w łańcuchu amylopektyny [27]. Wskazuje to na odmienną specyficzność substratową obu enzymów (GWD1 i PWD), co mogłoby być skutkiem różnej budowy domen N-końcowych odpowiedzialnych za wiązanie łańcucha poliglukanu i decydujących prawdopodobnie o specyficzności substratowej enzymów [30].

HYDROLIZA I FOSFOROLIZA SKROBI DO OLIGOSACHARYDÓW I ICH POCHODNYCH

Pierwszy etap degradacji skrobi prowadzi do uwolnienia linearnego glukanu rozpuszczonego w stromie chloroplastu (Ryc. 2). Enzymy obecne w chloroplastach mogą potencjalnie katalizować dwie alternatywne ścieżki jego dalszej degradacji. Pierwsza angażuje enzym chloroplastową fosforylazę skrobiową – PHS1 [31,32], która uwalnia glukozo-1-fosforany (Ryc. 1). Druga ścieżka wymaga obecności β -amylazy, która katalizuje reakcję odłączania od nieredukującego końca linearnego glukanu cząsteczek maltozy (Ryc. 1). Cztery z dziewięciu β -amylaz kodowanych w genomie *Arabidopsis* posiadają peptyd sygnałowy kierujący je do chloroplastów. Wyniki ostatnich badań wskazują na to, że degradacja linearnego glukanu zachodzi zwykle przy udziale β -amylazy, a nie na drodze fosforolizy glukanu. Tezę tą oparto na następujących spostrzeżeniach: po pierwsze, mutanty z wyciszonym genem fosforylazy glukanu wykazują normalny poziom degradacji skrobi [2]. Po drugie, mutanty z nieaktywnym genem β -amylazy mają zredukowaną zdolność degradacji skrobi [21]. Po trzecie, rośliny nie posiadające enzymów biorących udział w metabolizmie maltozy gromadzą duże jej ilości proporcjonalne do produkcji maltozy ze

skrobi, a ponadto wykazują zredukowane tempo degradacji skrobi [33].

ENZYMY USUWAJĄCE ROZGAŁĘZIENIA

Genom *Arabidopsis* koduje cztery białka mogące brać udział w hydrolizie wiązań α -1,6 glikozydowych w łańcuchu glukanu (Ryc. 1). Jedno z nich należy do klasy dekstrynaz granicznych (LDA – pullulanaza), a pozostałe trzy są izoamylazami (ISA). LDA jest wysoce aktywna w bielmie kielkujących ziarniaków zbóż i wiele wskazuje na to, że jest ona zaangażowana w hydrolizę wiązań α -1,6 glikozydowych w tych organach. Natomiast rośliny *Arabidopsis* z nieaktywnym genem dla tego enzymu wykazują normalny poziom degradacji skrobi w liściach podczas nocy [34]. Pozwala to sądzić, że jedna lub więcej izoamylaz, a nie pullulanaza mogą być zaangażowane w ten proces.

Udział ISA zarówno w procesie biosyntezy, jak i degradacji przysparza trudności w zidentyfikowaniu, która izoforma odpowiada za hydrolizę wiązań α -1,6 glikozydowych podczas rozkładu skrobi. W liściach *A. thaliana*, bielmie zbóż, bulwach ziemniaka, redukcja lub eliminacja aktywności wszystkich trzech izoform izoamylaz prowadzi do zaburzeń w syntezie skrobi. Wzrasta liczba ziaren, a co najmniej część łańcuchów skrobi jest zastępowana przez rozpuszczalny glukan, zwany fitoglikogenem [35]. Sposób działania izoamylazy na ziarna skrobi i mechanizm powstawania łańcuchów fitoglikogenu w normalnych warunkach nie są jeszcze dobrze poznane. U ziemniaka produkty genów StISA1 i StISA2 tworzą wspólnie heterotetramery, które są odpowiedzialne za wymiarną działalność izoamylazy w bulwach [36,37]. Podobne współdziałanie różnych form izoamylaz mogłoby mieć miejsce także w liściach *Arabidopsis*.

Chociaż zarówno ISA1, jak i ISA2 są niezbędne podczas normalnej syntezy skrobi w liściach *Arabidopsis*, to przeprowadzone badania wskazują na to, że nie są one zaangażowane w hydrolizę wiązań α -1,6 glikozydowych w czasie nocnej degradacji skrobi. U mutantów *isa1* i *isa2* zarówno skrobia, jak i fitoglikogen są całkowicie degradowane w ciągu nocy [34,35]. Biorąc pod uwagę, że fitoglikogen ma wyższy stosunek wiązań glikozydowych α -1,6 do α -1,4 w porównaniu do amylopektyny, proces hydrolizy wiązań α -1,6 w fitoglikogenie musi przebiegać szybciej niż w liściach typu dzikiego [38].

Wyniki badań podważające zaangażowanie LDA, ISA1 czy ISA2 w degradację skrobi asymilacyjnej mogłyby sugerować, że znaczącą rolę w procesie rozpadu skrobi odgrywa ISA3. Wstępna analiza mutantów z wyciszonym genem ISA3 pokazuje, że zawartość skrobi jest u nich wyższa niż w liściach typu dzikiego, co potwierdza udział ISA3 w hydrolizie nocą wiązań α -1,6 glikozydowych. Możliwe jest, że istnieje inny, niezidentyfikowany do tej pory enzym, który bierze udział w tym etapie rozkładu skrobi, jednak do tej pory nie ma żadnych dowodów potwierdzających to przypuszczenie.

Ostatnio przeprowadzone badania, a głównie poprawienie czułości detekcji β -maltozy, pozwalają przypuszczać, że

β -amylaza może działać na powierzchni granul uwalniając cząsteczki maltozy [34]. Po tym odkryciu zaczęto się zastanawiać, czy może ona współdziałać z enzymem usuwającym rozgałęzienia. Wtedy degradacja powierzchni ziaren skrobi przez β -amylazę mogłaby postępować bez ograniczeń wynikających z występowania wiązań α -1,6 glikozydowych. Analizowano do tego celu mutanty *isa3*, *lda* i podwójne mutanty *isa3/lda* z wyciszonymi genami zarówno isoamylazy 3, jak i pullulanazy. Potwierdzono zaangażowanie ISA3 w degradację powierzchni ziaren skrobi. Mutanty miały zredukowane tempo degradacji skrobi. Zaproponowano nowy, bardzo uproszczony model jej degradacji polegający na tym, że na powierzchnię ziaren miałyby działać wspólnie β -amylaza i ISA3 [34]. Produktem ich działania byłyby maltoza i liniowe glukany (Ryc. 2). Zaobserwowano także wzrost ilości α -amylazy w mutantach *isa3* i podwójnych mutantach *isa3/lda*, co może sugerować próbe rekompensacji braku ISA3 przez działanie α -amylazy, jednak wyjaśnienie tego zjawiska wymaga wnikliwszych badań [34].

DEGRADACJA SKROBI JAKO ODPOWIEDŹ NA STRESY ŚRODOWISKOWE

Wyniki badań prowadzonych nad rolą fosforylasy skrobiowej wskazują, że wyciszenie aktywności genu kodującego ten enzym nie powoduje znaczących zmian w akumulacji skrobi w ciągu dnia i jej degradacji w nocy. Zaobserwowano jednak, że mutanty z nieaktywnym genem plastydowej fosforylasy skrobiowej (*phs1*) są wrażliwsze na stres wodny i zasolenia. Wskazuje to na to, że fosforylaza skrobiowa, powodując fosforolityczny rozkład skrobi i dostarczając substratów do metabolizmu chloroplastu, mogłaby odgrywać ważną rolę w tolerancji stresów abiotycznych [2]. Wyniki ostatnio prowadzonych badań wskazują również na znaczną rolę fosforolitycznego rozkładu skrobi w warunkach sprzyjających fotooddychaniu, jako uzupełnienie normalnie przebiegającej hydrolizy skrobi z udziałem β -amylazy [39]. Mutanty *phs1* wystawione na działanie stresu prezentowały zmiany fenotypowe liści oraz akumulację skrobi. Sugerowano, że niezdolność mutantów do degradacji skrobi przez fosforylazę skrobiową w określonych warunkach środowiska skutkuje tworzeniem się uszkodzeń na blaszkach liściowych i w konsekwencji śmiercią komórek. Zaobserwowano także, że zmiany te pojawiają się tylko na dojrzałych liściach, a liście dojrzewające już podczas działania czynników stresowych nie wykazują już tak daleko posuniętych modyfikacji, co wskazuje na to, że chloroplastowa fosforylaza skrobi bierze udział w szybkiej odpowiedzi na nagłe środowiskowe zmiany, a także w procesie aklimatyzacji do zmieniających się warunków środowiskowych [2].

β -amylaza poza kluczową rolę w degradacji skrobi podczas nocy bierze także prawdopodobnie udział w odpowiedzi na szok temperaturowy. Wykazano, że w przypadku stresu spowodowanego niską temperaturą indukowana jest ekspresja jednego z izoenzymów β -amylazy – *BMX8*, a w przypadku stresu spowodowanego wysoką temperaturą wzrasta poziom białka kodowanego przez *BMX7*. Indukcja ekspresji β -amylazy związana jest prawdopodobnie z rolą, jaką pełnią jej produkty hydrolizy, czyli cząsteczki maltozy. Przymuszanym zadaniem zakumulowanej w stromie chloroplastu podczas stresu temperaturowego maltozy jest

ochrona białek stromy i błon tylakoidów biorących udział w fotosyntetycznym łańcuchu transportu elektronów [40].

MALTOZA JAKO GŁÓWNY PRODUKT DEGRADACJI SKROBI OPUSZCZAJĄCY CHLOROPLASTY

Maltoza uwalniana przez β -amylazę i transportowana z chloroplastów podczas nocy występuje w formie anomeru β . Ponadto, obserwowany jest gradient stężenia β -maltozy pomiędzy chloroplastem i cytosolem [41]. Ostatnio pojawiły się dowody na to, że maltoza produkowana podczas degradacji skrobi nie jest metabolizowana wewnątrz chloroplastów, ale jest transportowana do cytosolu przez specyficzny przenośnik maltozy (*MEX1*) [33]. Wyciszenie genu kodującego ten przenośnik powoduje, że wzrost roślin jest silnie ograniczony, a liście wykazują zmniejszoną zawartość chlorofilu. Mutacje w genie *MEX1* prowadzą do akumulacji maltozy w liściach *Arabidopsis*, a jej poziom wzrasta 40-krotnie w porównaniu z liśćmi typu dzikiego. Ilość maltozy spada podczas dnia, a wzrasta w ciągu nocy, co jest spowodowane niemożnością eksportu maltozy, produkowanej podczas β -amylolitycznego rozpadu skrobi w nocy. U mutantów *mex1* obserwuje się podwyższony poziom skrobi asymilacyjnej, a tempo jej degradacji, jak i syntezy jest ograniczone [33].

β -amylolityczna degradacja glukanów powoduje powstawanie niewielkiej ilości maltotrioz ze względu na możliwość działania β -amylazy tylko na łańcuchy składające się z więcej niż trzech reszt glukozy [42]. Jedynym znanym enzymem kodowanym w genomie *Arabidopsis* zdolnym do metabolizmu maltotrioz jest enzym dysproporcjonowania, α -1,4 glukanotransferaza (D-enzym, *DPE1*). Enzym ten może wykorzystać dwie cząsteczki maltotrioz w celu wytworzenia maltopentozy i uwolnienia jednej cząsteczki glukozy (Ryc. 1).

Dowód potwierdzający zaangażowanie tego enzymu w metabolizm maltotrioz podczas degradacji skrobi otrzymano na podstawie wyników badań nad mutantami z wyciszonym genem *DPE1*. Wykazują one zredukowany poziom degradacji skrobi i zwiększoną akumulację maltotrioz w nocy w ilościach dużo wyższych niż w liściach typu dzikiego [43]. Sugeruje się, że w liściach typu dzikiego maltopentoza, która powstaje w wyniku działania *DPE1* podlega hydrolizie przez β -amylazę. Z kolei glukoza, drugi produkt tej reakcji, eksportowana jest do cytosolu przez specyficzny przenośnik glukozy zlokalizowany w wewnętrznej błonie chloroplastu [44].

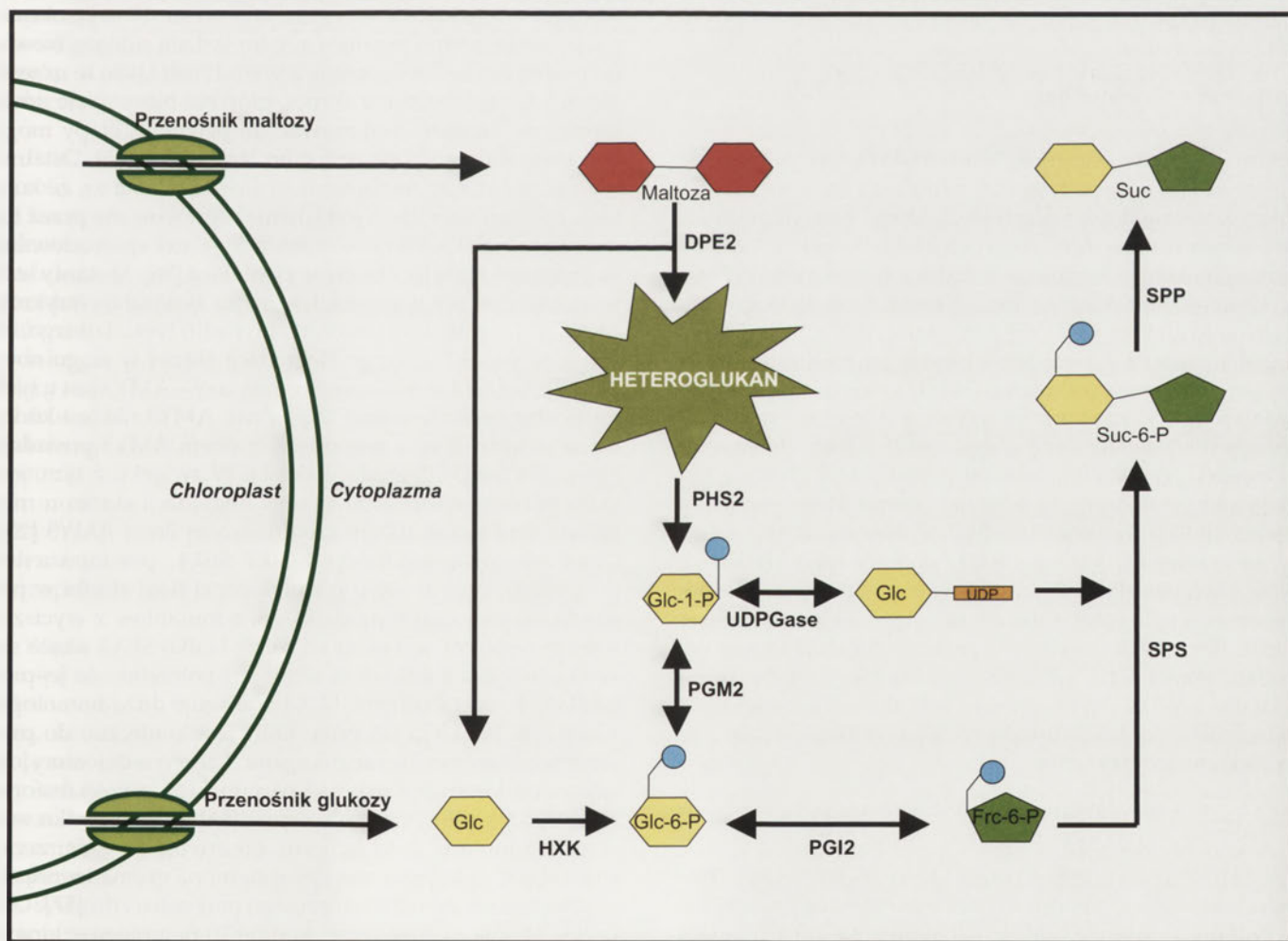
W przypadku braku białka *MEX1*, czyli transportera głównego produktu degradacji – maltozy, jej eksport z chloroplastu jest niemożliwy, ale eksport glukozy powstałej w wyniku działalności *DPE1* nadal się odbywa. U podwójnych mutantów *dpe1/mex1* ani maltoza, ani glukoza nie może opuścić chloroplastu ze względu na zablokowanie eksportu i braku metabolizmu maltotrioz. Oba produkty działalności β -amylazy są więc akumulowane w chloroplastach. Mutanty wykazują silnie zredukowane tempo wzrostu i obniżoną zawartość chlorofilu w liściach, co może być spowodowane między innymi brakiem syntezy sacharozy podczas nocy czy też akumulacją maltozy, która może wpływać pośrednio na funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego poprzez

wywoływanie stresu chemicznego lub osmotycznego wewnątrz chloroplastu. Alternatywnie, maltoza może działać jako molekula sygnałowa, która może tłumić ekspresję podstawowych genów biorących udział w fotosyntetycznej asymilacji węgla. Jeśli to jest prawdziwa rola maltozy, to dzienne zmiany jej stężenia mogą być ważne w procesie sygnalizacyjnym, powodującym asymilację dwutlenku węgla w ciągu dnia, a degradację skrobi podczas nocy [45].

METABOLIZM MALTOZY W CYTOSOLU

Zdawało by się, że maltoza w cytosolu podlega hydrolizie przez α -glukozydazę, a następnie jest przemieniana w glukozo-6-fosforan przez heksokinazę. Wszystko jednak wskazuje na to, że nie jest to przemiana odbywająca się w liściach *Arabidopsis* (Ryc. 3). Maltoza jest metabolizowana w reakcji transglukozytacji, a dowody na to pochodzą z badań nad mutantami z wyciszonym genem transglukozydazy (DPE2). D-enzym jest strukturalnie podobny do amylomalazy [46], która jest zaangażowana w metabolizm maltozy u bakterii. Liście mutantów ze zniesioną aktywnością DPE2 nie mają możliwości, jak liście typu dzikiego przenoszenia jednej reszty glukozy z maltozy na rozgałęziony, cytosolowy heterogluksan i uwalnianie drugiej [47]. Mutanty te mają fenotyp zbliżony do mutantów *mex1*. Poziom maltozy jest u

nich kilkakrotnie wyższy w porównaniu do roślin typu dzikiego, obserwowane jest również zahamowanie degradacji skrobi [47,48]. Pozwala to przypuszczać, że udział DPE2 w metabolizmie maltozy jest główną ścieżką działającą na eksportowane do cytosolu cząsteczki maltozy. Prawdopodobne jest, że cząsteczka glukozy uwolniona z maltozy przez DPE2 do cytoplazmy jest przemieniana do heksozofosforanu przez heksokinazę. Losy drugiej cząsteczki glukozy zostały niedawno wyjaśnione [49]. Jest ona przenoszona na cytosolowy, złożony z różnych monosacharydów węglowodan (w jego skład wchodzi głównie: arabinoza, galaktoza i glukoza, połączone wiązaniami glikozydowymi). Cytosolowy heterogluksan jest substratem dla wielu enzymów, które uwalniają z niego cząsteczki monosacharydów, disacharydów, bądź ich pochodne. Dobrze udokumentowana jest rola cytosolowej izoformy fosforylasy skrobiowej (PHS2) w rozkładzie tego polisacharydu, która posiada podobnie jak DPE2 zdolność wykorzystywania heterogluksanu jako substratu do dwukierunkowej reakcji przenoszenia reszt glukozy [49]. Powstałe w wyniku degradacji skrobi cząsteczki glukozy-1-fosforanu wchodzi w cykl przemian komórkowych. Przemiany mogą prowadzić do wytworzenia cząsteczek UDP-glukozy, a następnie zsyntetyzowania z nich sacharozy, która jest dostarczana do tkanek i organów



Rycina 3. Schemat przedstawiający przemiany maltozy w cytoplazmie. Opis w tekście. Glc – glukoza; Glc-6-P – glukozo-6 fosforan; Glc-1-P – glukozo-1-fosforan; UDP – urydynodifosforan; Frc-6-P- fruktozo-6 fosforan; Suc- sacharoza; HXK – heksokinaza; PGI2 – cytosolowa izoforma izomerazy fosfoglukozy; PGM2 – cytosolowa izoforma fosfoglukomutazy; UDPGase – pirofosforylaza UDP-glukozy; SPS – syntaza sacharozy-6-fosforanu; SPP – fosfataza sacharozy-6-fosforanu; DPE2 – cytosolowa izoforma enzymu dysproporcjonowania; PHS2 – cytosolowa izoforma fosforylasy skrobiowej. Suc-6-P – sacharozy-6- fosforan.

niefotosyntetyzujących. Z sacharozy, która jak niedawno stwierdzono, również na drodze endocytozy może dostać się do komórek heterotroficznycych [50] w szeregu reakcji enzymatycznych mogą powstawać ziarna skrobi zapasowej [51]. Produkty rozkładu skrobi mogą także, wchodząc w szlak innych przemian, dostarczyć pirogronianu będącego głównym substratem oddychania wewnątrzkomórkowego, zachodzącego w mitochondrium [52].

REGULACJA DEGRADACJI SKROBI ASYMILACYJNEJ W LIŚCIACH *A. THALIANA*

CYKL DOBOWY

W standardowych warunkach, kiedy skrobia jest syntetyzowana w ciągu dnia nie zachodzi jej degradacja, bądź zachodzi w niewielkim stopniu. Po rozpoczęciu nocy poziom degradacji skrobi wzrasta w ciągu dwóch pierwszych godzin i następnie pozostaje na relatywnie stałym poziomie do jej zakończenia [52]. W efekcie nocnego rozkładu skrobi asymilacyjnej prawie cały jej zapas zostaje zużyty. A zatem tempo degradacji skrobi jest uzależnione od ilości zakułowanej w ciągu dnia skrobi i ma na celu nieprzerwane dostarczanie, na relatywnie stałym poziomie, fosforanów heksoz potrzebnych komórce. Wyjątek stanowi fotoperiod dłuższy niż 16 godzin, kiedy to zmiany długości oświetlenia skutkują zmianami w tempie biosyntezy i degradacji skrobi [53].

FOSFORYLACJA SKROBI

Mutacje, które eliminują białko GWD lub jej domenę odpowiedzialną za aktywność, prowadzą do wysokiej redukcji zarówno ilości fosforu związanego z amylopektyną, jak i samego tempa degradacji skrobi. Liście mutantów *sex1* akumulują skrobię w ilościach siedmiokrotnie przewyższających zawartość skrobi w liściach roślin typu dzikiego [29]. Tłumacząc znaczenie GWD i jej zaangażowanie w proces degradacji skrobi, wskazuje się na rolę grup fosforanowych lub samych cząsteczek białka GWD, które to mogą wpływać na aktywność innych, nie poznanych jeszcze enzymów, atakujących powierzchnię ziaren skrobi. Grupy fosforanowe mogą wpływać na upakowanie polimerów glukozy wewnątrz amylopektyny, zwiększając powierzchnię pomiędzy łańcuchami i zmniejszając ich hydrofobowość. Przypuszcza się, że zarówno GWD, jak i PWD poprzez współdziałanie, tworząc ufosforylowaną amylopektynę w pozycjach odpowiednio C6 i C3 reszt glukozy, udostępniają powierzchnię granul dla innych enzymów i przez to regulują tempo degradacji skrobi [24,27]. Poznanie dokładnego mechanizmu działania GWD i PWD wymaga jednak wielu wnikliwych badań nad budową i funkcją tych enzymów, a także nad produktami ich działania.

REGULACJA EKSPRESJI I AKTYWNOŚCI ENZYMÓW UCZESTNICZĄCYCH W ROZKŁADZIE SKROBI

Sposoby, a raczej kompleksowe mechanizmy, dzięki którym roślina włącza i kontroluje ścieżkę degradacji skrobi nie są do końca poznane, ale dzięki postępującym badaniom regulacja tego procesu jest stopniowo wyjaśniana. Odkrycie, że transkrypty kilku enzymów potencjalnie biorących udział w degradacji skrobi pojawiają się w ścisłych dzien-

nych cyklach i pod okołodobową kontrolą, pozwala sądzić, że kontrola procesu odbywa się na poziomie transkrypcyjnym. Transkrypty niektórych genów, kodujących enzymy biorące udział w degradacji skrobi, zaczynają zwiększać swój poziom już przed końcem dnia. Poziom tych transkryptów spada powoli podczas nocy, utrzymuje niski poziom w pierwszych godzinach światła, a osiąga szczyt między 4 a 8 godziną dnia [38,54]. Obserwowany jest jednak brak korelacji pomiędzy poziomem tych transkryptów, a ilością kodowanych przez nie enzymów zaangażowanych w rozkład skrobi. Dotychczas nie ma żadnego dowodu na to, że ilość jakiegokolwiek enzymu obecnego w liściach *Arabidopsis* i niezbędnego podczas degradacji skrobi zmienia się w cyklu dziennym, i że jest to skorelowane z jego rolą w kontroli tego procesu. Dla kilku kluczowych enzymów ze ścisłymi dziennymi zmianami transkryptów, bardzo mało jest zmian w ilości białka enzymu, co sugeruje, że kontrola degradacji skrobi odbywa się w głównej mierze na poziomie potranslacyjnej modyfikacji aktywności enzymów lub przy udziale białek regulatorowych [54].

Fosforylacja białek. Stosunkowo nowo poznany mechanizm, biorącym udział w kontroli aktywności enzymów uczestniczących w rozkładzie skrobi, jest odwracalna fosforylacja białek. W ostatnim czasie, badania dostarczają coraz więcej dowodów wskazujących na faktyczne zaangażowanie tego mechanizmu w regulację procesu. W wyizolowanych z endospermu pszenicy amyloplastach zidentyfikowano pewną liczbę fosfoprotein, a wśród nich także te uczestniczące w metabolizmie skrobi, głównie biosyntezie amylopektyny, co może wskazywać, że pewne jej etapy mogą być kontrolowane poprzez fosforylację białek [55]. Ostatnie wyniki badań nad mutantami *sex4* wskazują na to, że kontrola procesu degradacji jest również sprawowana przez fosforylację białek. Odkryto, że mutacje w *sex4* spowodowane są przez gen kodujący białkową fosfatazę [56]. Mutanty *sex4* w standardowych warunkach wzrostu akumulują trzykrotnie więcej skrobi w porównaniu do roślin typu dzikiego, ze względu na niskie tempo degradacji skrobi w ciągu nocy [32, 52]. Ilość chloroplastowej α -amyłazy – AMY3 jest u tych mutantów zredukowana [52]. Jednak AMY3 nie jest kodowana w locus *sex4*, a mutanty z brakiem AMY3 posiadają normalne tempo degradacji skrobi. W związku z tym, jest mało prawdopodobne, że spadek degradacji skrobi u mutantów *sex4* jest skutkiem zredukowanej ilości AMY3 [23]. Chloroplastowa lokalizacja białka SEX4, powinowactwo do glukanu oraz fenotyp o zwiększonej ilości skrobi w porównaniu do roślin typu dzikiego, u mutantów z wyciszonym genem *sex4* wskazują na to, że białko SEX4 wiąże się ze skrobią w warunkach *in vivo* i jest potrzebne do jej prawidłowego metabolizmu. SEX4 wykazuje dużą homologię z ssaczym białkiem laforyną, które jest konieczne do prawidłowego metabolizmu glikogenu. Laforyna defosforyluje i aktywuje kinazę 3 syntazy glikogenu, która z kolei fosforyluje i inaktywuje syntazę glikogenu [56]. W przypadku wystąpienia mutacji genu laforyny obserwuje się zaburzenia chorobowe, polegające między innymi na gromadzeniu się w cytoplazmie nierozpuszczalnego polisacharydu [57]. Odkryto, że genom *Arabidopsis* koduje 10 homologów kinazy 3 syntazy glikogenu, z czego przynajmniej jedna jest zlokalizowana w chloroplastach i to ona mogłaby być celem dla białka SEX4, ale potwierdzenie tej hipotezy wymaga jeszcze

wielu badań [56]. Laforyna posiada na N-końcu unikalną dla enzymów wyizolowanych ze zwierząt domenę wiążącą węglowodany (CBM ang. *carbohydrate-binding module*). Ostatnio stwierdzono, że enzym ten oprócz glikogenu może wykorzystywać jako substytut w reakcji defosforylacji inne polisacharydy, np.: amylopektynę [57]. W związku z powyższym SEX4 mogłoby kontrolować degradację skrobi na dwa sposoby. Pierwsza możliwość polegać może na usuwaniu reszt ortofosforanowych z amylopektyny (powstałych na skutek działalności GWD i PWD). Efektem defosforylacji amylopektyny jest zmiana jej stopnia upakowania i hydrofilności, co ma znaczenie dla możliwości przyłączenia się i aktywności enzymów amylolytycznych. Z kolei innym sposobem kontroli degradacji skrobi przez białko SEX4, mogłoby być wpływanie poprzez defosforylację na aktywność enzymu lub enzymów bezpośrednio lub pośrednio związanych z tym procesem. Taki model regulacji jest dobrze poznany w przypadku metabolizmu glikogenu, natomiast dla przemian skrobi w roślinach teoria ta wymaga weryfikacji i dalszych badań w przyszłości.

Podobną rolę jak białko SEX4 przypisuje się roślinnej podwójnie specyficznej fosfatazie DSP, która wiąże się z ziarnami skrobi, a zlokalizowana została w chloroplastach. Poziom transkryptu DSP silnie skorelowany jest z poziomem transkryptów enzymów związanych z degradacją skrobi. Sugeruje się, że białko to może regulować tempo degradacji skrobi poprzez odwracalną fosforylację. Także to białko, ze względu na domenę wiążącą węglowodany, wykazuje podobieństwo do ludzkiego białka laforyny [58].

Potencjał redoks. Potencjał redoks zdaje się pełnić znaczącą rolę w regulacji rozkładu skrobi. Można by podejrzewać, że kontrola procesu degradacji odbywa się także poprzez utlenianie lub redukcję kluczowych dla procesu enzymów. Redukcja grup sulfhydrylowych odbywa się z udziałem tioredoksyny, która uprzednio zostaje zredukowana przez elektrony wybite z fotosystemu I, a przeniesione przez ferrodoksynę. Tioredoksyna jest ważnym regulatorem zawierającym sąsiadujące ze sobą reszty cysteiny, których grupy hydrosulfidowe mogą ulegać odwracalnie utlenieniu. Zredukowana forma tioredoksyny dominuje w świetle i może stymulować aktywność wielu enzymów w wyniku redukcji ich mostków dwusiarczkowych. Sugeruje się, że niektóre enzymy degradujące skrobię mogą być aktywowane przez utlenianie. W dzień redukcja grup sulfhydrylowych mogłaby zapobiegać degradacji syntetyzowanej skrobi [16].

Wiele enzymów współdziałających z tioredoksyną zostało niedawno odkrytych, włączając β -amylazę i pullulanazę z liści szpinaku [13]. Prowadzone badania nad GWD sugerują, że aktywność tego enzymu jest także kontrolowana poprzez zmianę potencjału redoks [16,59]. Utlenienie GWD wywołuje inaktywację enzymu i formowanie się mostków dwusiarczkowych, które mogą być następnie zredukowane przez tioredoksynę, co przywraca aktywność białka [59]. Najnowsze wyniki badań prezentują β -amylazę (BMY7/TR-BAMY) obecną w plastydach *Arabidopsis*, której aktywność jest ściśle regulowana przez potencjał redoks [60]. Indukcję ekspresji i pojawienie się aktywnego enzymu obserwuje się w warunkach stresu abiotycznego, co sugeruje, że TR-BAMY mogłoby brać udział w regulowanej potencja-

lem redoks ścieżce degradacji skrobi zachodzącej podczas oświetlenia [60].

Wpływ pH i stężenia maltooligosacharydów. Stężenie jonów wodorowych może odgrywać rolę w regulacji procesu poprzez oddziaływanie na aktywność enzymów degradujących skrobię, np. poprzez ich przekształcenia konformacyjne. Odczyn pH podlega zmianom w chloroplastach podczas przejścia ze światła do ciemności. Stroma chloroplastów zmienia pH ze słabo alkalicznego do obojętnego, co może promować aktywność niektórych enzymów degradujących, ale mało prawdopodobne jest, aby zmiany pH mogły bezpośrednio inicjować degradację, czy też kontrolować przebieg tego procesu [16].

Poziom maltooligosacharydów hamuje tempo degradacji skrobi poprzez współzawodniczącą inhibicję enzymów wykorzystujących skrobię jako substrat [42,61] lub poprzez występowanie w bliskości ziaren uniemożliwiać przez to ich degradację. Pozwala to na dostosowanie tempa degradacji skrobi do aktualnego zapotrzebowania rośliny na jej produkty.

PODSUMOWANIE

W pełnym zrozumieniu procesu degradacji ziaren skrobi prowadzącego od skrobi do fosforanów heksoz pozostaje jeszcze wiele znaków zapytania. W pierwszej kolejności należy wziąć pod uwagę fakt, że najlepiej poznany do tej pory model rozkładu skrobi w chloroplastach *A. thaliana* może różnić się od procesów zachodzących w liściach, czy też w organach gromadzących skrobię zapasową innych gatunków roślin. Różnice te mogą wynikać głównie z różnego składu izoenzymatycznego zaangażowanych w rozkład skrobi enzymów oraz z charakteru organu, w którym ten proces się odbywa. Głównym enzymem odpowiedzialnym za proces rozkładu skrobi w chloroplastach *A. thaliana* jest β -amylaza, a produkt jej działania, β -maltoza, transportowana jest do cytoplazmy gdzie ulega dalszym przemianom. Słabo poznany jest, jak do tej pory, sposób regulacji procesu mobilizacji skrobi asymilacyjnej. W ostatnim czasie zespoły badaczy z całego świata donoszą o odkryciach, które wskazują na ogromną złożoność i precyzję kontrolujących ten proces mechanizmów. Wiele wskazuje na to, że kluczową rolę w procesie inicjacji degradacji skrobi odgrywają enzymy fosforylujące skrobię, czy to przez zmianę właściwości struktury ziaren skrobi, czy też przez stworzenie możliwości do powstania wielobiałkowego kompleksu, który rozpoczyna hydrolizę ziarna skrobi. Szybkość samego procesu degradacji wydaje się być z kolei regulowana poprzez modyfikacje potranslacyjne poszczególnych enzymów amylolytycznych. Odbywa się to głównie poprzez fosforylację białek oraz dzięki zmianie potencjału redoks, zachodzących w cyklu dobowym lub pod wpływem abiotycznych stresów.

PIŚMIENNICTWO

1. Lloyd JR, Kossmann J, Ritte G (2005) Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends Plant Sci* 10: 130-137
2. Zeeman SC, Smith SM, Smith AM (2004) The breakdown of starch in leaves. *New Phytol* 163: 247-261

3. Zeeman SC, Tiessen A, Pikling E, Kato KL, Donald AM, Smith AM (2002) Starch synthesis in *Arabidopsis*. Granule synthesis, composition, and structure. *Plant Physiol* 129: 516-529
4. Smith AM, Denyer K, Martin C (1997) The synthesis of the starch granule. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 67-87
5. Ball SG, van de Wal MHB, Visser RGF (1998) Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends Plant Sci* 12: 462-467
6. Myers AM, Morel MK, James MG, Ball SG (2000) Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol* 122: 989-997
7. Vermeylen R, Goderis B, Reynaers H, Delcour JA (2004) Amylopectin molecular structure reflected in macromolecular organization of granular starch. *Biomacromolecules* 5: 1775-1786
8. Tester RF, Karkalas J, Qi X (2004) Starch structure and digestibility Enzyme-Structure relationship. *World's Poultry Science Journal* 60: 186-195
9. Martin C, Smith AM (1995) Starch biosynthesis. *Plant Cell* 7: 971-985
10. James MG, Denyer K, Myers AM (2003) Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr Opin Plant Biol* 6: 215-222
11. Smith AM (2001) The biosynthesis of starch granule. *Biomacromolecules* 2: 335-341
12. Zeeman SC, Smith SM, Smith AM (2002) The priming of amylose synthesis in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* 128: 1069-1076
13. Tetlow IJ, Morell MK, Emes MJ (2004) Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot* 55: 2131-2145
14. Dobrzyńska UE, Orzechowski S (2004) Enzymy biorące udział w biosyntezie i rozkładzie skrobi w roślinach. *Post Nauk Rol* 5: 57-70
15. Smith AM (1999) Making starch. *Curr Opin Plant Biol* 2: 223-229
16. Smith AM, Zeeman SC, Smith SM (2005) Starch degradation. *Annu Rev Plant Biol* 56: 73-98
17. The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-814
18. Fincher GB (1989) Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 305-346
19. Ritchie S, Swanson SJ, Gilroy S (2000) Physiology of the aleurone layer and starchy endosperm during grain development and early seedling growth: new insights from cell and molecular biology. *Seed Science Research* 10: 193-212
20. Lovegrove A, Hooley R (2000) Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Sci* 5: 102-110
21. Scheidig A, Frölich A, Schulze S, Lloyd JR, Kossmann J (2002) Down-regulation of a chloroplast-targeted beta-amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J* 30: 581-591
22. Sun Z, Duke SH, Henson CA (1995) The role of pea chloroplast [alpha]-glucosidase in transitory starch degradation. *Plant Physiol* 108: 211-217
23. Yu TS, Zeeman SC, Thorneycroft D, Fulton DC, Dunstan H, Lue WL, Hegemann B, Tung SY, Umemoto T, Chapple A, Tsai DL, Wang SM, Smith AM, Chen J, Smith SM (2005) alpha-amylase is not required for breakdown of transitory starch in *Arabidopsis* leaves. *J Biol Chem* 280: 9773-9779
24. Kötting O, Pusch K, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M, Ritte G (2005) Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. The phosphoglucan, water dikinase. *Plant Physiol* 137: 242-252
25. Baunsgaard L, Lütken H, Mikkelsen R, Glaring MA, Pham TT, Blennow A (2005) A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylates pre-phosphorylated alpha-glucans and is involved in starch degradation in *Arabidopsis*. *Plant J* 41: 595-605
26. Mikkelsen R, Baunsgaard L, Blennow A (2004) Functional characterization of alpha-glucan, water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. *Biochem J* 377: 525-532
27. Ritte G, Heydenreich M, Mahlow S, Haebel S, Kötting O, Steup M (2006) Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases. *FEBS Lett* 580: 4872-4876
28. Ritte G, Lorberth R, Steup M (2000) Reversible binding of the starch-related R1 protein to the surface of transitory starch granule. *Plant J* 21: 387-391
29. Yu TS, Kofler H, Häusler RE, Hille D, Flügge UJ, Zeeman SC, Smith AM, Kossmann J, Lloyd J, Ritte G, Steup M, Lue WL, Chen J, Weber A (2001) The *Arabidopsis* *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell* 13: 1907-1918
30. Mikkelsen R, Suszkiewicz K, Blennow A (2006) A novel type carbohydrate-binding module identified in alpha-glucan, water dikinase is specific for regulated plastidial starch metabolism. *Biochem* 45: 4674-4682
31. Lin TP, Caspar T, Somerville C, Preiss J (1988) A starch deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* with low ADP glucose pyrophosphorylase activity lacks one of the two subunits of the enzyme. *Plant Physiol* 88: 1175-1181
32. Zeeman SC, Northrop F, Smith AM, Rees T (1998) A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastic starch hydrolyzing enzyme. *Plant J* 15: 357-365
33. Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* 303: 87-89
34. Delatte T, Umhang M, Trevisan M, Eicke S, Thorneycroft D, Smith SM, Zeeman SC (2006) Evidence for distinct mechanisms of starch granule breakdown in plants. *J Biol Chem* 281: 12050-12059
35. Zeeman SC, Umemoto T, Lue WL, Au-Yeung P, Martin C, Smith AM, Chen J (1998) A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytylglycogen. *Plant Cell* 10: 1699-1712
36. Bustos R, Fahy B, Hylton CM, Seale R, Nebane NM, Edwards A, Martin C, Smith AM (2004) Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *PNAS* 101: 2215-2220
37. Hussain H, Mant A, Seale R, Zeeman SC, Hinchliffe E, Edwards A, Hylton C, Bornemann S, Smith AM, Martin C, Bustos R (2003) Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. *Plant Cell* 15: 133-149
38. Lu Y, Gehan JP, Sharkey TD (2005) Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiol* 138: 2280-2291
39. Weise SE, Schrader SM, Kleinbeck KR, Sharkey TD (2006) Carbon balance and circadian regulation of hydrolytic and phospholytic breakdown of transitory starch. *Plant Physiol* 141: 879-886
40. Kaplan F, Guy Ch (2004) beta-amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiol* 135: 1674-1684
41. Weise SE, Kim KS, Stewart SP, Sharkey TD (2005) beta-maltose is the metabolically active anomer of maltose during transitory starch degradation. *Plant Physiol* 137: 756-761
42. Lizotte PA, Henson CA, Duke SH (1990) Purification and characterization of pea epicotyl beta-amylase. *Plant Physiol* 92: 615-621
43. Critchley JH, Zeeman SC, Takaha T, Smith AM, Smith SM (2001) A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutant in *Arabidopsis*. *Plant J* 26: 89-100
44. Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Gröner F, Hebbeker U, Flügge U (2000) Identification, purification and molecular cloning of a putative plastidial glucose translocator. *Plant Cell* 12: 787-801
45. Pomocniczy material Science Online: Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* 303: 87-89
46. Boos W, Shuman H (1998) Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 204-229

47. Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Messerli G, Chen J, Zeeman SC, Smith SM, Smith AM (2004) A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *Plant J* 37: 853-863
48. Lu J, Sharkey TD (2004) The role of amylopectin in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta* 218: 466-473
49. Fettke J, Chia T, Eckermann N, Smith A, Steup M (2006) A transglucosidase necessary for starch degradation and maltose metabolism in leaves at night acts on cytosolic heteroglycans (SHG). *Plant J* 46: 668-684
50. Baroja-Fernandez E, Etxeberria E, Muñoz FJ, Morán-Zorzano MT, Alonso-Casajús N, Gonzalez P, Pozueta-Romero J (2006) An important pool of sucrose linked to starch biosynthesis is taken up by endocytosis in heterotrophic cells. *Plant Cell Physiol* 47: 447-456
51. Muñoz FJ, Morán Zorzano MT, Alonso-Casajús N, Baroja-Fernández E, Etxeberria E, Pozueta-Romero J (2006) New enzymes, new pathways and an alternative view on starch biosynthesis in both photosynthetic and heterotrophic tissues of plants. *Biocatalysis and Biotransformation* 24: 63-76
52. Zeeman SC, Rees T (1999) Changes in carbohydrate metabolism and assimilate export in starch-excess mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell Env* 22: 1445-1453
53. Gibon Y, Bälsing OE, Palacios-Rojas N, Pankovic D, Hendriks JHM, Fisahn J, Höhne M, Günther M, Stitt M (2004) Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *Plant J* 39: 847-862
54. Smith SM, Fulton DC, Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Dunstan H, Hylton C, Zeeman SC, Smith AM (2004) Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* 136: 2687-2699
55. Tetlow IJ, Wait R, Lu Z, Akkasaeng R, Bowsher CG, Esposito S, Kosar-Hashemi B, Morell MK, Emes MJ (2004b) Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *Plant Cell* 16: 694-708
56. Niittylä T, Comparot-Moss S, Lue WL, Messerli G, Trevisan M, Seymour MDJ, Gatehouse JA, Villadsen D, Smith SM, Chen J, Zeeman SC, Smith AM (2006) Similar protein phosphatases control starch metabolism in plant and glycogen metabolism in mammals. *J Biol Chem* 281: 11815-11818
57. Worby CA, Gentry MS, Dixon JE (2006) Laforin: a dual specificity phosphatase that dephosphorylates complex carbohydrates. *J Biol Chem* 281: 30412-30418
58. Kerk D, Conley TR, Rodriguez FA, Tran HT, Nimick M, Muench D, Moorhead GB (2006) A chloroplast-localized dual-specificity protein phosphatase in *Arabidopsis* contains a phylogenetically dispersed and ancient carbohydrate-binding domain, which binds the polysaccharide starch. *Plant J* 46: 400-413
59. Mikkelsen R, Mutenda KE, Mant A, Schürmann P, Blennow A (2005) α -glucan, water dikinase (GWD): A plastidic enzyme with redox-regulated and coordinated catalytic activity and binding affinity. *PNAS* 102: 1785-1790
60. Sparla F, Costa A, Lo Schiavo F, Pupillo P, Trost P (2006) Redox regulation of a novel plastid-targeted β -amylase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 141: 840-850
61. Witt W, Sauter JJ (1996) Purification and properties of the starch granule-degrading α -amylase from potato tubers. *J Exp Bot* 47: 1789-1795

New look at starch degradation in *Arabidopsis thaliana* L. chloroplasts

Dorota Samojedny, Sławomir Orzechowski✉

Department of Biochemistry, Faculty of Agriculture and Biology, Warsaw Agriculture University, 159 Nowoursynowska St., Building 37, 02-776 Warsaw, Poland

✉e-mail: slawomir_orzechowski@sggw.pl

Key words: amylase, *Arabidopsis*, chloroplast, maltose, starch degradation

ABSTRACT

Transitory starch is accumulated during the day and is the main source of energy for the cell metabolism during the night. The observed periodical starch degradation has become a model often used by scientist in their experiments. Starch granule degradation could be divided into 2 periods: initiation of degradation and digestion of amylopectin and amylose into maltooligosaccharide and their derivative. Key meaning is attributed in this process to β -amylase, product of its activity β -maltose is transported to the cytosol and there it subjects farthest conversions. It has been demonstrated that a number of enzymes take part in the starch degradation process. However, the way of regulating their activity is still not fully explained. There is most important elements effecting rate of starch decomposition: day cycle, starch phosphorylation and regulation of enzyme activity. It proceeds through redox potential, pH changes and phosphorylation of protein involved in starch degradation due specific phosphatases. The purpose of the current work is to systematize the knowledge of the *Arabidopsis thaliana* L. leaf starch degradation. The results of the recent research cast a new light on the starch degradation process as well as on its control.

Paweł Mateusz Mordaka

Grażyna Dąbrowska

Zakład Genetyki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Toruń

Zakład Genetyki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; e-mail: browsk@uni.torun.pl, tel.: (056) 611 45 76, faks: (056) 611 47 72

Artykuł otrzymano 18 września 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 27 listopada 2006 r.

Słowa kluczowe: transport wody, kanał błonowy, akwaporyny, stres abiotyczny

Wykaz skrótów: ABA – kwas abscysynowy; ADH (ang. *antidiuretic hormone*) – wazopresyna, hormon antydiuretyczny; AQP (ang. *aquaporin*) – akwaporyna; cAMP – cykliczny adenozylo-5'-trifosforan; CDPK (ang. *calcium-dependent protein kinase*) – kinaza zależna od jonów wapnia; MIP (ang. *membrane integral protein*) – integralne białko błonowe; NIP (ang. *nodulin26-like intrinsic proteins*) – akwaporyna homologiczna do białka Nodulin26; PIP (ang. *plasma membrane intrinsic protein*) – akwaporyna błony komórkowej; PK (ang. *protein kinases*) – kinazy białek; PM (ang. *plasma membrane*) – błona plazmatyczna; PPase (ang. *protein phosphatases*) – fosfatazy białek; NPA (ang. *asparagine-proline-alanine*) – zachowany w ewolucji motyw reszt aminokwasowych: asparagina-prolina-alanina; ROS (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu; RT-PCR (ang. *reverse transcription – polymerase chain reaction*) – reakcja amplifikacji na matrycy cDNA; SIP (ang. *small basic intrinsic protein*) – akwaporyna o niskiej homologii do AQP1; TIP (ang. *tonoplast intrinsic protein*) – akwaporyna tonoplastu; TM (ang. *tonoplast membrane*) – błona wakuoli komórek roślinnych, tonoplast

STRESZCZENIE

Integralne białka błonowe (MIP) są zróżnicowaną klasą białek błonowych, które pośredniczą w przepływie wody (akwaporyny), małych cząsteczkowych rozтворów, takich jak glicerol oraz gazów poprzez błony komórkowe. W ostatnich latach badania dostarczyły istotnych informacji pozwalających na pełniejsze scharakteryzowanie u roślin tej dużej klasy białek, kanałów wodnych. Białka MIP zidentyfikowano w wielu organizmach zarówno jedno- jak i wielokomórkowych. Akwaporyny pełnią istotną rolę w rozwoju roślin i ich adaptacji do zmieniającego się środowiska zewnętrznego. Wpływ na ekspresję genów kodujących akwaporyny, wywierają takie czynniki jak: hormony, susza, wysokie stężenia soli i światło. Aktywność kanałów wodnych jest regulowana poprzez fosforylację i protony wewnątrzkomórkowe. Przypuszcza się, że istnieją też inne mechanizmy regulacji tych białek poprzez działanie gradientu ciśnienia osmotycznego i hydrostatycznego, kontrolę reaktywnych form tlenu czy tworzenie heterotetramerów.

WPROWADZENIE

Życie powstało w środowisku wodnym – woda jest absolutnie niezbędna do utrzymania procesów metabolicznych w organizmach żywych. Zawartość wody w tkankach może sięgać 95% – protoplazma zawiera od 50% (w organelach bogatych w lipidy) do 90% wody. Soczyste owoce, miękkie liście i korzenie zawierają aż 70 – 95% wody. Natomiast w pozornie suchych nasionach i zarodnikach woda stanowi od 10 do 15%.

Wyróżnia się trzy możliwe drogi przepływu wody w tkankach roślinnych: apoplastyczną, symplastyczną oraz transkomórkową [1]. Przenikanie wody przez półprzepuszczalne błony biologiczne – możliwe jest dzięki obecności błonowych białek, akwaporyn [2]. Obecność akwaporyn w błonie plazmatycznej zwiększa od 10 do 100 razy przepuszczalność cząsteczek wody. Pojedynczy kanał transportuje ok. 2 – 3 miliardy cząsteczek wody w ciągu sekundy. Badania z wykorzystaniem związków rtęci (inhibitorów akwaporyn) pozwalają na przypuszczenia, że akwaporyny zaangażowane są w pobieranie do 80% wody wchłanianej przez korzeń [3,4].

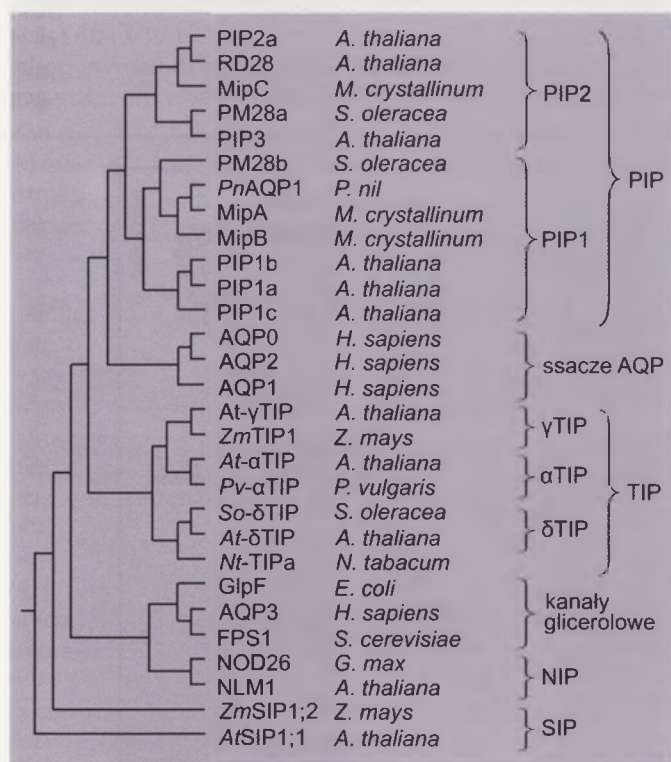
Akwaporyny należą do bardzo starej filogenetycznie rodziny kanałów białkowych MIP (ang. *Membrane Integral Proteins*) [5]. Kanały wodne zidentyfikowano dotychczas prawie we wszystkich typach żywych organizmów: u ssaków, kręgowców, bezkręgowców, roślin oraz bakterii i archebakterii [3]. Specyficzne akwaporyny mogą transportować także obok wody inne małych cząsteczkowe związki: glicerol (np. *glicerol facilitator* GlpF *E. coli*, AQP3, AQP7 człowieka czy AtNIP6;1 rzodkiewnika) [6-8], mocznik (AQP1 człowieka) [9], amoniak i jony amonowe (AtTIP2;1 i AtTIP2;3 *Arabidopsis thaliana*) [10], kwas borowy (AtNIP5;1 *A. thaliana*) [11], nadtlenek wodoru (akwaporyna *Chara corallina*) [12] czy małych cząsteczkowe alkohole [13]. Zdolność do przepuszczania określonych związków zależna jest od budowy kanału w miejscu filtru wielkości. Zastąpienie argininy 195 i histydyny 180 aminokwasami hydrofobowymi (alaniną i waliną) w AQP1 umożliwiło przepływ mocznika przez kanał i jednocześnie nie wpływało na przepuszczalność cząsteczek wody. Zamiana fenyloalaniny 56 i histydyny 180 przez reszty alaniny zwiększa średnicę kanału i umożliwia przepływ glicerolu [9]. Akwaporyny uczestniczą także w transporcie CO₂ [14].

Rośliny posiadają wiele sekwencji kodujących kanały wodne, co wskazuje na ich dużą różnorodność. Projekt sekwencjonowania genomu *Arabidopsis thaliana* zaowocował identyfikacją 38 genów kodujących akwaporyny. Trzy z nich sklasyfikowano jako pseudogeny (AtTIP2, AtNIP2.1 i AtNIP3.1) [15], w przypadku 23 zaobserwowano ekspresję specyficzną dla tkanki i warunków środowiskowych [16]. U ryżu zidentyfikowano 33 białka z rodziny akwaporyn [17], a kukurydza posiada co najmniej 31 genów kodujących kanały wodne, z czego kilka

ulega ekspresji na wysokim poziomie [18]. Dla porównania w genomie człowieka zidentyfikowano dotychczas jedynie 13 białek rodziny MIP. Zlokalizowano je w różnego typu nabłonkach, śródbłonkach i wielu innych tkankach. Pełnią one znaczącą rolę w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych: m.in. w formowaniu moczu, sekrecji płynów, tworzeniu i usuwaniu obrzęku mózgu, regulacji ciśnienia, nawilżaniu skóry, metabolizmie tłuszczu, angiogenezie guzów nowotworowych i migracji komórek [19].

Podział kanałów wodnych zależnie od rodzaju transportowanych związków wymaga szczegółowych analiz, a sam mechanizm transportu wielofunkcyjnego nie jest do końca poznany. Dlatego akwaporyny roślinne podzielone zostały na podstawie subkomórkowej lokalizacji kanałów i homologii na cztery rodziny (Ryc. 1) [20]:

- akwaporyny błony komórkowej PIPs (ang. *Plasma membrane Intrinsic Proteins*) tworzą dwie podrodziny: PIP1 (z wydłużonym N-końcem białka) oraz PIP2 (z wydłużonym C-końcem);
- akwaporyny tonoplastu TIPs (ang. *Tonoplast Intrinsic Proteins*) podzielono na trzy podrodziny: α TIPs, β TIPs, γ TIPs, z wyjątkiem *NtTIPa*, która tworzy oddzielną grupę;
- NLMs (ang. *NOD26-like MIPs*) lub NIPs (ang. *Nodulin26-like Intrinsic Proteins*) - homologii białka NOD26 (akwaporyny błony peribakteroidu *Glicyne max* biorącej udział w wymianie metabolitów pomiędzy gospodarzem a symbiontem), o niestalonej sublokalizacji w innych roślinach, przewodzące cząsteczki wody oraz niepolarne związki małowcząsteczkowe [4];



Rycina 1. Analiza filogenetyczna białek rodziny MIP metodą prostej parsymonii przy użyciu programu pakietu PHILIP. Białka GlpF *E. coli* oraz FPS1 drożdży transportują glicerol, białko AQP3 ssaków transportuje zarówno glicerol jak i wodę. Białka podrodziny NLM (NOD26 *G. max* i jego homologii) oraz *Nt-TIPa* transportują także małe niepolarne cząsteczki. Pozostałe akwaporyny transportują wyłącznie cząsteczki wody, a ich klasyfikacja zależy od miejsca rozmieszczenia w komórce i homologii sekwencji.

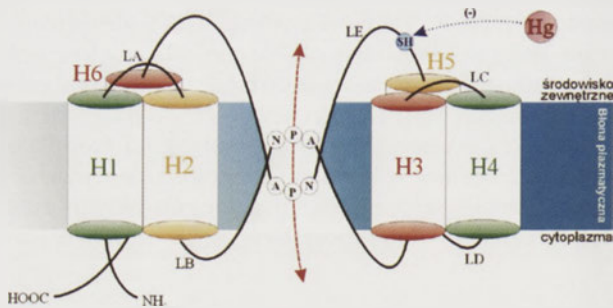
- SIPs (ang. *Small basic Intrinsic Proteins*) - białka o niskiej homologii z AQP1 człowieka (około 15%), zlokalizowane w całej roślinie (podrodzina SIP1) lub tylko w korzeniach (podrodzina SIP2), alanina motywu NPA pętli B podstawiona jest treoniną (A#SIP1;1), cysteiną (A#SIP1;2) bądź leucyną (A#SIP2) [21], występują w błonach siateczki śródplazmatycznej [22], różnice w budowie aminokwasów tworzących wnętrze kanału w porównaniu z innymi akwaporynami mogą świadczyć o innej specyficzności substratowej kanału [23].

NOWE USTALENIA DOTYCZĄCE STRUKTURY KANAŁÓW WODNYCH

Struktura pierwszorzędowa białka AQP1 składa się z sześciu domen (H1 - H6). Zarówno koniec N jak i C białka zlokalizowane są wewnątrz-komórkowo. Trzy pętle oznaczone jako LA, LC i LE położone pomiędzy helisami znajdują się na zewnątrz komórki, dwie inne LB i LD zlokalizowane są wewnątrz-komórkowo. Porównanie sekwencji AQP1 z innymi białkami rodziny MIP wykazało istnienie 22 zachowanych w ewolucji reszt aminokwasowych, między innymi motywu asparagina-prolina-alanina (NPA) znajdującego się w pętli pomiędzy drugą a trzecią helisą transbłonową w każdym powtórzeniu tandemowym. Powtórzenia tandemowe mają przeciwną orientację w błonie biologicznej. Motyw NPA w pierwszej części białka znajduje się w pętli cytoplazmatycznej, w drugiej - w pętli zewnątrzkomórkowej, co daje symetrię kanału względem powierzchni błony [5].

Miejsce odpowiedzialne za hamowanie transportu wody w obecności jonów rtęci zlokalizowano w pozycji reszty aminokwasowej Cys-189, poprzedzającej motyw NPA w obrębie pętli E. Mutanty białka AQP1 z aminokwasami flankującymi motyw NPA zamienionymi na aminokwasy o większej masie traciły zdolność przewodzenia wody [24]. Gdy resztę alaniny 73 - aminokwas w pętli B korespondującej z resztą cysteiny 189 w pętli E - zastąpiono resztą cysteiny, a resztę cysteiny 189 resztą seryny, zmienione białko straciło swą aktywność w obecności jonów Hg^{2+} . Podobne zjawisko obserwowano przy zamianie reszt aminokwasowych otaczających motyw NPA pętli B na reszty aminokwasowe o większej masie cząsteczkowej (Ryc. 2). Badania te doprowadziły do powstania modelu *klepsydry* struktury kanału wodnego opisanego w pracy przeglądowej z 2004 roku [3].

Z przepływem wody w roztworze wiąże się jednoczesny przepływ protonów połączonych z cząsteczkami wody wiązaniami wodorowymi. Z badań wynikało, że kanał wodny transportuje cząsteczki wody nie przepuszczając jednak jonów hydroniowych H_3O^+ . Struktura *klepsydry* akwaporyny składa się z dwóch stożkowatych przedsionków, cytoplazmatycznego i zewnątrzkomórkowego, połączonych wąskim kanałem o długości 20 Å. Miejsce odpychania elektrostatycznego cząsteczek obdarzonych ładunkiem oraz filtr wielkości znajdują się około 8 Å powyżej środka kanału. W tym miejscu średnica kanału wynosi około 2,8 Å, tyle samo, co średnica *van der Waalsa* cząsteczki wody. Większość reszt aminokwasowych wyściełających ściany kanału pochodzi z domen transbłonowych i ma charakter hydrofobowy - w miejscu filtru wielkości znajduje się fenyloalanina 56 dome-



Rycina 2. Model przestrzennej budowy białka AQP1. Helisy transbłonowe zaznaczono jako H1 - H6, pętle jako LA - LE. Pętle LB i LE zawierają zachowane w ewolucji motywy NPA. Miejsce hamowania jonami Hg^{2+} (Cys-189) oznaczono jako SH.

ny H3. Obok znajdują się dwie zachowane w ewolucji reszty aminokwasowe: arginina 195 i histydyna 180, obdarzone w pH neutralnym dodatnim ładunkiem elektrostatycznym. Reszty aminokwasowe Arg-195 i His-180 tworzą filtr wielkości i dodatkowo odpychają protony i inne kationy, uniemożliwiając im przepływ przez kanał wodny (Ryc. 3) [25].

Dodatkowo powyżej miejsca filtra wielkości, obecny jest szereg reszt aminokwasowych zawierających atomy tlenu w grupach karbonylowych (Gly-188, Cys-189, Gly-190 i Ile-191), które są korzystnie energetycznymi substytutami do wiązania protonów. Reszta cysteiny 198 ma zorientowaną do wnętrza poru grupę sulfhydrylową - wiązanie jonu rtęci fizycznie blokuje kanał i uniemożliwia transport cząsteczek wody przez błonę. W miejscu nałożonych na siebie motywów NPA następuje reorientacja cząsteczki wody. Poniżej znajduje się drugi szereg tlenów karbonylowych pochodzących z reszt Leu-75, His-74, Ala-73 i Gly-72 [26]. Orientacja cząsteczki wody zmienia się w trakcie jej przepływu przez kanał. Gdy cząsteczka wody wpływa do przewodu z przestrzeni zewnątrzkomórkowej tlen skierowany jest w dół. W miejscu motywów NPA następuje jej obrót i dalszy przepływ tlenem skierowany ku górze (Ryc. 3) [26].

WPŁYW CZYNNIKÓW ABIOTYCZNYCH NA EKSPRESJĘ GENÓW AKWAPORYN

Kontrola warunków wodnych ma decydujące znaczenie dla utrzymania homeostazy organizmu. Kanały wodne wykazują złożony system regulacji ekspresji na poziomie transkrypcji. Badania z wykorzystaniem technik biologii molekularnej (hybrydyzacje *in situ*, typu northern, RT-PCR, doświadczenia immunocytochemiczne) wykazały różnice w ekspresji genów akwaporyn. Niektóre białka rodziny MIP ulegają ekspresji konstytutywnej i stanowią około 20% wszystkich białek błonowych komórki. Inne podlegają regulacji czynnikami zewnętrznymi (odpowiedź na stres, zmianę warunków świetlnych) lub ulegają ekspresji zależnej od poziomu fitohormonów [1].

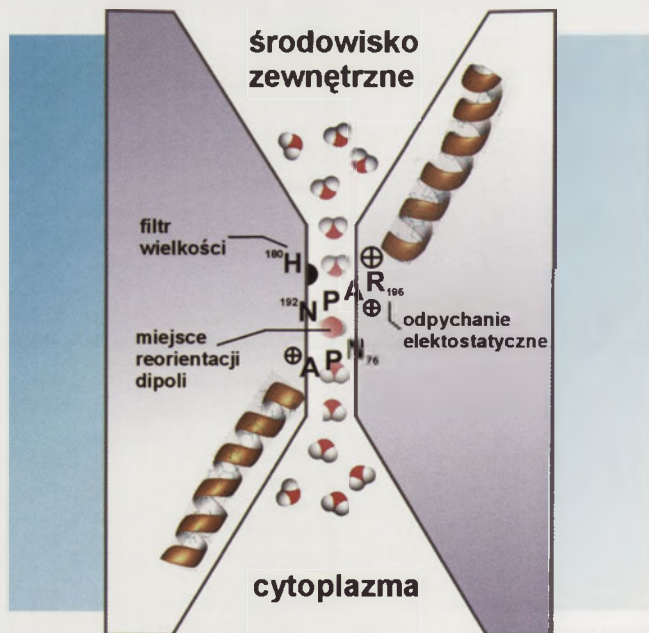
Najwyższą ekspresję genów akwaporyn obserwuje się w tkankach o dużym przepływie strumienia wody lub metabolitów oraz w tkankach przewodzących. Ponadto akwaporyny tonoplastowe występują licznie w tkankach merystematycznych (w miejscach biogenezy wakuolarnej) [27]. Obecność akwaporyn została powiązana z licznymi procesami

fizjologicznymi: m. in. z otwieraniem i zamykaniem aparatów szparkowych [28], wzrostem wydłużeniowym komórek [29] czy ruchami organów [30,31].

Z 38 akwaporyn *A. thaliana* większość ulega ekspresji albo w korzeniach albo w kwiatach. Brak jest kanałów wodnych specyficznych wyłącznie dla liści. Geny należące do podrodziny PIP i TIP są aktywne transkrypcyjnie, w przeciwieństwie do białek NIP, których ekspresja jest znacznie niższa. W odpowiedzi rośliny na stres abiotyczny, np. suszę, ekspresja wielu genów akwaporyn jest obniżana, choć są też takie geny, których ekspresja wzrasta (*AtPIP1;4* i *AtPIP2;5*) lub nie ulega zmianie (*AtPIP2;6* i *AtSIP1;1*) [32]. Poziom ekspresji *AtPIP2;5* wzrastał po umieszczeniu rośliny w niskiej temperaturze, podczas gdy ekspresja pozostałych genów podrodziny PIP ulegała zahamowaniu. W warunkach stresu solnego nie zaobserwowano istotnych zmian w ekspresji genów PIP [33].

Stymulację ekspresji genów akwaporyn suszą zaobserwowano u tytoniu (geny *NeMip2* i *NeMip3*) [34] oraz *Cratogeomys plantagineum* (*CpPIP2;2* i *CpPIP2;6*) [35]. Z kolei ekspresja genów *MipA* i *MipC* *M. crystallinum* w warunkach suszy gwałtownie spada by powrócić następnie do stanu pierwotnego [36].

Stwierdzono różnice we wpływie fitohormonu - ABA - na ekspresję poszczególnych akwaporyn *A. thaliana*, co sugeruje, że część z nich jest regulowana zależnie od kwasu abscysynowego, a pozostałe na drodze niezależnej od tego związku. Wiadomo, że ABA wpływa na ekspresję niektórych genów PIP w korzeniach i liściach rzodkiewnika [33] i kukurydzy [37]. U *Phaseolus vulgaris* zaobserwowano także zwiększenie ilości białka PIP1 w liściach po dolistnym podaniu kwasu abscysynowego [38]. Zidentyfikowano także gen



Rycina 3. Schemat przedstawiający przepływ cząsteczek wody przez kanał wodny. Przepływ H_2O jest hamowany przez filtr wielkości i odpychanie elektrostatyczne reszty argininy 195 (R195) i reszty histydyny 180 (H180) (zmodyfikowano wg [26]).

kodujący białko At-TIP, którego ekspresja znacząco wzrasta po stymulacji kwasem giberelinowym [39].

Analiza ekspresji akwaporyn *Oryza sativa* oraz *Zea mays* wykazała, że istnieje zależność pomiędzy poziomem transkryptu genów kodujących białka PIP i TIP a warunkami świetlnymi. Najwyższy poziom ekspresji genów akwaporyn OsPIP1;2, OsPIP1;3, OsPIP2;3, OsPIP2;4, OsPIP2;5, OsTIP1;2 i OsTIP2;1 zaobserwowano w korzeniach roślin w czasie dnia, najniższy w czasie nocy [17]. Badania nad wpływem światła i ciemności na ekspresję genów PIP *Zea mays* (*ZmPIP1;1*, *ZmPIP1;5*, *ZmPIP2;1* i *ZmPIP2;5*) w rytmie 16 godzin światła i 8 godzin ciemności wykazały, że maksymalny poziom transkryptów występuje w okresie od 2 do 4 godziny okresu światła, następnie ekspresja spada gwałtownie, utrzymuje się na niskim poziomie przez drugą połowę okresu światła i przez początek okresu ciemności, by wzrosnąć i osiągnąć maksimum między drugą a czwartą godziną dnia. Przedłużenie okresu ciemności z 8 do 52 godzin doprowadziło do uzyskania w pierwszej dobie ciemności profilu ekspresji charakterystycznego dla poprzednich warunków świetlnych, a następnie trwałego spadku ekspresji genów *ZmPIP1;1*, *ZmPIP2;1* i *ZmPIP2;5* w drugiej dobie ciemności [40].

REGULACJA AKTYWNOŚCI AKWAPORYN

PROCES FOSFORYLACJI

Oprócz specyficznej regulacji ekspresji genów akwaporyn, aktywność kanałów wodnych regulowana jest także na poziomie potranslacyjnym. Stwierdzono, że przepuszczalność wody przez membrany jest regulowana przez fosforylację reszt seryny w domenach cytoplazmatycznych N- i C-końca akwaporyn. Doświadczenia z wykorzystaniem heterologicznej transkrypcji genów akwaporyn w oocytach *Xenopus laevis* w obecności cAMP (aktywator szlaku kinazy A) oraz kwasu okadaikowego (inhibitora fosfataz) dowiodły istnienia fosforylowanych reszt seryny w białkach: *PvTIP3;1* *Phaseolus vulgaris* (Ser-7), *SoPIP2;1* *Spinacia oleracea* (Ser-274 i Ser-277) oraz *GmNodulin26* *Glycine max* (Ser-262) [41].

Poza udokumentowanymi miejscami fosforylacji zlokalizowanymi w obszarach terminalnych polipeptydów, wszystkie akwaporyny błony komórkowej oraz niektóre akwaporyny tonoplastowe posiadają zachowaną w ewolucji resztę seryny położoną w cytoplazmatycznej pętli obok pierwszego motywu NPA. Reszta seryny ta otoczona jest przez aminokwasy tworzące motyw R/X-K-X-S-X-X-R rozpoznawany przez wiele kinaz, m.in. kinazę zależną od jonów wapnia (ang. *Calcium-Dependent Protein Kinase*, CDPK) [41]. Podobny motyw występuje u akwaporyn tonoplastowych, gdzie reszta seryny podstawiona jest przez resztę treoniny [1]. Wysoki stopień zachowania w ewolucji motywu sugeruje ważne znaczenie strukturalne i funkcjonalne. Fosforylacja akwaporyn może być związana ze stadium rozwojowym rośliny bądź z czynnikami zewnętrznymi. *GmNodulin26* jest fosforylowana w symbiosomach podczas dojrzewania brodawek oraz bierze udział w osmoregulacji komórki podczas stresu solnego lub wodnego. *PvTIP3;1* jest aktywowana w rozwijających się nasionach. Mechanizm regulacyjny powoduje defosforylację *PvTIP3;1* w trakcie imbibicji nasion. Ograniczenie utraty wody w warunkach stresu

wodnego u szpinaku warunkuje defosforylacja *SoPIP2;1* w komórkach liści [41].

Dowiedziano, że akwaporyna PM28A szpinaku fosforylowana jest w pozycji reszty Ser-274 (motyw S-X-R kinazy C kręgowców) w obecności wolnych jonów Ca^{2+} [42]. W procesie regulacji aktywności akwaporyn sugeruje się udział związanej z błoną komórkową kinazy zależnej od jonów wapnia. Gdy potencjał wodny w apoplastacie jest wysoki, jony Ca^{2+} napływają do wnętrza komórki, a wysokie stężenie cytoplazmatycznego wapnia aktywuje CDPK, która fosforyluje reszty serynowe akwaporyn. Kanały wodne błony plazmatycznej pozostają otwarte. Aby zminimalizować straty wody przy niskim potencjale wody apoplastu, (sygnalizowanym niskim stężeniem wapnia w cytosolu) akwaporyny ulegają defosforylacji i przepuszczalność błony komórkowej spada. Jednocześnie pozostają otwarte białka podrodziny TIP, co pozwala na napływ wody z wakuoli i zrekompensowanie jej strat w cytoplazmie [3]. Azad i wsp. [31] wykazał, że akwaporyna obecna w płatkach kwiatu tulipana jest fosforylowana poprzez kinazę zależną od jonów Ca^{2+} , a proces defosforylacji przeprowadza fosfataza typu 2A. Fosforylacja akwaporyn była ściśle skorelowana z zależnym od temperatury otwieraniem i zamykaniem płatków, co sugeruje zaangażowanie akwaporyn w transport wody towarzyszący tym procesom [31]. Wyniki te pokazują, że podczas rozwoju i w odpowiedzi roślin na bodźce środowiskowe, proces fosforylacji może stanowić istotny mechanizm regulacji aktywności akwaporyn u roślin (Ryc. 4).

TWORZENIE HETEROTETRAMERÓW

W błonie komórkowej lub w tonoplastacie akwaporyny występują przeważnie w postaci oligomerów złożonych z czterech identycznych polipeptydów. Wykazały to badania z użyciem kriokrytalografii elektronowej u fasoli i szpinaku [1]. Jednak w tonoplastacie soczewicy zaobserwowano obecność kanałów wodnych złożonych z dwóch polipeptydów o masach 25 i 26 kDa [43]. Badania przeprowadzone u kukurydzy dowiodły, że jednym z mechanizmów regulacyjnych aktywności akwaporyn może być tworzenie kompleksów przez te białka (Rys. 4). Koekspresja *ZmPIP1;2* i *ZmPIP2* w oocytach *X. laevis* zwiększała przepuszczalność wody przez błonę w porównaniu do ekspresji pojedynczych genów PIP. Kompleksy białek mogą usprawnić transport akwaporyn podrodziny PIP1 do błony plazmatycznej, które w postaci homotetramerów często nie zwiększają lub jedynie w niewielkim stopniu zwiększają przepuszczalność błon oraz wpłynąć na faldowanie się i zmianę konformacji fragmentu białka na granicy pętli E i szóstej domeny transbłonowej [41].

ZMIANY pH I STĘŻENIA Ca^{2+}

Badania nad ekspresją genów *AtPIP2;1*, *AtPIP2;2* oraz *AtPIP2;3* w oocytach *X. laevis* dowiodły istnienia mechanizmu regulacyjnego przepływu wody przez błonę komórkową, związanego z odczynem pH wewnątrz komórki. Spadkowi pH cytoplazmy z 7 do 6 jednostek towarzyszył spadek przepuszczalności błony. Wykazano, że w pH kwaśnym, reszta His-197 położona w pętli wewnątrzkomórkowej *AtPIP2;2* ulega protonacji, co prowadzi do zmiany w

strukturze i niedrożności kanału przez część pętli D białka [44]. Podobny wpływ na strukturę kanału mogą mieć wewnątrzkomórkowe jony wapnia, które łącząc się z C-końcem akwaporyny poprzez kalmodulinę uniemożliwiają przepływ wody przez kanał [41]. Zaobserwowano, że jony Ca^{2+} zmniejszają aktywność kanałów wodnych w oczyszczonych pęcherzykach błonowych. Mechanizm tego hamowania, bezpośredniego czy pośredniego, aktywności akwaporyn wciąż jest nieznan, obserwowany jest gdy stężenie jonów wapnia w cytoplazmie waha się w zakresie od 10 – 100 μM . Obserwacje fizjologiczne przeprowadzone u kukurydzy i melona wykazały, że jony wapnia neutralizują negatywne działanie chlorku sodu na przepuszczalność wody w korzeniu. Wyniki te są wyraźnie różne od tych obserwowanych w wyizolowanych pęcherzykach błonowych, co może świadczyć o istnieniu innego, nie odkrytego mechanizmu, obejmującego rolę wapnia w przekazywaniu sygnału podczas stresu solnego [1].

DZIAŁANIE REAKTYWNYCH FORM TLENU

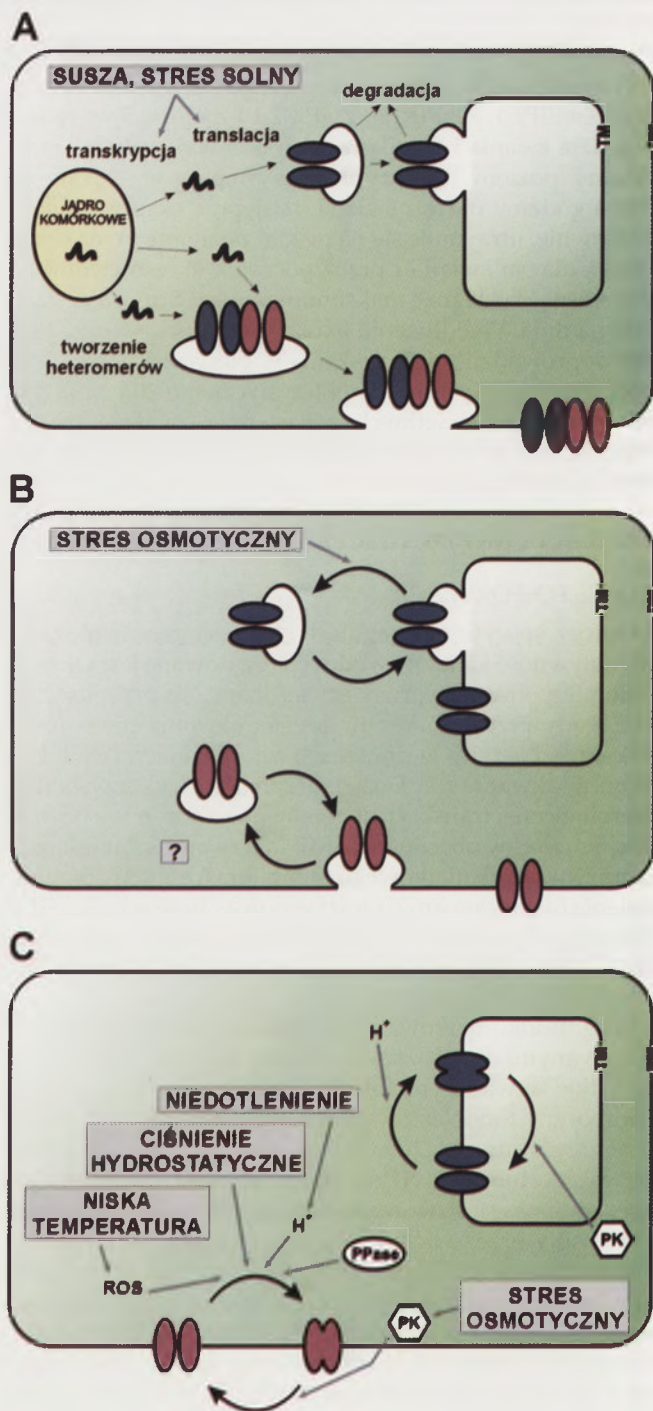
Wykazano, że niska temperatura zmniejsza przewodnictwo hydrauliczne w korzeniach pomidora [45] i kukurydzy [46]. Uważa się, że efekt ten wywołany jest poprzez nadtlenek wodoru uwalniany w momencie wystawienia korzeni na działanie chłodu [47]. Reaktywne formy tlenu zmniejszają także aktywność kanałów wodnych w komórkach *Chara corallina* [48]. Okazało się, że reaktywne formy tlenu zmniejszają przewodnictwo hydrauliczne aż do 90%, są więc bardziej wydajne niż sole rtęci, które powszechnie znane są jako inhibitory kanałów wodnych. Hentzler i wsp. [48] zaproponował, że reaktywne formy tlenu wpływają na przepuszczalność akwaporyn bezpośrednio poprzez oksydację tych białek lub pośrednio poprzez oksydację lipidów błonowych i tworzenie wolnych rodników. Ze względu na to, że reaktywne formy tlenu uznawane są za cząsteczki sygnałowe w komórkach, również w przypadku akwaporyn mogą rozpoczynać kaskadę reakcji wpływających na regulację ich aktywności (Ryc. 4) [1].

CIŚNIENIE OSMOTYCZNE I HYDROSTATYCZNE

Ye i wsp. [49] wykazali, że wysokie stężenie eterów glikolowych (powyżej 800 mM) zmniejsza przepuszczalność wody w akwaporynach. Prawdopodobnie wysokie ciśnienie podczas przepływu cząsteczek doprowadza do napięć wewnątrz kanału oraz deformacji białka, uniemożliwiającej transport wody [2,49].

Innym parametrem, który może regulować otwieranie kanałów wodnych jest komórkowe ciśnienie hydrostatyczne czyli turgor. Zmiany ciśnienia wywoływały przewodzenie hydrauliczne w komórkach korowych korzenia. Zakres

inhibicji przepływu wody przez kanał był uzależniony od ruchów wody spowodowanych zmianami ciśnienia. Sugeruje to, że wysoki zakres przepływu wody w kanale wodnym może wymuszać wysokie ciśnienie powstające w momencie zmniejszania się średnicy kanału. Stwierdzono, że kwas abscysynowy może neutralizować hamowanie



Rycina 4. Proponowane mechanizmy regulacji aktywności kanałów wodnych u roślin. (A). Kontrola poziomu transkrypcji i ilości białka. Susza, stres solny oraz inne bodźce środowiskowe znane są jako czynniki wpływające na transkrypcję genów akwaporyn i prawdopodobnie na ich translację oraz degradację, określając w ten sposób ilość kanałów wodnych w błonach komórki. Tworzenie przez białka PIP heteromerów u roślin jest hipotetyczne, gdyż do tej pory zjawisko to zaobserwowano w oocytach *Xenopus*. Wydaje się, że mechanizm ten preferuje transport homologów PIP1 do błony plazmatycznej (PM). (B). Wewnątrzkomórkowa zmiana lokalizacji. Przemieszczanie akwaporyn TIP z tonoplastu (TP) do małych pęcherzyków wewnątrzkomórkowych stwierdzono w komórkach zawiesiny z *M. crystallinum* hodowanych w warunkach stresu osmotycznego. Wykazano podobny mechanizm dla akwaporyn PIP, choć pozostaje on hipotezą. (C). Kontrola przepustowości kanału. Fosforylacja oraz defosforylacja akwaporyn przeprowadzana odpowiednio przez kinazy (PK) i fosfatazy (PPase) reguluje otwieranie i zamykanie kanałów wodnych w TM i PM. Reaktywne formy tlenu, wysokie stężenia roztworów i komórkowe ciśnienie hydrostatyczne wpływają na aktywność akwaporyn, choć efekty bezpośredniego czy pośredniego ich działania pozostają ciągle niewyjaśnione. Schemat pokazuje także działanie kinazy białek oraz wpływ niskiej temperatury, niedotlenienia oraz stresu osmotycznego na gromadzenie się, odpowiednio, reaktywnych form tlenu i protonów (zmodyfikowane wg [1]).

kanałów wodnych spowodowane wysokim ciśnieniem [1]. Oba typy regulacji mogą brać udział w kształtowaniu się turgoru komórki zależnie od warunków wodnych i osmotycznych (Rys. 4) [2].

DYNAMIKA SUBKOMÓRKOWEJ LOKALIZACJI AKWAPORYN

Obecnie wiadomo, że fosforylacja akwaporyn wpływa na przepuszczalność błon, jednak sam mechanizm regulacji nie jest poznany. Podejrzewa się, że otwarcie kanału wodnego następuje, gdy dochodzi do bezpośredniego oddziaływania ujemnie naładowanej reszty fosforanowej z przestrzenną strukturą białka. Niewykluczone jest jednak, że fosforylacja reszt serynowych ma znaczenie w wewnątrzkomórkowym transporcie akwaporyn z przybłonowych pęcherzyków do błony plazmatycznej, jak ma to miejsce w przypadku akwaporyny 2 (AQP2) człowieka w komórkach kanalików zbiorczych nerki [41]. W głównych komórkach kanalików zbiorczego nerki białko AQP2 zlokalizowane jest w obrębie wewnątrzkomórkowych pęcherzyków położonych przy błonie komórkowej. Związanie wazopresyny (ADH, ang. *antidiuretic hormone*) przez receptor V2 następuje w obecności cAMP, który aktywuje podjednostkę katalityczną kinazy A. Kinaza A fosforyluje białko AQP2 w pozycji Ser-256, co powoduje przemieszczenie się i fuzję pęcherzyków ze szczytową częścią błony komórkowej oraz wzrost przepuszczalności wody przez błonę. Przy braku wazopresyny we krwi akwaporyna 2 przemieszczana jest do wnętrza komórki i przepuszczalność błony komórkowej spada do poziomu podstawowego [50].

Badania nad białkami MipA, MipB, MipC i MipF u *Mesembryanthemum crystallinum* (ang. *common ice plant*) wskazują na skomplikowany proces dystrybucji akwaporyn do organelli komórkowych. Nie każde białko należące do podrodziny PIP trafia do błony komórkowej, a każdy TIP do tonoplastu. Doświadczenia z wykorzystaniem immunolokalizacji akwaporyn *in situ* wskazują na krążenie białek pomiędzy błonami w komórce, m.in. za pośrednictwem plazmalemmosomów [51].

Roślinne akwaporyny są transportowane do docelowych błon plazmatycznych szlakiem sekrecyjnym z siateczki śródplazmatycznej poprzez aparat Golgiego oraz liczne typy pęcherzyków. Rozmieszczenie akwaporyn jest jednak bardziej skomplikowane niż prosty model transportu białka do błony plazmatycznej czy tonoplastu. AtPIP1 rzodkiewnika, ZmPIP1;2 i ZmPIP2;5 kukurydzy zostały zlokalizowane głównie w błonie komórkowej, ale także w plasmalemmosomach i innych wewnętrznych błonach komórki [41]. Obecność białka McPIP1;4 ujawniono w tonoplaście, a w błonie plazmatycznej zlokalizowano tylko niewielką część McPIP2;1 obecnego w komórce. Stwierdzono także zmianę lokalizacji akwaporyn w odpowiedzi na czynnik stresowy. Stres osmotyczny wywołany mannitolem spowodował wzrost ilości białka McTIP1;2 (McMipF) w błonie wakuoli i zmianę jego dystrybucji do innych membran wewnątrz komórki. Takie zmiany McTIP1;2 nie były obserwowane w obecności inhibitorów transportu pęcherzykowego: brefeldyny A, wortmanniny i cytochalazyny D. McTIP1;2 występowało w postaci glikozylowanej, co wskazuje na duże zna-

czenie modyfikacji potranslacyjnych w dystrybucji akwaporyn w obrębie błony plazmatycznej w komórce [52].

PODSUMOWANIE

Kanały wodne w komórkach roślinnych wykazują różnice w sposobach transportu selektywnego, w lokalizacji wewnątrzkomórkowej i mechanizmach regulacji. W związku z tym, że komórki roślinne wykazują duży stopień przedziałowości muszą więc nieustannie koordynować transport wody i innych roztworów, a także gazów zarówno poprzez błonę plazmatyczną, jak i inne błony wewnątrzkomórkowe. Rośliny zmuszone są dokonywać ciągłej kontroli przepływu wody podczas swojego rozwoju wewnątrz wszystkich tkanek, w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska ich życia. Istnieje wiele mechanizmów, które mogą wpływać na regulację kanałów wodnych u roślin zarówno na poziomie tkankowym, komórkowym, wewnątrzkomórkowym czy molekularnym.

PIŚMIENNICTWO

1. Luu D-T, Maurel C (2005) Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell Environ* 28: 85-96
2. Hachez C, Zelazny E, Chaumon F (2006) Modulating the expression of aquaporin genes in planta: A key to understand their physiological functions? *Biochim Biophys Acta* 1758: 1142-1156
3. Dąbrowska G, Głowacka B (2004) Akwaporyny – nowe spojrzenie na transport wody w roślinach. *Postepy Biochem* 50: 383-387
4. Kaldenhoff R, Fischer M (2006) Aquaporins in plants. *Acta Physiol* 187: 169-176
5. Ishibashi K (2006) Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes. *Biochim Biophys Acta* 1758: 989-993
6. Frühbeck G, Catalan V, Gomez-Ambrozi J, Rodriguez A (2006) Aquaporin-7 and glycerol permeability as novel obesity drug-target pathways. *Trends Pharmacol Sci* 27: 345-347
7. Wang Y, Schulten K, Tajkhorshid E (2005) What makes an aquaporin a glycerol channel: A comparative study of AqpZ and GlpF. *Structure* 13: 1107-1118
8. Wallace IS, Roberts DM (2005) Distinct transport selectivity of two structural subclasses of the nodulin-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporin channels. *Biochemistry* 44: 16826-16834
9. Beitz E, Wu B, Holm LM, Schultz JE, Zeuthen T (2006) Point mutation in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 269-274
10. Loque D, Ludewig U, Yuan L, von Wiren N (2006) Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. *Plant Physiol* 137: 671-680
11. Takano J, Wada M, Ludewig U, Schaaf G, von Wiren N, Fujiwara T (2006) The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* 18: 1498-1509
12. Bienert GP, Schjoering JK, Jahn TP (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1758: 994-1003
13. Hill AE, Shachar-Hill B, Shachar-Hill Y (2004) What are aquaporins for? *J Membr Biol* 197: 1-32
14. Flexas J, Ribas-Carbo M, Hanson DT, Bota J, Otto B, McDowell N, Medrano H, Kaldenhoff R (2006) Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ *in vivo*. *Plant J* 48: 427-439
15. Quigley F, Rosenberg JM, Shachar-Hill Y, Bohnert HJ (2002) From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biol* 3: 1-17
16. Weig A, Deswarte C, Chrispeels MJ (1997) The major intrinsic protein family of *Arabidopsis* has 23 members that from three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiol* 114: 1347-1357
17. Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, Maeshima M (2005) Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol* 46: 1568-1577

18. Chaumont F, Barriau F, Wojcik E, Chrispeels MJ, Jung R (2001) Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol* 125: 1206-1215
19. Wang F, Feng XC, Li YM, Yang H, Ma TH (2006) Aquaporins as potential drug targets. *Acta Pharmacol Sin* 27: 395-401
20. Zarodaya R (2005) Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol Cell* 97: 397-414
21. Wallace IS, Roberts DM (2004) Homology modeling of representative subfamilies of *Arabidopsis* major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter. *Plant Physiol* 135: 1059-1068
22. Ishikawa F, Suga S, Uemura T, Sato MH, Maeshima M (2005) Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 579: 58145-5820
23. Kruse E, Uehlein N, Kaldenhoff R (2006) The aquaporins. *Genome Biol* 7: 206
24. Törmroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 439: 688-694
25. Gonen T, Waltz T (2006) Structure of aquaporins. *Q Rev Biophys* 39: 361-396
26. Agre P, Kozono D (2003) Aquaporin water channels - molecular mechanism for human diseases. *FEBS Lett* 27: 72-78
27. Chrispeels MJ, Crawford NM, Schroeder JI (1999) Protein for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. *Plant Cell* 11: 661-675
28. MacRobbie EAC (2006) Control of volume and turgor in stomatal guard cells. *J Membrane Biol* 210: 131-142
29. Hachez C, Moshelion M, Zelazny E, Cavez D, Chaumont F (2006) Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a cue to understanding their role as cellular plumbers. *Plant Mol Biol* 62: 305-323
30. Moshelion M, Becker D, Biela A, Uehlein N, Hedrich R, Otto B, Levi H, Moran N, Kaldenhoff R (2002) Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: diurnal and circadian regulation. *Plant Cell* 14: 727-739
31. Azad AK, Sawa Y, Ishikawa T, Shibata H (2004) Phosphorylation of plasma membrane aquaporin regulates temperature-dependent opening of tulip petals. *Plant Cell Physiol* 45: 608-617
32. Alexandersson E, Frayse L, Sjøvall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biol* 59: 469-484
33. Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS, Kang H (2004) An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 54: 713-725
34. Yu Q, Hu Y, Li J, Wu Q, Lin Z (2005) Sense and antisense expression of plasma membrane aquaporin from *Brassica napus* in tobacco and its effects on plant drought resistance. *Plant Sci* 169: 647-656
35. Mariaux JB, Bockel C, Salamini F, Bartels D (1998) Desiccation- and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol Biol* 38: 1089-1099
36. Yamada S, Katsuhara M, Kelly WB, Michalowski CB, Bohnert HJ (1995) A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* 7: 1129-1142
37. Zhu C, Schraut D, Hartung W, Schäffner AR (2005) Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA. *J Exp Bot* 56: 2971-2981
38. Aroca R, Ferrant A, Vernieri P, Chrispeels MJ (2006) Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants. *Ann Bot* 98: 1301-1310
39. Phillips AL, Huttly AK (1994) Cloning of two gibberellin-regulated cDNAs from *Arabidopsis thaliana* by subtractive hybridization: expression of the tonoplast water channel, gamma-TIP, is increased by GA3. *Plant Mol Biol* 24: 603-615
40. Lopez F, Boussier A, Sissoeff I, Gaspar M, Lachaise B, Hoarau J, Mahe A (2003) Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins. *Plant Cell Physiol* 44: 1384-1395
41. Chaumont F, Moshelion M, Daniels MJ (2005) Regulation of plant aquaporin activity. *Biol Cell* 97: 749-764
42. Johansson I, Larsson C, Ek B, Kjellbom P (1996) The major integral protein of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca²⁺ and apoplastic water potential. *Plant Cell* 8: 1181-1191
43. Harvengt P, Vlerick A, Fuks B, Wattiez R, Ruyschaert JM, Homble F (2000) Lentil seed aquaporins form a hetero-oligomer which is phosphorylated by a Mg²⁺-dependent and Ca²⁺-regulated kinase. *Biochem J* 352: 183-190
44. Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu DT, Bligny R, Maurel C (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 425: 393-397
45. Bloom AJ, Zwieniecki MA, Raundal LB, Holbrook NM, St Clair DA (2004) Water relations under root chilling in a sensitive and tolerant tomato species. *Plant Cell Environ* 27: 971-979
46. Melkonian J, Yu L-X, Setter TL (2004) Chilling responses of maize (*Zea mays*L.) seedlings: root hydraulic conductance, abscisic acid, and stomatal conductance. *J Exp Bot* 55: 1751-1760
47. Lee SH, Singh AP, Chung GC (2004) Rapid accumulation of hydrogen peroxide in cucumber roots due to exposure to low temperature appear to mediate decrease in water transport. *J Exp Bot* 55: 1733-1741
48. Hentzler TE, Ye Q, Steudle E (2004) Oxidative gating of water channels (aquaporins) in *Chara* by hydroxyl radicals. *Plant Cell Environ* 27: 1184-1195
49. Ye Q, Wiera B, Steudle E (2004) A cohesion/tension mechanism explains the gating of water channels (aquaporins) in *Chara* internodes by high concentration. *J Exp Bot* 55: 449-461
50. Christensen BM, Zelenina M, Aperia A, Nielsen S (2000) Localisation and regulation of PKA-phosphorylated AQP2 in response to V₂-receptor agonist/antagonist treatment. *Am J Physiol* 278: 92-95
51. Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O, Kirch HH, Bohnert HJ (1999) Aquaporin localization - how valid are the TIP and PIP labels? *Trends Plant Sci* 4: 86-88
52. Vera-Estrella R, Barkla JB, Bohnert HJ, Pantoja O (2004) Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol* 135: 2318-2329

The high diversity and regulation of plant water channels

Paweł Mateusz Mordaka, Grażyna Dąbrowska[✉]

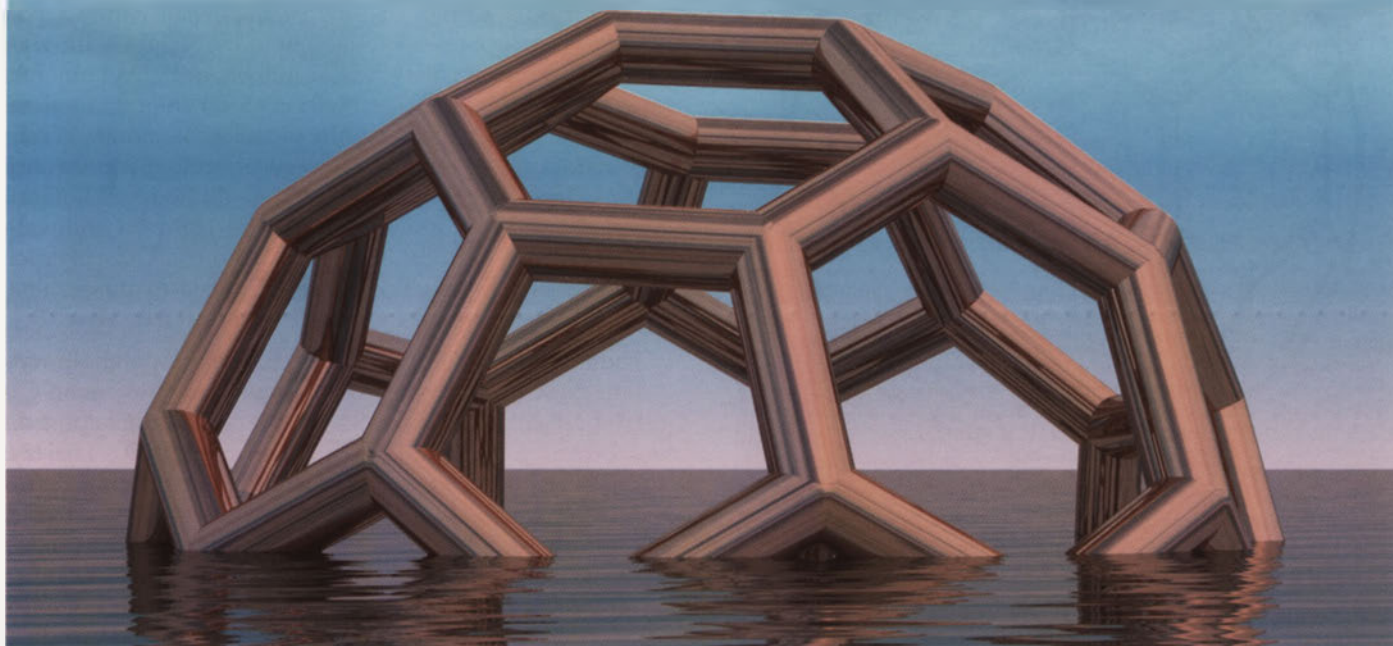
Department of Genetics, Institute of General and Molecular Biology, Faculty of Biology and Earth Sciences, Nicolaus Copernicus University, Gagarina St. 9, 87-100 Toruń, Poland
[✉] e-mail: browsk@uni.torun.pl

Key words: water transport, membrane channel, aquaporins, abiotic stress

ABSTRACT

Membrane intrinsic proteins (MIPs) are a diverse class of integral membrane proteins that mediate the bi-directional flux of water (aquaporins), uncharged small solutes such as glycerol and/or gases across cellular membranes. The past year has brought significant advances in the characterization in plants of a large class this of water channel. MIPs have been identified in many single- and multi-cellular organisms. Aquaporins play important role in plant development and their adaptation to even changing environment. At the transcriptional level aquaporins have been up- or down-regulated in response to hormones, drought, salinity and light. Recent data indicate that plant aquaporin activity might be regulated by phosphorylation and intracellular protons. Novel mechanisms of regulation by hetero-tetramer formation or through control by reactive oxygen species and osmotic or hydrostatic pressure gradients is also discussed.

Fulereny w biologii



STRESZCZENIE

Fulereny to cząsteczki, w których atomy węgla tworzą regularne, kuliste struktury, przypominające piłkę futbolową. Najtrwalszą z nich jest cząsteczka zbudowana z 60 atomów węgla. Ze względu na obecność 60 zdelokalizowanych elektronów, cząsteczka ta może przyłączać i oddawać elektrony, wykazując tym samym właściwości antyoksydacyjne lub prooksydacyjne. Te właściwości fulerenów zwróciły uwagę na możliwość zastosowania fulerenów i ich pochodnych w terapii. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że działanie fulerenów znacząco zależy od rodzaju, ilości i geometrii podstawników przyłączonych do „węglowej piłeczki”. Istotne jest odkrycie antywirusowego działania fulerenów, w tym przeciwko wirusowi HIV. Fulereny mogą być cytotoksyczne poprzez generowanie reaktywnych form tlenu pod wpływem światła widzialnego i hamowanie aktywności enzymatycznej. Zdolność tworzenia reaktywnych form tlenu może zostać wykorzystana w terapii fotodynamicznej.

WPROWADZENIE - ODKRYCIE FULERENÓW

W roku 2006 mija 21 rocznica odkrycia i 10 rocznica przyznania Nagrody Nobla dla trójki naukowców H. Kroto, R. Smalley'a i R. Curl'a za odkrycie i badania nad nową formą alotropową węgla, którą nazwano buckminsterfulerenami lub krócej fulerenami. Nazwą tą objęto cząsteczki, w których atomy węgla tworzą regularne struktury przypominające swoim wyglądem piłkę futbolową. Najtrwalszą z nich jest C_{60} składająca się z 20 pierścieni 6-członowych i 12 5-członowych, jednak stwierdzono istnienie struktur C_{70} , C_{76} czy nawet C_{96} (Ryc. 1). Trwałość struktury C_{60} wiąże się z geometrią cząsteczki będącej prawie idealną kulą i istnieniem 60 zdelokalizowanych elektronów. Ten fakt zwrócił również uwagę na możliwość przyłączania elektronów pochodzących od innych cząstek, co wiązało się z potencjalnymi właściwościami antyoksydacyjnymi i zmiatającymi wolne rodniki. Jednocześnie równie łatwo fulereny mogą oddawać elektrony, co wskazuje na ich ewentualne działanie prooksydacyjne i możliwość generowania reaktywnych form tlenu [1,2]. W ten sposób cząsteczka, której odkrycie wiązało się z badaniami z zakresu astrofizyki i chemii trafiła do nauk biologicznych. Po opracowaniu metody syntezy większych ilości węglowej „piłeczki” C_{60} rozpoczęły się badania nad możliwościami praktycznego jej zastosowania

„Buckminsterfulleren - half of it in water” by Professor Tamas E. Gunda from Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Debrecen, Hungary (<http://dragon.klte.hu/~gundat/povraya.htm>), with permission. Created with the programs Mol2Mol 5.5 and POV-Ray 3.6.

Anita Krokosz

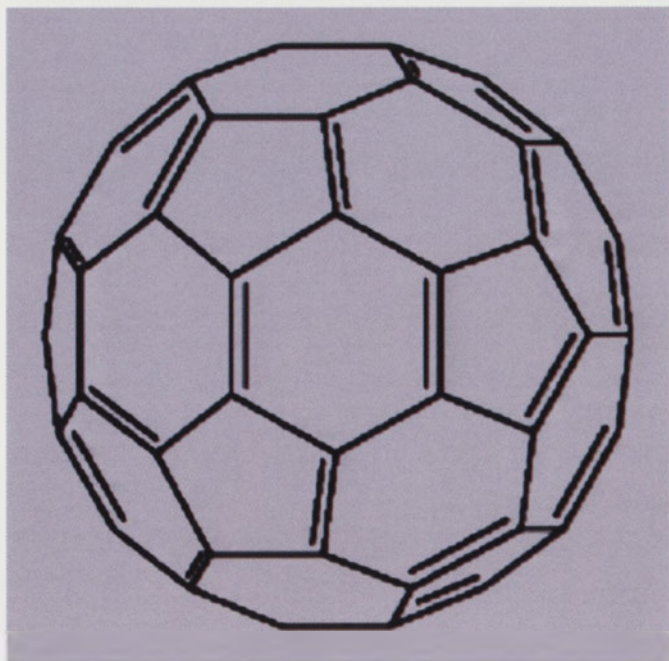
Zakład Radiobiologii, Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Zakład Radiobiologii, Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: krokosz@biol.uni.lodz.pl; tel.: (042) 635 44 80

Artykuł otrzymano 8 listopada 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 17 listopada 2006 r.

Słowa kluczowe: fulereny, toksyczność, antyoksydanty, fotouczulacze, właściwości antywirusowe

Wykaz skrótów: C_3 - pochodna C_{60} podstawiona trzema cząsteczkami kwasu malonowego; FHP1 - heksapochodna C_{60} z P1 i pięcioma grupami malonianu dietylu; FP1 - monopochodna C_{60} z P1; nano- C_{60} - agregaty C_{60} o wymiarach 25-500 nm; P1 (ang. *pyropheophorbide a*) - pirofeoforbid a; PVP - poliwinylpiperolidon; RFT - reaktywne formy tlenu



Rycina 1. Struktura fulerenu C_{60} .

w układach biologicznych. Niektóre z właściwości C_{60} np. brak rozpuszczalności w rozpuszczalnikach polarnych spowodowały, że zsyntezowano pochodne zawierające grupy hydrofilowe rozszerzając możliwości wykorzystania fulerenów. Niektóre z pochodnych fulerenów mają już swoje nazwy grupowe związane z obecnością określonych podstawników, np. $C_{60}(OH)_n$ to fulerole, $C_{60}H_n$ – fulerany. Poniżej omówiono główne nurty badań i możliwości wykorzystania fulerenów i ich pochodnych w biologii.

TOKSYCZNOŚĆ FULERENÓW

Cząsteczki C_{60} w kontakcie z wodą, tworzą trwałe agregaty nanometrowych wymiarów (25-500 nm) nazywane nano- C_{60} . Ich wielkość, barwa, własności powierzchniowe oraz reaktywność różnią się w zależności od warunków w jakich powstały. Zawiesiny C_{60} pozostają trwałe w przeciągu miesięcy w roztworach o niskiej sile jonowej ($I \leq 0,05$). Istnieją doniesienia, że zawiesiny te są toksyczne dla komórek i wywołują uszkodzenia poprzez oddziaływanie elektrostatyczne ze strukturami komórkowymi [3,4] i poprzez reaktywne formy tlenu [5,6].

Fortner i wsp. [3] zaobserwowali, że nano- C_{60} w stężeniach powyżej 0,4 ppm powoduje zahamowanie wzrostu bakterii *E. Coli* DH5 α i *B. Subtilis* CB315 w hodowlach prowadzonych w różnych pożywkach oraz w warunkach tlenowych i beztlenowych. Oddychanie bakterii było hamowane przez zawiesiny nano- C_{60} , natomiast inkubacja komórek z fulerolem ($C_{60}(OH)_{22-24}$) nie wywoływała zmian w intensywności oddychania. Autorzy sugerują, że toksyczność nano- C_{60} jest związana z oddziaływaniem cząsteczek C_{60} posiadających ujemny ładunek na powierzchni, z błonami komórkowymi bakterii.

Podobne wyniki uzyskali Lyon i wsp. [4] analizując analogiczne układy badawcze.

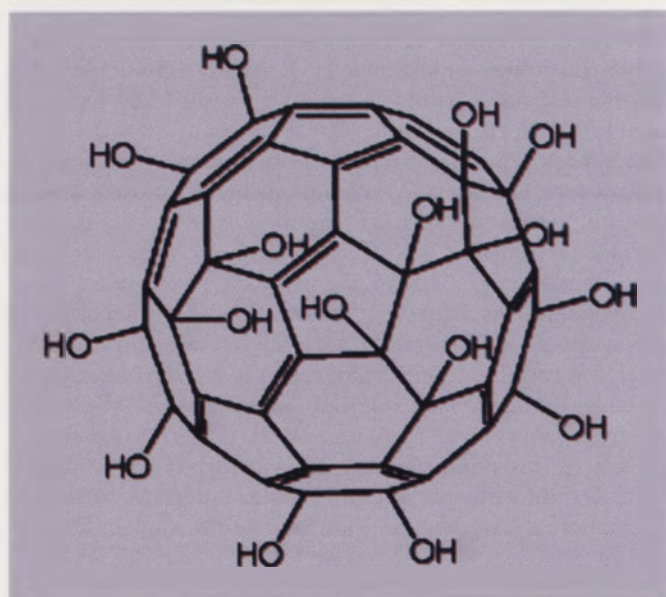
Nano- C_{60} wykazuje także silną toksyczność w stosunku do fibroblastów skóry, komórek raka wątroby (HepG2) i astrocytów [6]. Analizowano przeżywalność komórek, aktywność mitochondrialną komórek (z MTT), uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej, syntezę glutationu (GSH) i peroksydację lipidów. Zaobserwowano znaczny spadek przeżywalności komórek ze wzrostem stężenia nano- C_{60} połączony ze znaczną peroksydacją lipidów. Nano- C_{60} nie wykazywało wpływu na aktywność mitochondrialną komórek (w czasie trwania doświadczenia czyli do 48 godz.) ani na uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej z komórek. Wzrosła natomiast stężenie GSH, co świadczyło o wzmożonej syntezie tego antyoksydanta. Dodanie do hodowli komórkowej kwasu L-askorbinowego (0,06ml 1mM do 4ml) całkowicie znosiło toksyczne działanie nano- C_{60} . Toksyczności wobec badanych komórek nie wykazywała rozpuszczalna w wodzie pochodna z 24 grupami $-OH$ $C_{60}(OH)_{24}$ (Ryc. 2).

Badania spektrofotometryczne z użyciem jodofenolu wykazały, że w układzie nie zawierającym komórek, nano- C_{60} jest odpowiedzialny za powstawanie anionorodnika nadadtlenkowego [5]. Anionorodnik nadadtlenkowy ($O_2^{\cdot -}$) należy do RFT i jest produktem jednoelektronowej redukcji tlenu. Natomiast fulerol $C_{60}(OH)_{24}$ nie indukował powstawania anionorodnika nadadtlenkowego. Można na podstawie powyższych informacji wnioskować, że toksyczność nano- C_{60} wynika z generowania w układzie zawierającym komórki anionorodnika nadadtlenkowego, który jest bezpośrednią przyczyną zaobserwowanych uszkodzeń.

WŁAŚCIWOŚCI ANTYBAKTERYJNE I ANTYWIRUSOWE, TERAPIA FOTODYNAMICZNA

DZIAŁANIE ANTYBAKTERYJNE

Badania nad toksycznością fulerenów prowadzone na komórkach bakteryjnych zwróciły uwagę na możliwość wykorzystania tych związków jako czynników bakteriobójczych. Fulereny i ich pochodne wykazywały działanie bakteriobójcze zarówno przeciwko bakteriom Gram-dodatnim jak i Gram-ujemnym. Tsao i wsp. [7]



Rycina 2. Struktura hydroksyfulereny (fulerolu) $C_{60}(OH)_{24}$.

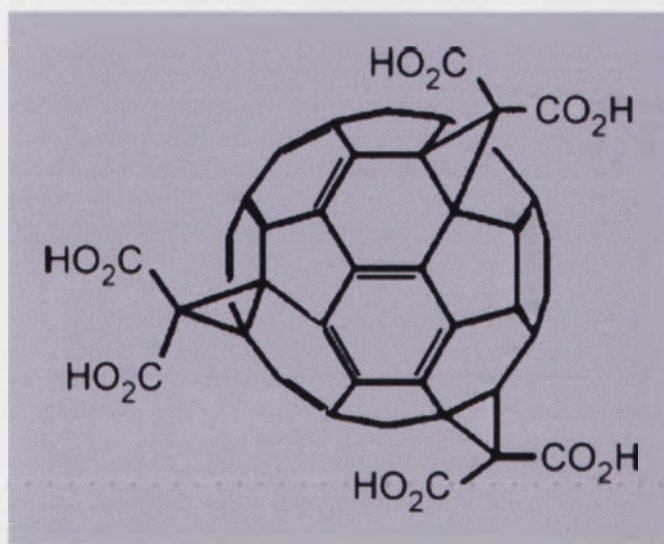
badali 20 szczepów bakteryjnych, w tym *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus faecalis*, *E. Coli*, *Salmonella typhi* i *Klebsiella pneumoniae* w kierunku wrażliwości na karboksyfuleren, addukt C_{60} i trzech cząsteczek kwasu malonowego (C_3) (Ryc. 3). Pochodna ta działała bakteriobójczo na wszystkie szczepy bakterii Gram-dodatnich w stężeniach poniżej 50 mg/l. Natomiast bakterie Gram-ujemne nie były wrażliwe nawet na stężenie 500 mg/l. Autorzy stwierdzili, że następowało włączenie pochodnej fulerenu do ściany komórkowej *Staphylococci* i *Streptococci* oraz destrukcja błony plazmatycznej w bakteriach Gram-dodatnich. W badaniach *in vivo* na myszach zakażonych *Streptococcus pyogenes*, karboksyfuleren podany dootrzewnowo zmniejszał śmiertelność myszy o 33% [8].

Prowadzone są też prace nad antybakteryjnym działaniem kationowych fulerenów poprzez blokowanie oddychania bakterii [9,10]. Mashino i wsp. [10] zaobserwowali dwufazowe działanie dwóch izomerów położenia jodku C_{60} -bis(N,N-dimetylopirolidyniowego) na wewnętrzne błony bakterii *E. coli*. Obydwa izomery w stężeniach poniżej 5 μ M powodowały obniżenie szybkości absorpcji tlenu, natomiast dla stężeń powyżej 10 μ M absorpcja tlenu wzrastała. Aktywność analizowanych izomerów zależała od ich stężenia oraz od warunków doświadczenia, tj. obecności lub braku światła. Pomiarówoltamperometryczne potwierdziły, że dla wyższych stężeń jodku C_{60} -bis(N,N-dimetylopirolidyniowego) w układzie powstaje H_2O_2 w reakcji zredukowanej formy pochodnej fulerenu z tlenem cząsteczkowym. Dalsze prace [11] wykazały, że pochodne C_{60} podstawione długimi łańcuchami węglowodorowymi nie wykazują aktywności przeciwko badanym bakteriom.

TERAPIA FOTODYNAMICZNA

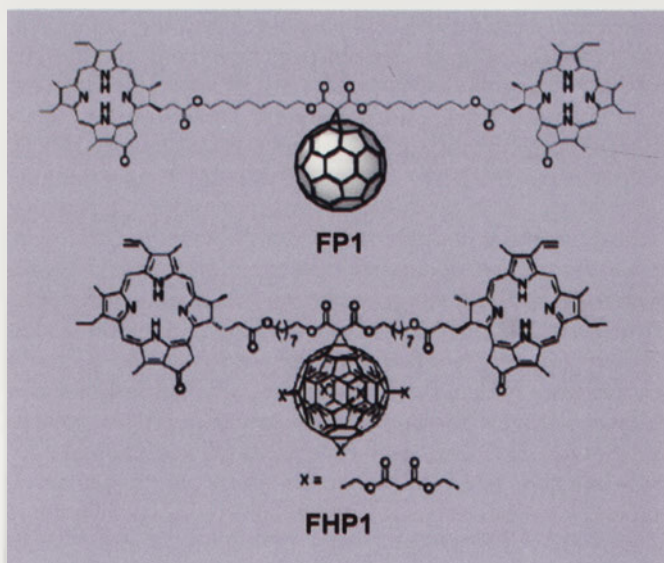
Fulereny z grupami hydrofilowymi, w tym kationowymi, są też obiecującymi kandydatami do stosowania w terapii fotodynamicznej. Wykazują większą wydajność i selektywność w zabijaniu bakterii gram-dodatnich, gram-ujemnych i grzybów niż stosowane obecnie antybiotyki [12]. Jedną z ostatnio zsyntezowanych pochodnych o wspomnianych wyżej właściwościach jest pochodna podstawiona β -cyklodekstryną [13]. Posiada zdolność do rozszczepiania DNA po napromieniowaniu światłem widzialnym w temperaturze pokojowej.

Odpowiedzialne za fototoksyczność fulerenów są reaktywne formy tlenu generowane w wyniku transferu energii lub elektronu z cząsteczki fulerenu na tlen [14]. Yamakoshi i wsp. [15] wykazali, że tlen singletowy 1O_2 powstaje podczas naświetlania światłem widzialnym roztworów C_{60} w niepolarnych rozpuszczalnikach. W rozpuszczalnikach polarnych, w tym w wodzie, produktami naświetlania C_{60} były anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot -}$) i rodnik hydroksylowy (OH). Wydajność tworzenia tych reaktywnych form tlenu była większa, gdy w roztworze znajdowały się fizjologiczne stężenia związków redukujących np. NADH. Hamano i wsp. [16], badając rozpuszczalne w wodzie pochodne C_{60} obserwowali generowanie tlenu singletowego także w roztworach wodnych.



Rycina 3. Addukt fulerenu i trzech cząsteczek kwasu malonowego (C_3).

Fulereny mogą znaleźć także zastosowanie w terapii fotodynamicznej nowotworów. Ze względu na wielkość cząsteczki są transportowane do komórki poprzez receptorniezależną endocytozę lub pinocytozę. Tworząc pochodne C_{60} , które wydajnie będą generować reaktywne formy tlenu, można, operując podstawnikami, tworzyć związki o określonej selektywności. Wielkość cząsteczki i sposób jej transportu do komórki ogranicza także maksymalne stężenie pochodnej fulerenu w komórce. Badano dwie pochodne C_{60} z pirofeoforbidem *a* i ich toksyczność dla komórek ostrej białaczki limfatycznej (Jurkat) [17]. Pirofeoforbid *a* (P1) jest fotouczulaczem, który dobrze wnika do komórek. Zsyntetyzowano mono- (FP1) i heksapochodną (FHP1) C_{60} z P1 o wzorach jak na Ryc. 4. Zaobserwowano, że w pochodnej FP1 następuje fotoindukowany transfer elektronu z reszty pirofeoforbidowej do C_{60} , i obniżenie fototoksyczności tego związku w porównaniu z pochodną FHP1 i P1. W pochodnej FHP1 obecność pięciu grup malonianu dietylu powodu-



Rycina 4. Monopochodna C_{60} z pirofeoforbidem *a* (FP1) i heksapochodna C_{60} z pirofeoforbidem *a* i malonianem dietylu (FHP1).

je zablokowanie transferu elektronu wewnątrz cząsteczki i generowanie w układzie tlenu singletowego.

Obiecujące w terapii fotodynamicznej wydają się być pochodne C_{60} z przyłączonymi dwiema do czterech cząsteczkami kwasu malonowego [18,19]. Po napromieniowaniu światłem widzialnym hamowały wzrost komórek HeLa. Toksyczność pochodnej fulereny była zależna od ilości podstawników, stężenia związku i czasu napromieniowania. Dla dipodstawionej pochodnej uzyskano 63% obniżenie wzrostu komórek przy stężeniu karboksyfulereny 40 μM [19]. Pochodne te powodowały także blokadę cyklu komórkowego HeLa, obniżając liczbę komórek w fazie G1 i podwyższając liczbę komórek w fazie G2+M cyklu komórkowego.

Wynika stąd, że nie tylko RFT są odpowiedzialne za fototoksyczność pochodnych fulerenów, ale możliwy jest udział innych mechanizmów hamowania wzrostu czy zabijania komórek. Bardzo istotna jest także wielkość i geometria pochodnej fulereny oraz możliwość kontaktu fragmentu C_{60} z obszarem mającym ulec uszkodzeniu [14,18]. Porównując fototoksyczność dendro[C_{60}]fulereny z pochodną podstawioną kwasem malonowym należałoby oczekiwać większej toksyczności po dendro[C_{60}]fulerenu, ze względu na większą wydajność kwantową tworzenia tlenu singletowego w układzie. Jednak efekty w układzie komórkowym (Jurkat) są odwrotne. Można sugerować, że fragment C_{60} , który jest bezpośrednio odpowiedzialny za transfer energii i generowanie RFT oraz obecność zbyt dużych podstawników (jak w dendro[C_{60}]fulerenu) może obniżyć efekt cytotoksyczny z powodu zbyt dużej odległości od celu w komórce [18]. Jednak nie należy zapominać, że fulereny mają także zdolność zmiatania RFT i wg. Bensasson i wsp. [20] dendro[C_{60}]fuleren reaguje z $^1\text{O}_2$ 3,5-krotnie szybciej niż pochodna z kwasem malonowym, z szybkościami reakcji rzędu 10^7 s^{-1} .

WŁAŚCIWOŚCI ANTY-HIV

Wudl i wsp. [21,22] wykazali, że proteaza HIV (HIV-P) może być skompleksowana i zahamowana przez C_{60} , który idealnie pasuje do miejsca wiążącego tego enzymu. Jednak brak rozpuszczalności C_{60} w rozpuszczalnikach polarnych, a co za tym idzie w płynach biologicznych ograniczało farmakologiczne zastosowania fulereny. W związku z tym badano pochodne C_{60} z podstawnikami polarnymi i wykazano, że dendrofulereny [23] wykazują działanie anti-HIV w limfocytach człowieka z $\text{EC}_{50} = 0,22 \mu\text{M}$ [24]. Dalsze badania wykazały, że inne dwupodstawione pochodne C_{60} również cechują się aktywnością antywirusową. Rajagopalan i wsp. [25] wykazali, że pochodna bis-sukcynoimido p,p'-bis-(2-amino-etylo)-difenylo- C_{60} wykazuje działanie przeciwko wirusom HIV-1 i HIV-2 w badaniach *in vitro*. Ponadto, związek ten jest dobrze tolerowany przez myszy po podaniu dootrzewnowym. Jednak istotne są: wzajemne położenie podstawników, obecność dodatniego ładunku w pobliżu „węglowej piłki” oraz wielkość podstawników. Długie, polarne łańcuchy podstawione do fulereny powodują znaczną cytotoksyczność związku i obniżenie zdolności niszczenia wirusa HIV. Marchesan i wsp. [26] zaproponowali kilka dwupodstawionych pirolidynofulerenów różniących się geometrią cząsteczki i na podstawie aktywności antywiru-

sowej w zainfekowanych wirusami HIV-1(IIIB) lub HIV-2(ROD) limfocytach człowieka ocenili, że sole amoniowe izomerów trans wykazują silne działanie antywirusowe w nanomolarnych stężeniach. Natomiast izomer cis i forma z wiązaniami ekwatorialnymi były odpowiednio mało aktywne lub całkowicie nieaktywne w kierunku HIV.

WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNE

Reaktywne formy tlenu, między innymi: nadtlutki, anionorodnik ponadtlutkowy ($\text{O}_2^{\cdot -}$) i rodnik hydroksylowy (OH) są odpowiedzialne za uszkodzenia struktur komórkowych prowadzące w efekcie do śmierci komórki. Istnieje wiele czynników generujących w komórkach stres oksydacyjny, którego wynikiem jest podwyższony poziom reaktywnych formy tlenu w komórkach i tkankach. Należą do nich: promieniowanie UV, promieniowanie jonizujące, ksenobiotyki, zwiększony wysiłek fizyczny. W etiologii wielu chorób, np. neurodegeneracyjnych, jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, wskazuje się na udział RFT. Rodniki tlenowe odpowiedzialne są również za procesy starzenia. Znalezienie skutecznych zmiataczy RFT w warunkach *in vivo* może pomóc zmniejszyć lub wyeliminować skutki podwyższonego stężenia reaktywnych form tlenu [27].

Pochodne fulerenów rozpuszczalne w wodzie, np. fulerole (polihydroksyfulereny) [$C_{60}(\text{OH})_n$], karboksyfulereny, PEG-fulereny (fuleren modyfikowany glikolem polietylenowym) lub PVP-fulereny (cząsteczki C_{60} opłaszczane poliwinylpirolidonem) są skutecznymi zmiataczami wolnych rodników generowanych w warunkach stresu oksydacyjnego w komórkach. Na tyle skutecznymi, że nazwano je „gąbkami rodnikowymi” (radical sponge) [28,29]. Nazwę „Radical Sponge[®]” zarezerwowano nawet dla pochodnej powstałej przez opłaszczenie C_{60} przez poliwinylpirolidon o masie cząsteczkowej 60-80 kDa w stosunku molowym 0,42-0,67:1. Powstaje w ten sposób rozpuszczalny w wodzie związek ze średnim przekrojem cząsteczki około 688 nm [29].

PVP-, gamma-cyklodekstryno- i hydroksy-fulereny wykazywały silne działanie antyoksydacyjne w keratynocytach skóry człowieka (HaCaT) poddanych działaniu UVB [30]. Oceny dokonano metodą fluorescencyjną na podstawie testu z dioctanem karboksydychlorofluoresceiny, który ocenia ogólny poziom stresu oksydacyjnego w układzie. Zaobserwowano także ochronne właściwości pochodnych fulerenów, gdy stres oksydacyjny inicjowano za pomocą t-BuOOH. Zaobserwowanie tych właściwości sugeruje możliwość dyfuzji rozpuszczalnych w wodzie pochodnych fulerenów w poprzek błon komórkowych. Ponadto, zaobserwowano ochronne działanie pochodnych C_{60} w inicjowanej przez t-BuOOH podobnej do apoptozy śmierci keratynocytów skóry człowieka.

W układzie chemicznym, gdy rodniki hydroksylowe generowano w reakcji Fentona, a anionorodniki ponadtlutkowe enzymatycznie przez układ ksantyna-oksydaza ksantynowa, badania prowadzone metodą EPR wykazały skuteczność PEG-, hydroksy-, izostearyniano-fulerenów większą lub porównywalną z kwasem askorbinowym lub jego 2-O-fosforylowaną pochodną [29,30].

Fulerole ($C_{60}(OH)_n$, $n=18-22$) okazały się także skutecznymi zmiataczami rodników generowanych radiacyjnie [31]. Dodanie fulerolu do komórek *Stylonychia mytilus* chroniło je przed promieniowaniem gamma z ^{60}Co aż do dawki 1500 Gy. Poziom ochrony był zależny od stężenia fulerolu w zawieszynie komórek i maksymalny osiągnięto dla 0,10 mg/ml. Jednak podniesienie stężenia do 0,25 mg/ml powodowało zmniejszenie przeżywalności komórek w stosunku do kontroli napromieniowanej dawką 500 Gy.

Fulereeny mogą chronić nie tylko przed reaktywnymi formami tlenu. Wykazano, że fulerole bezpośrednio reagują z tlenkiem azotu NO [32]. Fuleroł $C_{60}(OH)_{24}$ chronił bezjądrzaste komórki śródmiaższowe jądra dorosłych szczurów przed reaktywnymi formami azotu. Hamował wywołwane przez NO obniżenie aktywności katalazy, transferazy glutationowej i peroksydazy glutationowej.

Czy „pochłanianie” rodników jak gąbka to jedyny mechanizm działania fulerenów jako zmiataczy wolnych rodników? Istnieją wyniki, które potwierdzają, że niektóre pochodne fulerenów mogą naśladować enzymy. Pochodna C_{60} z trzema cząsteczkami kwasu malonowego (C_3) wykazuje aktywność manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD) w warunkach *in vitro* i *in vivo* [33]. Reakcja pomiędzy $O_2^{\cdot -}$ a C_3 nie zachodzi bezpośrednio [20], ale poprzez katalityczną dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego. Podanie C_3 myszom SOD2^{-/-}, z niedoborem mitochondrialnej MnSOD, powodowało 3-krotne wydłużenie długości ich życia. Badania immunocytochemiczne potwierdziły, że C_3 lokuje się w mitochondriach. Można więc przypuszczać, że efektywne naśladowanie działania SOD jest kolejną cechą tego wielofunkcyjnego związku.

Gharbi i wsp. [34] donoszą, że nie tylko rozpuszczalne w wodzie pochodne, ale wodna zawieszina C_{60} (cząstki o średnicach od 60 do 1650 nm) podawana dootrzewnowo szczurom chroniła ich wątroby przed wolnorodnikowym uszkodzeniem indukowanym czterochlorkiem węgla (tetrachlorometanem). Autorzy ci sugerują, że wcześniejsze doniesienia o toksyczności wodnych zawieszin C_{60} na komórki [5,6] wiążą się ze sposobem przygotowania zawieszin i możliwością adsorpcji rozpuszczalników organicznych użytych do wstępnego przygotowania nano- C_{60} na powierzchni „węglowej piłki”. Brak toksyczności C_{60} zawartego w sadzy fulerenu zawierającej do 15% C_{60} zaobserwowali także polscy naukowcy Huczko i wsp. [35], którzy badali wpływ wodnej zawiesziny sadzy fulerenu na skórę człowieka w kierunku wywołania reakcji alergicznych.

PODSUMOWANIE

Fulereeny wydają się być bardzo obiecującą klasą związków mogących spełniać wiele funkcji biologicznych w zależności od jakości i ilości podstawników, wielkości cząsteczki, sposobu przygotowania zawieszin lub roztworów, zastosowanego stężenia związku. Jednak mnogość tych funkcji zmusza także do brania pod uwagę, czasami przeciwnego ich działania, szczególnie w warunkach *in vivo*. Wymaga to dalszych badań i prac uwzględniających różne warunki prowadzenia reakcji.

PIŚMIENNICTWO


1. Aldersey-Williams H (1997) Najpiękniejsza molekula, Wydawnictwo Amber, Warszawa
2. Huczko A (2000) Fulereeny, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
3. Fortner JD, Lyon DY, Sayes CM, Boyd AM, Falkner JC, Hotze EM, Alemany LB, Tao YJ, Guo W, Ausman KD, Colvin VL, Hughes JB (2005) C_{60} in water: nanocrystal formation and microbial response. *Environ Sci Technol* 39: 4307-4316
4. Lyon DY, Fortner JD, Sayes CM, Colvin VL, Hughe JB (2005) Bacterial cell association and antimicrobial activity of a C_{60} water suspension. *Environ Toxicol Chem* 24: 2757-2762
5. Sayes CM, Fortner JD, Guo W, Lyon D, Boyd AM, Ausman KD, Tao YJ, Sitharaman B, Wilson LJ, Hughes JB, West JL, Colvin VL (2004) The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Lett* 4: 1881-1887
6. Sayes CM, Gobin AM, Ausman KD, Mendez J, West JL, Colvin VL (2005) Nano- C_{60} cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials* 26: 7587-7595
7. Tsao N, Luh TY, Chou CK, Chang TY, Wu JJ, Liu CC, Lei HY (2002) In vitro action of carboxyfullerene. *J Antimicrob Chemother* 49: 641-649
8. Tsao N, Luh TY, Chou CK, Wu JJ, Lin YS, Lei HY (2001) Inhibition of group A streptococcus infection by carboxyfullerene. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1788-1793
9. Mashino T, Okuda K, Hirota T, Hirobe M, Nagano T, Mochizuki M (1999) Inhibition of *E. Coli* growth by fullerene derivatives and inhibition mechanism. *Bioorg Med Chem Lett* 9: 2959-2962
10. Mashino T, Usui N, Okuda K, Hirota T, Mochizuki M (2003) Respiratory chain inhibition by fullerene derivatives: hydrogen peroxide production caused by fullerene derivatives and a respiratory chain system. *Bioorg Med Chem* 11: 1433-1438
11. Mashino T, Nishikawa D, Takahashi K, Usui N, Yamori T, Seki M, Endo T, Mochizuki M (2003) Antibacterial and antiproliferative activity of cationic fullerene derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 13: 4395-4397
12. Tegos GP, Demidova TN, Arcila-Lopez D, Lee H, Wharton T, Gali H, Hamblin MR (2005) Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers. *Chem Biol* 12: 1127-1135
13. Liu Y, Zhao YL, Chen Y, Liang P, Li L (2005) A water-soluble β -cyclodextrin derivative possessing a fullerene tether as an efficient photo-driven DNA-cleavage reagent. *Tetrahedron Lett* 46: 2507-2511
14. Guldi DM, Prato M (2000) Excited-state properties of C_{60} fullerene derivatives. *Acc Chem Res* 33: 695-703
15. Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, Arakane K, Miyata N, Goda Y, Masumizu T, Nagano T (2003) Active oxygen species generated from photoexcited fullerene C_{60} as potential medicines: $O_2^{\cdot -}$ versus 1O_2 . *J Am Chem Soc* 125: 12803-12809
16. Hamano T, Okuda K, Mashino T, Hirobe M, Arakane K, Ryu A, Mashiko S, Nagano T (1997) Singlet oxygen production from fullerene derivatives: effect of sequential functionalization of the fullerene core. *Chem Commun* 1: 21-22
17. Rancan F, Helmreich M, Moelich A, Jux N, Hirsch A, Roeder B, Witt C, Boehm F (2005) Fullerene-pyropheophorbide a complexes as sensitizer for photodynamic therapy: Uptake and photo-induced cytotoxicity on Jurkat cells. *J Photochem Photobiol B* 80: 1-7
18. Rancan F, Rosan S, Boehm F, Cantrell A, Brellreich M, Schoenberger H, Hirsch A, Moussa F (2002) Cytotoxicity and photocytotoxicity of a dendritic C_{60} mono-adduct and a malonic acid C_{60} tris-adduct on Jurkat cells. *J Photochem Photobiol B* 67: 157-162
19. Yang XL, Fan CH, Zhu HS (2002) Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C60]fullerene derivatives and its mechanism. *Toxicology in Vitro* 16: 41-46
20. Bensasson RV, Brettreich M, Frederiksen J, Gottinger H, Hirsch A, Land EJ, Leach S, McGarvey DJ, Schonberger H (2000) Reactions of e_{aq}^- , $CO_2^{\cdot -}$, HO^{\cdot} , $O_2^{\cdot -}$ and $O_2(^1\Delta_g)$ with a dendro[C60]fullerene and $C_{60}[C(COOH)_2]_n$ ($n = 2-6$). *Free Radic Biol Med* 29: 26-33

21. Sijbesma R, Srdanov G, Wudl F, Castoro JA, Wilkins C, Friedman SH, DeCamp DL, Kenyon GL, (1993) Synthesis of a fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes. *J Am Chem Soc* 115: 6510-6512
22. Friedman SH, DeCamp DL, Sijbesma RP, Srdanov G, Wudl F, Kenyon GL (1993) Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: model building studies and experimental verification. *J Am Chem Soc* 115: 6506-6509
23. Brettreich M, Hirsch A (1998) A highly water-soluble dendro[60]fullerene. *Tetrahedron Lett* 39: 2731-2734
24. Schuster DI, Wilson LJ, Kirschner AN, Schinazi RF, Schlueter-Wirtz S, Tharnish P, Barnett T, Ermolieff J, Tang J, Brettreich M, Hirsch A (2000) Evaluation of the anti-HIV potency of a water-soluble dendrimeric fullerene. *Proc Electrochem Soc PV2000-9*: 267-270
25. Rajagopalan P, Wudl F, Schinazi RF, Boudinot FD (1996) Pharmacokinetics of a water-soluble fullerene in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2262-2265
26. Marchesan S, Da Ros T, Spalluto G, Balzarini J, Prato M (2005) Anti-HIV properties of cationic fullerene derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 3615-3618
27. Bartosz G (2003) *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wyd. II zmienione*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
28. Bosi S, Da Ros T, Spalluto G, Prato M (2003) Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *Eur J Med Chem* 38: 913-923
29. Xiao L, Takada H, Gan XH, Miwa N (2006) The water-soluble fullerene derivative 'Radical Sponge®' exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 1590-1595
30. Xiao L, Takada H, Maeda K, Haramoto M, Miwa N (2005) Antioxidant effects of water-soluble fullerene derivatives against ultraviolet ray or peroxy lipid through their action of scavenging the reactive oxygen species in human skin keratinocytes. *Biomed Pharmacother* 59: 351-358
31. Zhao Q, Li Y, Xu J, Liu R, Li W (2005) Radioprotection by fullerenols of *Stylyonchia mytilus* exposed to γ -rays. *Int J Radiat Biol* 81: 169-175
32. Mirkov SM, Djordjevic AN, Andric NL, Andric SA, Kostic TS, Bogdanovic GM, Vojinovic-Miloradov MB, Kovacevic RZ (2004) Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fullereneol, $C_{60}(OH)_{24}$. *Nitric Oxide* 11: 201-207
33. Ali SS, Hardt JI, Quick KL, Kim-Han JS, Erlanger BF, Huang T, Epstein CJ, Dugan LL (2004) A biologically effective fullerene (C_{60}) derivative with superoxide dismutase mimetic properties. *Free Rad Biol Med* 37: 1191-1202
34. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F (2005) [60]Fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett* 5: 2578-2585
35. Huczko A, Lange H, Calko E (1999) Fullerenes: experimental evidence for a null risk of skin irritation and allergy. *Full Sci Techn* 7: 935-939

Fullerenes in biology

Anita Krokosz 

Department of Molecular Biophysics, University of Lodz, 12/16 Banacha Str., 90-237 Lodz, Poland

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

Key words: fullerenes, antioxidants, toxicity, antiviral properties, photosensitizers

ABSTRACT

Fullerenes are chemical structures made of carbon atoms. The stable form is molecule composed of 60 carbon atoms arranged in a soccer ball-shaped structure. With respect to its electron donor and acceptor capability and photochemical behavior fullerenes can be effective antioxidants and radical scavengers or prooxidants and photosensitizers. These properties of fullerenes have paid attention on their possible biological applications. Results of previous studies point to the great dependance of fullerenes activity upon quality, quantity and geometry of substituents in fullerene derivatives. Some of fullerene derivatives show antiviral and antimicrobial activity, including anti-HIV properties. C_{60} and its derivatives are able to exhibit cytotoxic and enzyme-inhibiting abilities as well as radical-quenching and antioxidative abilities. Generation of reactive oxygen species under influence of visible light is another ability of fullerene derivatives desired in photodynamic therapy.

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

Tabele winny być opatrzone jednoznacznym tytułem i ewentualnie także niezbędnymi objaśnieniami umieszczonymi pod tabelą. Wielkość tabel powinna być dostosowana do szerokości jednego 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

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

Sławomir Pikula

redaktor naczelny kwartalnika „Postępy Biochemii”

**Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa**

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



O: TAK DWA SKANERY LASEROWE

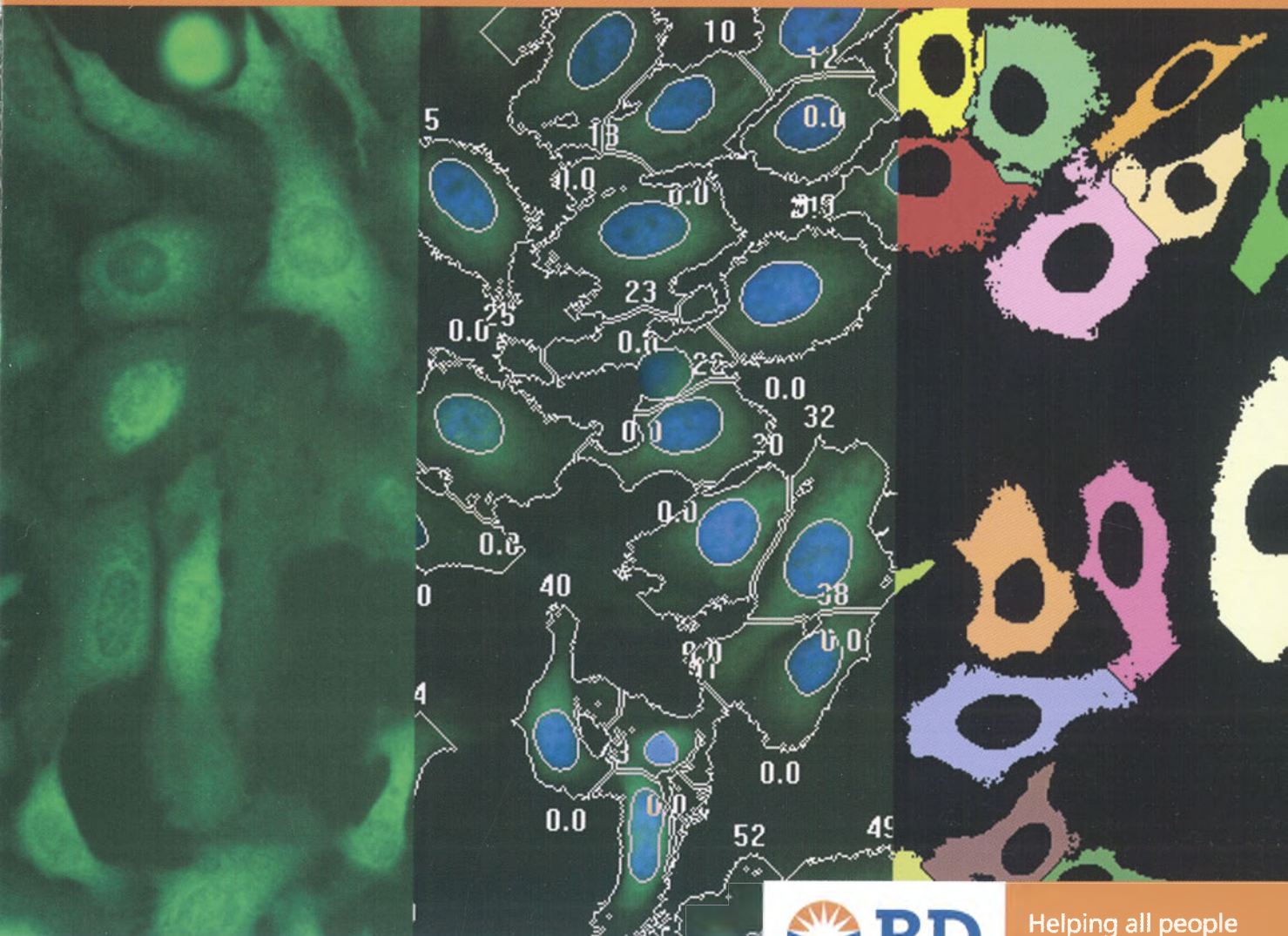
Odpowiedź jest prosta: nowy mikroskop konfokalny Olympus FluoView FV1000 pracuje z dwoma skanerami, a nie jak inne podobne systemy, tylko z jednym. Wprowadzenie dodatkowego skanera stwarza zupełnie nowe możliwości w analizie żywych komórek, rozwiązuje problem utraty danych podczas rejestracji procesów. 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 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



Optymalizuj swoje wyniki

Nowość: Zestawy BD™ Calcium Assay



Helping all people
live healthy lives

Kombinacja Dająca Sukces

- Nowość: Zestawy BD™ Calcium i PBX Calcium Assay: Zwiększony stosunek sygnału do tła w porównaniu do metod standardowych.
- BD ACTOne™ cAMP Assay: Stabilnie transfekowane komórki HEK293 posiadające ekspresję opatentowanego biosensora typu CNG (cyclic nucleotide-gated) i receptorów GPCR połączonych z białkiem Gs lub Gi.
- BD Falcon™ i BD BioCoat™ Viewing Plates do Oznaczeń Fluorescencyjnych: Wybór przygotowanych do hodowli i gotowych do użycia, biologicznie pokrytych powierzchni wzmacniających przyleganie komórek, ich rozprzestrzenianie i wzrost.

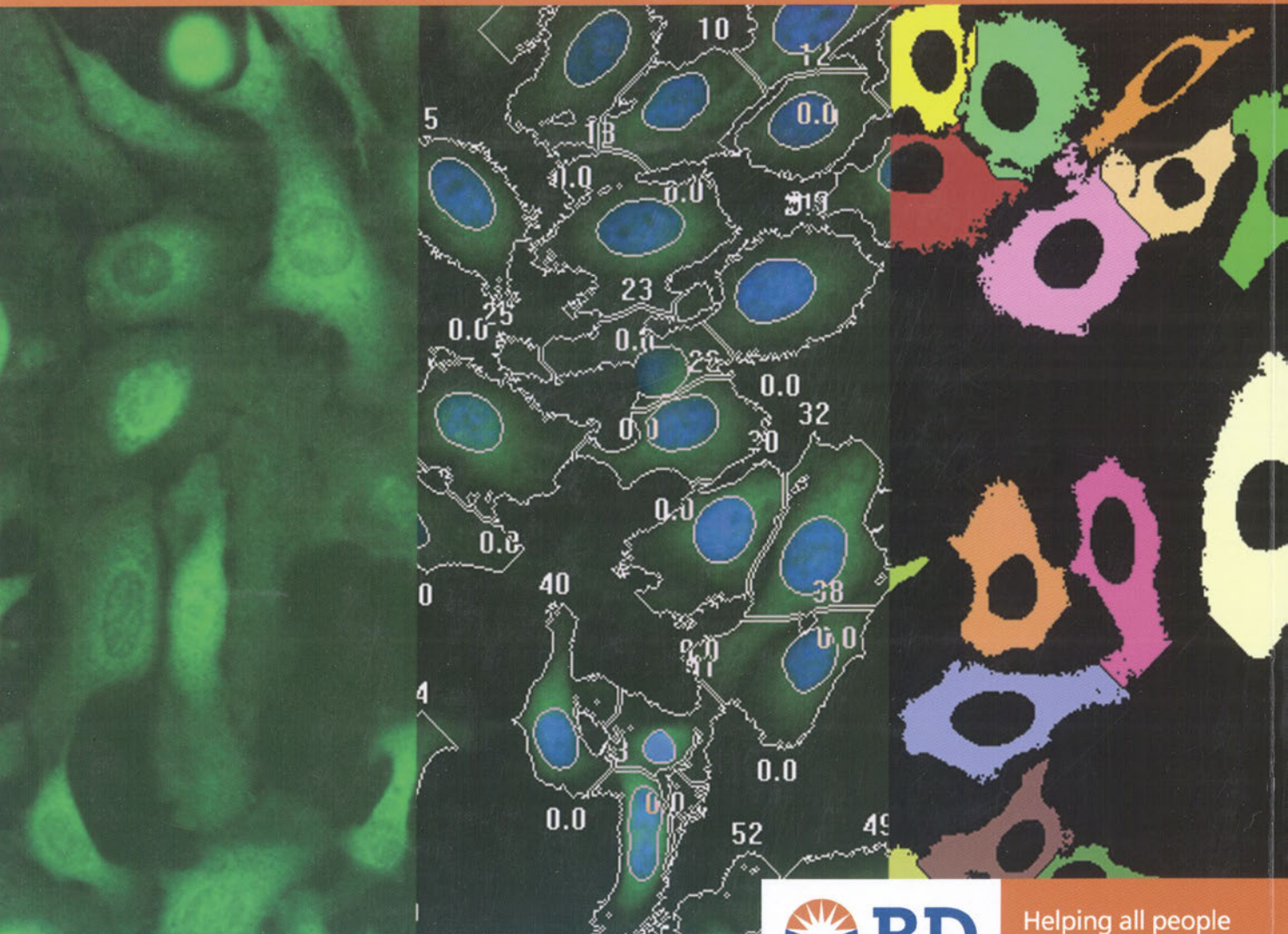
Skontaktuj się z nami aby dowiedzieć się więcej o optymalizacji oznaczeń!

BD Biosciences

Becton Dickinson Polska Sp.z o.o.
ul. Królowej Marysieńki 90,
02-954 Warszawa
tel.: +48 22 651 75 88
faks: +48 22 651 75 89
www.bdbeurope.com

BD Pathway HT™ Bioimager

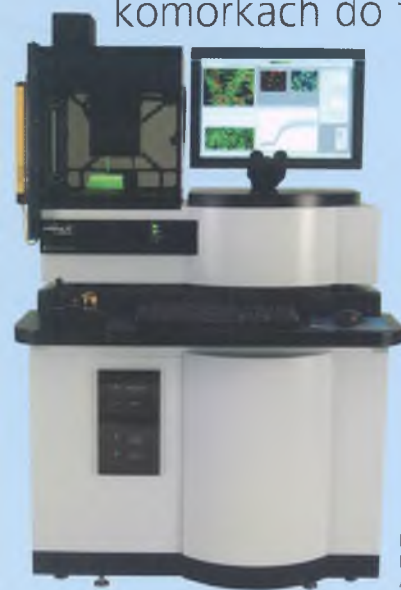
Badania Żywych Komórek Za Pomocą Automatycznego Obrazowania Konfokalnego



BD

Helping all people
live healthy lives

Szybko rozwijane metody oparte na komórkach do tworzenia nowych leków i badań podstawowych



- Pokrycie pełnego spektrum z użyciem 16 filtrów wzbudzenia i 8 filtrów w torze emisji
- Autofokus i automatyczna identyfikacja śledzenia komórki
- Przelączenie pomiędzy trybem konfokalnym i szerokim polem
- Zintegrowana kontrola temperatury i CO₂
- Możliwość obrazowania zarówno komórek jak i tkanek
- Możliwość bezpośredniego oglądania próbki jak w mikroskopie
- Pomiar kinetyki lub punktu końcowego

Skontaktuj się z nami po więcej informacji!

BD Biosciences

Becton Dickinson Polska Sp.z o.o.
ul. Królowej Marysieńki 90,
02-954 Warszawa
tel.: +48 22 651 75 88
faks: +48 22 651 75 89
www.bdbeurope.com