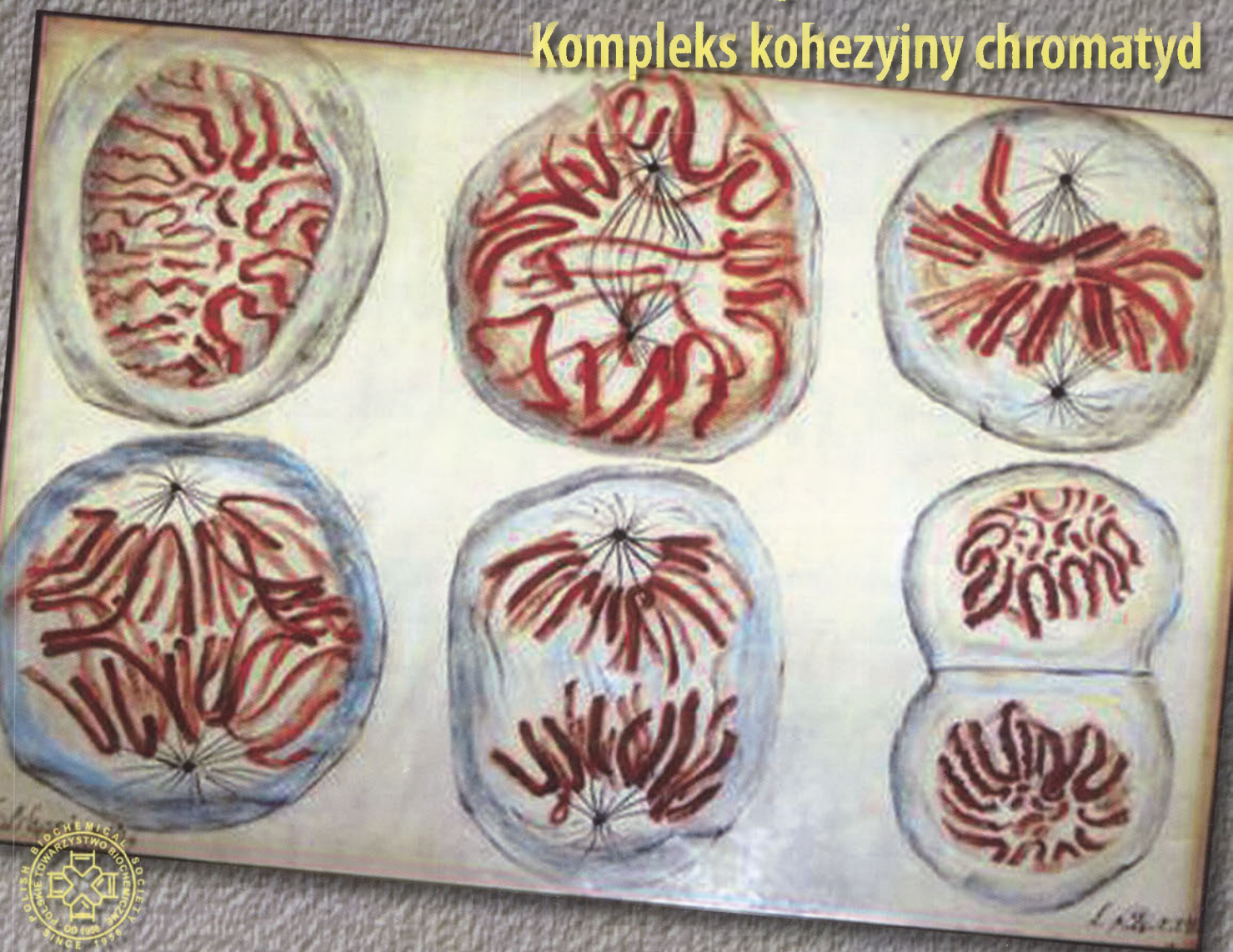


POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2010
TOM 56
NUMER 1

Mitoza i cytokineza
Metylacja i demetylacja DNA
Hint1-supresor nowotworów
Kompleks kohezyny chromatyd

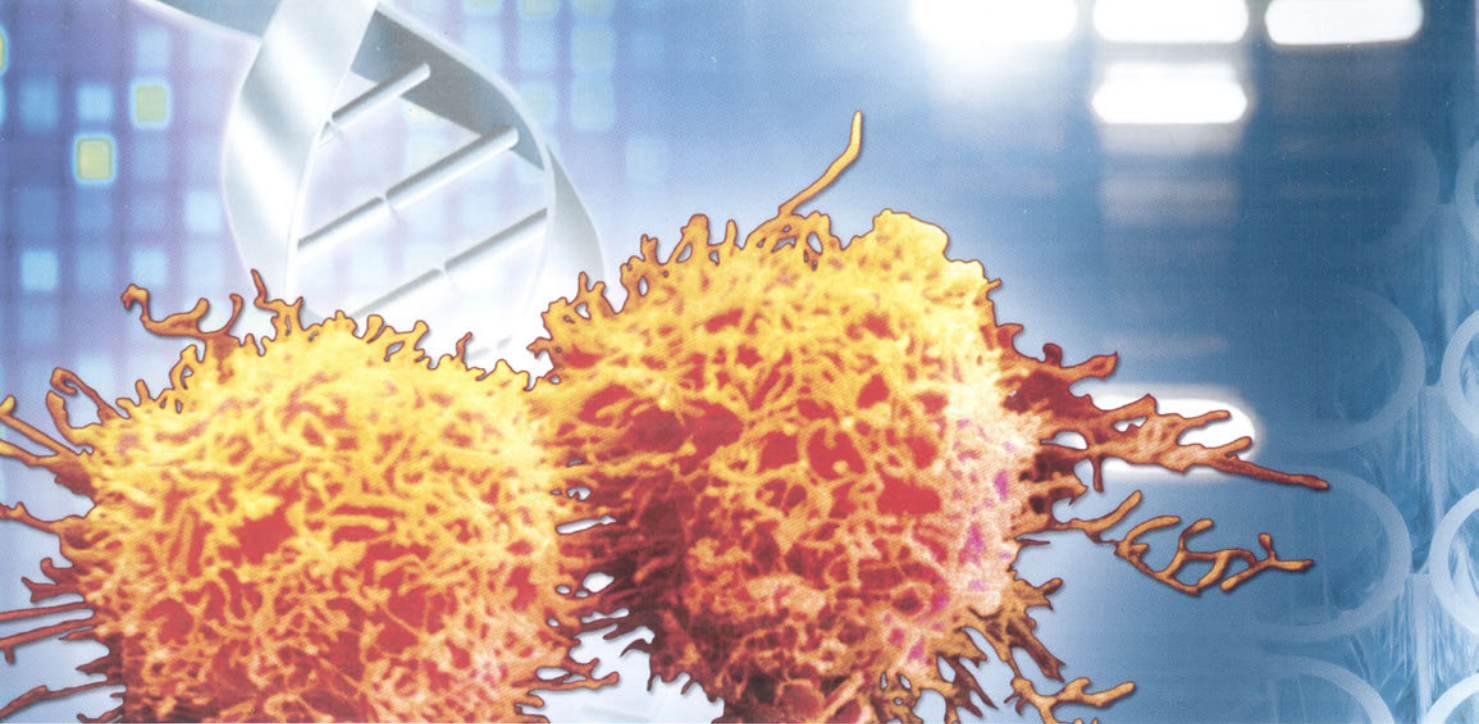


PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

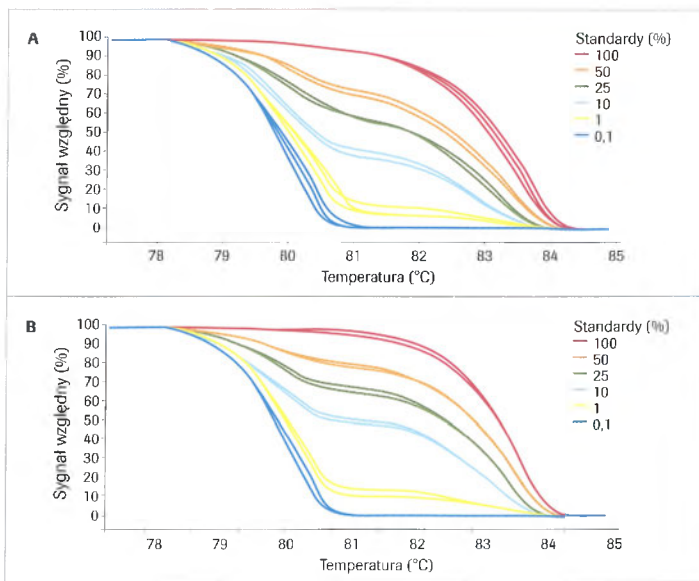
www.postepybiochemii.pl

<http://rcin.org.pl>



Badania nad rakiem

Analiza metylacji DNA w obrębie całego genomu oraz w miejscach docelowych



Powtarzalne wykrywanie metylowanego DNA na poziomie 1% względem tła, jakie stanowi niemetylowane DNA, z zastosowaniem techniki HRM (High Resolution Melting) dla genu metylotransferazy O6-metyloguaniny DNA (A) oraz dla genu supresorowego APC (adenomatous polyposis coli) (B).

Standardy zastosowane przy wykrywaniu metylacji zostały oznaczone w trzech powtórzeniach. Dla uzyskania dokładnych informacji, prosimy zapoznać się z doniesieniem aplikacyjnym nr 3 (Cancer Research Application Note No. 3) na stronie internetowej www.cancer-research.roche.com

Dane uzyskane dzięki uprzejmości M. Balic, Oddział Onkologiczny, Uniwersytet Medyczny w Grazu, Austria.

Tylko do celów naukowych.

Nie stosować jako procedura diagnostyczna.

FASTSTART, HRM, LIGHTCYCLER i Nimblegen są znakami towarowymi firmy Roche. Pozostałe marki i nazwy produktów są znakami towarowymi ich poszczególnych właścicieli.
© 2010 Roche Diagnostics GmbH. Wszystkie prawa zastrzeżone

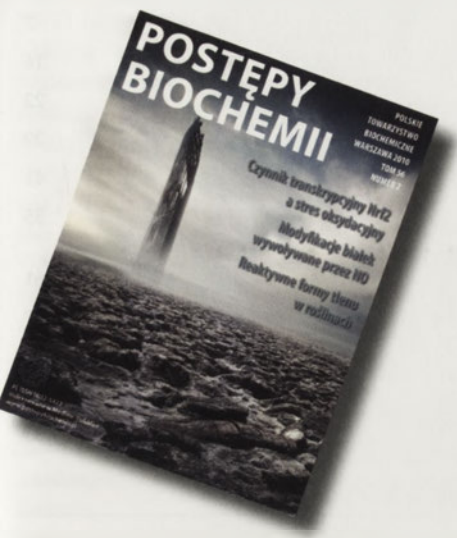
Wyjaśnianie mechanizmu przeprogramowania epigenetycznego obserwowanego w komórkach nowotworowych przy użyciu elastycznych i dopasowywanych do potrzeb rozwiązań do analizy metylacji DNA

- **Pewne i precyzyjne oznaczenie metylacji regionów DNA w odpowiednich wyspach CpG i promotorach** uzyskane z zastosowaniem mikromacierzy NimbleGen.
- **Czuła i ekonomiczna metoda określenia poziomu metylacji** poprzez zastosowanie jednorodnej analizy HRM w systemie LightCycler® 480 wykorzystującym technologię PCR w czasie rzeczywistym.
- **Dokładna analiza metylacji** przy zastosowaniu wygodnych w użyciu i bardzo precyzyjnych polimeraz FastStart w reakcji PCR.

Zapraszamy do odwiedzenia naszej strony internetowej www.cancer-research.roche.com dla uzyskania szczegółowych informacji o produkcie oraz w celu zapoznania się z doniesieniami aplikacyjnymi dotyczącymi zastosowania produktów Roche Applied Science do badań nad rakiem.

Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.
ul. Wybrzeże Gdyńskie 6 B
01-531 Warszawa
Tel. 22 481 55 61, -55
biologia.molekularna@roche.com
www.roche.pl





W NASTĘPNYM NUMERZE:

Stres oksydacyjny
 Numer specjalny pod redakcją
 Grzegorza Bartosza.

W numerze m.in.:

Rola czynnika transkrypcyjnego
 Nrf2 w odpowiedzi komórkowej na
 stres oksydacyjny

Nowe oblicza czynników
 indukowanych przez hipoksję:
 HIF-1 i HIF-2 a stres oksydacyjny

Modyfikacje strukturalne białek
 wywoływane przez tlenek azotu

Reaktywne formy tlenu w
 roślinach: powstawanie, degradacja
 i rola w przekazywaniu sygnału

Zdjęcie na okładce:

Stanisław Wyspiański, cykl rycin "Komórka w podwojeniu". Rycinę opublikowano za zgodą Jego Magnificencji Prorektora Uniwersytetu Jagiellońskiego ds. badań i współpracy międzynarodowej, prof. dr hab. Szczepana Bilińskiego oraz za zgodą Dyrektora Muzeum UJ, prof. dr hab. Stanisława Waltosia. Rycina nawiązuje do artykułu „Dynamika mitozy i cytokinezy symetrycznej i asymetrycznej” opublikowanego w bieżącym numerze Postępów Biochemii. Więcej informacji na temat okoliczności powstania ryciny można znaleźć pod adresem:
<http://ptbk.mol.uj.edu.pl/strona.php?t=KOMRKA-W-PODWOJENIU&p=29>

Wiadomości krajowe pod red. Teresy Wesolowskiej	1
ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE	
Mechanizm metylacji i demetylacji DNA – znaczenie w kontroli ekspresji genów Jolanta Guz, Marek Foksiński, Ryszard Oliński	7
Globalna hipometylacja DNA – znaczenie w procesie kancerogenezy Jolanta Guz, Marek Foksiński, Ryszard Oliński	16
Glikozylazy [4Fe-4S] i przenoszenie ładunku w DNA Hanna Lewandowska-Siwkiewicz, Sylwia Męczyńska-Wielgosz	22
Dynamika mitozy i cytokinezy symetrycznej i asymetrycznej Janina Kaczanowska, Andrzej Kaczanowski	29
Kompleks kohezyjny chromatyd siostrzanych u <i>Eukaryota</i> Agata Cena, Anna Kurlandzka	41
HINT1 – nowy supresor nowotworów w rodzinie białek HIT Magdalena Ozga	55
Wpływ fosforylasy tymidynowej (plytkopochodnego czynnika wzrostu komórek śródbłonna) na angiogenezę guzów. Inhibitory aktywności katalitycznej enzymu Elżbieta Miszczak-Zaborska, Monika Smolarek, Jacek Bartkowiak	61
Czynniki kontaktu układu hemostazy – badanie ewolucji molekularnej oraz nowe perspektywy terapeutyczne Michał Błażej Ponczek	67
Białka z rodziny p24 – regulatory transportu pecherzykowego Joanna Kamińska, Marta Hoffman-Sommer, Michał Płachta	75
Szok termiczny a podatność organizmów na zakażenie i stres osmotyczny Iwona Wojda	83
Zastosowania U-Tube™ oraz D-Tube™ w zagęszczaniu białek Monika Żochowska	95

Events/Opinions/Comments	1
REVIEWS	
Mechanism of DNA methylation and demethylation – its role in control of genes expression	7
Global DNA hipometylation – the meaning in carcinogenesis	16
Glycosylases [4Fe-4S] and the charge transfer in DNA	22
Dynamics of asymmetric and symmetric mitosis and cytokinesis	29
Sister chromatid cohesion complex in <i>Eukaryota</i>	41
HINT1 – a novel tumor suppressor protein of the HIT superfamily	55
Influence of the thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) on tumor angiogenesis. Catalytic activity of enzyme inhibitors	61
The contact factors of hemostasis – examination of molecular evolution and new therapeutic perspectives	67
The p24 family proteins – regulators of vesicular trafficking	75
Heat shock and the susceptibility of organisms to infection and osmotic challenge	83
Practical application of U-Tube™ and D-Tube™ for protein concentration	95

V edycja konkursu na najlepszą pracę doktorską z biochemii w 2009 roku

Polskie Towarzystwo Biochemiczne i firma Merck Sp. z o.o. ogłaszają piątą edycję konkursu na najlepszą pracę doktorską z biochemii wykonaną w polskiej instytucji naukowej. Warunkiem uczestnictwa jest przyznanie autorowi pracy tytułu doktora przez właściwą radę naukową lub radę wydziału w 2009 roku. Nagroda obejmuje premię pieniężną dla autora w wysokości 4 500 zł, ufundowaną przez firmę Merck, oraz opublikowanie też doktoratu w 4 numerze kwartalnika „Postępy Biochemii” w 2010 roku. Nagrodę przyznaje Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w porozumieniu z firmą Merck. Zgłoszenia kandydatów do Nagrody mogą dokonywać pracownicy naukowcy ze stopniem doktora habilitowanego lub tytułem profesora.

Zgłoszenia w formie listu przewodniego wraz z pracą doktorską w formacie pdf należy przesłać **w nieprzekraczalnym terminie do 31 maja 2010 roku** tylko drogą elektroniczną na adres:

j.redowicz@nencki.gov.pl

Rozstrzygnięcie konkursu nastąpi do 31 sierpnia 2010 roku, a uroczyste wręczenie Nagrody odbędzie się na dorocznym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego we wrześniu 2010 roku.

Patronat medialny nad konkursem sprawuje redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”. Pytania dotyczące konkursu można uzyskać kierując je pod następujący adres poczty elektronicznej: j.redowicz@nencki.gov.pl.

M. Jolanta Rędownicz
Sekretarz Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII

OLYMPUS

Your Vision, Our Future



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

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

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

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

Korekta językowa: Marta Magdalena Izdebska-Książek; marta.izdebska@gmail.com

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

Wydawca: Polskie Towarzystwo Biochemiczne; ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, tel/fax (22) 5892499, e-mail: ptbioch@nencki.gov.pl, <http://www.ptbioch.edu.pl>

Kwartalnik „Postępy Biochemii” jest wydawany z pomocą finansową Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego,

„Postępy Biochemii” są indeksowane w Medline, IndexCopernicus i Agrolibrex. Nakład 1000 egz.

XIII konferencja „Gliwickie Spotkania Naukowe 2009”. W dniach 20-21 listopada 2009 roku odbyła się kolejna edycja Gliwickich Spotkań Naukowych (Fot. 1). Tegoroczna konferencja, poświęcona tematyce genetycznych, molekularnych i środowiskowych uwarunkowań powstawania nowotworów oraz ich terapii była już trzynastą w cyklu rozpoczętym w 1997 roku. W konferencji uczestniczyło 180 osób, w tym 23 osoby z zagranicy. Problematyka naukowa konferencji dotyczyła badań molekularnych w epidemiologii nowotworów, genomiki funkcjonalnej w badaniach nowotworowych, efektu sąsiedztwa i jego zastosowania w radioterapii nowotworów oraz udziału białek transportujących jony (kanałów jonowych) w procesach nowotworowych. Program konferencji obejmował 32 referaty zgrupowane w czterech sesjach.



Fot. 1. Miejsce obrad Gliwickich Spotkań Naukowych 2009.

W sesji I „Molecular Epidemiology of Cancer”, omówiono wyniki badań genotypowania mające na celu określenie roli polimorfizmu pojedynczych lub wielu mutacji pojedynczych zasad (SNP) w nowotworach dziedzicznych (Kari Hemminki), zaprezentowano metody analizy wielu mutacji (w tym SNP) prowadzących do zachorowalności na dziedziczne nowotwory piersi (Ute Hamann), scharakteryzowano zależność występowania mutacji niektórych genów z czasem przeżycia pacjentek chorych na raka piersi (Asta Försti). Referat Ewy Grzybowskiej dotyczył molekularnej epidemiologii dziedzicznych raków piersi i jajnika na Śląsku i klinicznych implikacji wynikających z istnienia polimorficznych alleli ge-

nów BRCA oraz PGR i MDR1. Wpływ ciąży na ryzyko rozwoju raków piersi i jajnika, z uwzględnieniem zmian stężenia hormonów (gonadotropina łożyska, estrogeny, progesteron, testosteron, SHBG i IGF-1) okazał się szczególnie ważny w pierwszym trymestrze ciąży, zwłaszcza u kobiet powyżej 30 roku życia (Annekatrin Lukanova). Rola SNP w podatności na raka płuc i rola biomarkerów związanych z genami naprawy DNA jako czynników prognostycznych zostały zaprezentowane przez Dorotę Butkiewicz. Porównanie częstości występowania polimorfizmu SNP z zapadalnością na agresywną formę raka prostaty, piersi (związek z występowaniem receptora estrogenowego) oraz trzustki na dużej grupie chorych (14 000 przypadków) pozwoliło na wyodrębnienie niektórych charakterystycznych polimorfizmów obserwowanych w tych trzech różnych rodzajach raka (Federico Canzian). Ostatni referat sesji poświęcony był poszukiwaniu markerów podatności oraz markerów prognostycznych dla nowotworów gardła przy wykorzystaniu metody porównawczej hybrydyzacji genomu (CGH). Stwierdzono występowanie amplifikacji lub delecji odpowiednio w onkogenach i genach supresorowych i powiązано je w niektórych przypadkach z progresją raka gardła (Krzysztof Szyfter).

Sesja II „Functional Genomics in Cancer Research” poświęcona była przeszukiwaniom aktywnych dróg przekazywania sygnałów uzyskanych dzięki analizie danych z zastosowaniem mikromacierzy oraz proteomiki w próbach pochodzących z komórek nowotworowych w hodowlach *in vitro* i izolowanych z nowotworów. Regulacja cyklu komórkowego w raku piersi w powiązaniu z receptorem czynnika wzrostu ERBB została wykryta poprzez analizę komputerową wyników doświadczalnych i badanie oddziaływań miRNA w komórkach raka piersi. Stwierdzono występowanie nowego szlaku przekazywania sygnału wiążącego receptory czynników wzrostu z cyklem komórkowym (przejście G1/S) oraz rodziny miRNA biorącej udział w tym procesie (Stefan

Wiemann). Kolejny referat poświęcony regulacji szlaku sygnalizacyjnego insuliny, a szczególnie jego zablokowaniu. Nowo wyizolowana fosfataza odpowiedzialna za defosforylację i inaktywację podstawowego białka szlaku, kinazy S6, została scharakteryzowana w referacie Aurelio Telemana. Metylacja genów ma istotne znaczenie w regulacji ich aktywności. Analizę profilu metylacji genów szlaku anemii Fanconiego/BRCA w nowotworach głowy i szyi przeprowadzono na 13 genach i wykazano powiązanie inaktywacji genu BRCA2 z metylacją (Marcin Szaumkessel). Analiza jednego z białek odpowiedzialnych za apoptozę (TRAIL, ang. *TNF-related apoptosis-inducing factor*) i funkcjonalnego zróżnicowania odpowiedzi na jego wprowadzenie do komórek pozwoliła na odkrycie czynników odpowiedzialnych za regulację śmierci komórek nowotworowych i ich oporności na podane białko (Sandra Steinbrink). Obszerność danych otrzymanych w analizach genomowych i proteomicznych wymaga często odmiennego podejścia analitycznego. Nowe metody umożliwiające selekcję wybranych grup genów, czy białek przedstawiła Joanna Polańska. Analiza z zastosowaniem mikromacierzy może mieć istotny udział w diagnostyce i prognozowaniu. Barbara Jarzab omówiła prace skupione na rozróżnieniu dwóch typów histologicznych raka tarczycy, szczególnie istotne w sytuacjach niepewnej diagnozy histologicznej. Omówione zostały też próby poszukiwania markerów prognostycznych i rozróżnienia łagodnych i złośliwych form raka pęcherzykowatego. Badania genomiczne i proteomiczne zostały wykorzystane w analizie raka trzustki. Regulacja epigenetyczna promotorów, zmiany wiązania czynników transkrypcyjnych, różnice w poziomie transkrypcji i regulacja samych transkryptów, synteza białek i ich oddziaływanie złożyły się na obfitość informacji pozwalających lepiej zrozumieć procesy regulacji w tym typie nowotworu, co umożliwi opracowanie skuteczniejszej terapii (Jorg Hoheisel). Dane pochodzące z badań z zastosowaniem

mikromacierzy wykorzystano do wybrania genów prognostycznych i predykcyjnych w nowotworach piersi (Jolanta Kupryjańczyk) i jelita (Jerzy Ostrowski). Ostatnie dwa referaty poświęcone były analizie tkanek zdrowych sąsiadujących z nowotworem. Anna Fiszer-Kierzkowska omówiła wyniki badań z zastosowaniem mikromacierzy porównujących ekspresję genów w komórkach raka prostaty i otaczającej je normalnej tkance, które pozwoliły na wyłonienie wczesnego markera o potencjale diagnostycznym w tkance otaczającej. Piotr Widłak przedstawił ostatnie wyniki poszukiwania klasyfikatora różnicującego osoby zdrowe i chore na raka piersi na podstawie badań z wykorzystaniem spektrometrii masowej białek surowicy krwi. Analiza wykazała również szereg zmian składników surowicy w trakcie terapii, co może pozwolić na uściślenie diagnozowania i monitorowania terapii.

Sesja III „Bystander Mechanisms as Targets for Cancer Radiotherapy” poświęcona była w całości zastosowaniu efektów pośrednich promieniowania w leczeniu nowotworów. Carmel Mothersill (Fot. 2) przedstawiła zestawienie najnowszych wyników, pozwalające na wysunięcie hipotezy o wielopoziomowym działaniu tych efektów, co mogłoby istotnie wpływać nie tylko na pojedyncze organizmy, ale też na losy populacji. Mechanizmy te, obecne również w trakcie radioterapii, mogą w istotny sposób regulować oddziaływanie komórek nowotworowych z organizmem, a także wpływać na zachowanie populacji komórek nowotworowych. Elizabeth Schültke przedstawiła wyniki nowej formy terapii (mikrowiązkowa terapia radiacyjna) pozwalającej na uzyskanie dwukrotnie większej daw-



Fot. 2. Od lewej Carmel Mothersill (Kanada) i Nadzeya Ryaboken (Białoruś).

ki w obrębie guza, co mogłoby mieć szczególne znaczenie przy leczeniu nowotworów radioopornych. Metoda ta pozwala również na wykorzystanie efektów pośrednich w terapii. Nowy typ terapii został zakwalifikowany do przeprowadzenia prób klinicznych. Mansoor Ahmed zaprezentował nową metodę radioterapii przy użyciu siatki. Trójwymiarowa siatka umożliwi napromienianie bardzo wysoką dawką guza, wykorzystanie efektów pośrednich oraz istotne ograniczenie dawki poza obszarem guza. Wstępne badania kliniczne potwrdziły skuteczność tej formy radioterapii. Nowotwory hematologiczne mogą być w niektórych przypadkach leczone metodą radioimmunoterapii. Metoda ta również może wykorzystywać efekty pośrednie (nie wszystkie komórki pobierają lek). Skutki uboczne tej terapii (cytopenia) mogą być regulowane przez reinfuzję komórek macierzystych (Wojciech Jurczak). Colin Seymour przedstawił nowe dane dotyczące efektów pośrednich uzyskiwanych w populacji ryb, a przenoszonych wodą przez czynniki rozpuszczalne. Efekty pośrednie można też badać na poziomie subkomórkowym. Promieniowanie indukuje w komórkach sąsiednich mutacje w DNA mitochondrialnym i związane z tym dysfunkcje mitochondriów (James Murphy). Trzy kolejne wykłady nie omawiając *explicite* efektów pośrednich radioterapii, skupiały się na opisanu szlaków przekazywania sygnałów występujących w komórkach napromienionych (Bruce McKay, Anna Marciniak-Czochra i Krzysztof Puszyński). Ostatnie wystąpienie w tej sesji było poświęcone efektom pośrednim w komórkach krwi napromienianych pacjentów i w układach *in vitro* (Joanna Rzeszowska-Wolny (Fot. 3).

Ostatnia, najkrótsza sesja „Ion Channels and Cancer” była poświęcona roli kanałów jonowych w komórkach nowotworowych. Obejmowała trzy referaty: Miguel Rubi mówił o efektach termicznych w białku Ca²⁺-ATPazie, Walter Stuehmer przedstawił związek kanałów jonowych z postępem choroby nowotworowej, a Maria Mycielska omówiła specyficzny dla prostaty transporter cytrynianowy i jego hamowanie w procesie nowotworzenia.



Fot. 3. Prof. Joanna Rzeszowska-Wolny.

Ponadto program zjazdu obejmował sesję plakatową, na której przedstawiono 42 plakaty. W przeprowadzonym konkursie wybrano najlepsze plakaty. Pięć pierwszych miejsc uzyskali Andriy Slonchak (Kijów) za pracę „Regulation of the human glutathione S-transferase P1 gene transcription”, Anna Dudka (Birmingham) za pracę „STAT3 is a phospho-specific binding partner for fibroblast growth factor receptor that is activated by amplified receptor expression”, Magdalena Jarosz (Gliwice) za pracę „A combination of endoglin-based DNA vaccine and interleukin-12 gene enhances antiangiogenic and antitumor effects”, Ewelina Lipiec (Kraków) za pracę „Application of proton microbeam to studies of apoptosis and necrosis in PC-3 cell line” oraz Ilona Bednarek (Katowice) za pracę „Chemoresistance of bladder cancer cells after chemical or RNAi-mediated modulation of multidrug resistance (MDR) genes expression”.

Konferencja połączona była z prezentacją wyrobów firm produkujących odczynniki i sprzęt laboratoryjny, oraz ze sprzedażą polskiej i zagranicznej literatury naukowej. Więcej informacji na temat omawianej konferencji można uzyskać na stronie internetowej <http://gsn.io.gliwice.pl> (oprac. Joanna Łanuszewska i Jacek Rogoliński)

Ślady polskiej nauki w kilku głośnych wydarzeniach naukowych 2009 roku. SphinX - przyrząd polskich inżynierów trafił na orbitę okołozemską. Jego zadaniem jest obserwacja miękkiego promieniowania rentgenowskiego, emitowanego z tzw. korony słonecznej. Urządzenia zbudowane przez polskich naukowców biorą udział w eksperymentach

uruchomionego ponownie w listopadzie Wielkiego Zderzacza Hadronów.

Zaobserwowano pierwsze oddziaływanie proton-proton w detektorze Wielkiego Zderzacza Hadronów (LHCb), zbudowanym w celu odkrycia różnic między materią a antymaterią. W budowie detektora uczestniczyli polscy naukowcy. **W Instytucie Problemów Jądrowych w Świerku** dla potrzeb eksperymentu LHCb zbudowano 130 modułów dryfowych komór słomkowych – elementów zewnętrznego detektora LHCb, służących do rekonstrukcji torów i pomiaru pędu cząstek naładowanych. Polacy zbudowali także system optyczny RASNIK, mierzący zmiany położenia ram podtrzymujących moduły komór słomkowych względem mostu, na którym są zawieszane.

Przeprowadzono **pierwszą operację z użyciem polskiego robota**, w ramach prac nad unikatowym w Europie projektem zmierzającym do skonstruowania robota kardiochirurgicznego Robin Heart. Operację przeprowadzono na świniach domowych.

Badania genetyczne potwierdziły, że **szczątki gen. Władysława Sikorskiego** złożone w Katedrze na Wawelu są autentyczne, a śmierć nastąpiła w wyniku obrażeń wielonarządowych.

Krajowe Centrum Promocji Zdrowia w Miejscu Pracy, działające w ramach Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi, zostało uhonorowane doroczną nagrodą Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) za badania w zakresie promocji zdrowia na rok 2009. Nagrodę w wysokości 20 tysięcy dolarów ufundował Kuwejt.

Zespół polskich lekarzy z centrum ortopedii i medycyny sportowej - **Carolina Medical Center** w Warszawie przeprowadził pierwszą w Europie operację wszczepienia innowacyjnej protezy stawu skokowego.

Specjaliści z **Instytutu Fizjologii i Patologii Słuchu** przeprowadzili pierwszą operację wszczepienia innowacyjnego polskiego implantu słuchowego pięcioletniemu dziecku z tzw. częściową głuchotą. Pierwszą na świecie operację obustronnego wszczepienia implantów ucha środkowego pacjentowi z poważnym uszkodzeniem słuchu przeprowadził prof. Kazimierz Niemczyk, kierow-

nik Katedry i Kliniki Otolaryngologii Akademii Medycznej w Warszawie. Operację wykonano u 20-letniego mężczyzny, który w dzieciństwie doznał poważnego uszkodzenia słuchu z powodu zażywania leków ototoksycznych.

Polscy studenci zostali uhonorowani **Europejską Nagrodą im. Karola Wielkiego**. Ich projekt edukacyjny pt. „YOUrope needs YOU”, opracowany w krakowskim oddziale Europejskiego Forum Studentów AEGEE, zwyciężył w konkursie zorganizowanym przez Parlament Europejski i Fundację Nagrody Karola Wielkiego w Akwizgranie.

Naukowcy z Gdańskiego Muzeum Archeologicznego odkryli na sudańskiej pustyni Bajuda liczne obozowiska istot praludzkich i narzędzia z najstarszego okresu epoki kamienia - dolnego paleolitu.

Międzynarodowy, interdyscyplinarny zespół badawczy, z udziałem polskich naukowców, odkrył pozostałości po łaźniach wzniesionych dla żołnierzy I Legionu Italskiego w Bułgarii. Zarówno ich wielkość, wystrój architektoniczny i rozplanowanie wykracza daleko poza standardy obozu legionowego (wg Ze Świata Nauki PAP).

Utworzono **Radę Młodych Naukowców**. W dniu 1 lutego 2010 r., minister nauki i szkolnictwa wyższego prof. Barbara Kudrycka wręczyła nominacje 21 młodym polskim uczonym, którzy będą tworzyć Radę Młodych Naukowców. Jej zadaniem będzie m.in. opiniowanie projektów ustaw i rozporządzeń dotyczących funkcjonowania uczelni i sektora nauki. W skład Rady Młodych Naukowców wchodzi: Artur Czupryn - Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Andrzej Dziembowski - Instytut Biochemii i Biofizyki PAN oraz Uniwersytet Warszawski, Karolina Kurtz - Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Piotr Garstecki - Instytut Chemii Fizycznej PAN, Barbara Fryzeł - Uniwersytet Jagielloński, Krzysztof Piech - Szkoła Główna Handlowa w Warszawie, Monika Szczepaniak - Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy oraz Humboldt-Universität zu Berlin Instytut für Deutsche Literatur w Berlinie,

Katarzyna Kijania-Placek - Uniwersytet Jagielloński, Tomasz Klimczuk - Politechnika Gdańska, Piotr Koza - Politechnika Warszawska, Marcin Binkowski - Uniwersytet Śląski w Katowicach, Bartosz Powalka - Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Ewa Jankowska - Akademia Medyczna we Wrocławiu, Dominika Nowis - Uniwersytet Medyczny w Warszawie, Konrad Rejda - Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Maciej Banach - Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Justyna Zajac - Uniwersytet Warszawski, Wojciech Kulesza - Szkoła Wyższa Psychologii Społecznej w Warszawie, Tomasz Zalański - Uniwersytet Wrocławski, Dominik Antonowicz - Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Hanna Mamzer - UAM w Poznaniu. W imieniu Rady głos zabrała Hanna Mamzer, socjolog z Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, wyrażając przekonanie, że dzięki pracy zespołu głos młodych badaczy stanie się bardziej słyszalny nie tylko wśród naukowców starszych wiekiem i stażem, ale też wśród młodszych kolegów, którzy dopiero decydują się na karierę naukową.

Nagrody Prezesa Rady Ministrów, ustanowione w 1994 roku z inicjatywy PAN, za działalność naukową, naukowo-techniczną, artystyczną i za rozprawy doktorskie i habilitacyjne odebrało 44 naukowców i 5 zespołów w dniu 20 stycznia w Warszawie (Fot. 4).

Premier Donald Tusk podczas uroczystości wyraził przekonanie, że do zadań rządu należy zapewnienie wzrostu nakładów na naukę i dodał „niezależnie od sytuacji budżetu Polski nie stać na nielożenie środków finansowych na ten cel”. Za wybitny dorobek naukowy nagrodzono prof. Stanisława Czekańskiego z Uniwersy-



Fot. 4. Laureaci Nagrody Prezesa Rady Ministrów.



Fot. 5. Prof. Bogusław Buszewski.

tetu Medycznego w Poznaniu, **prof. Jana Górskiego** z Akademii Medycznej w Białymstoku, prof. Jana Strelaua z Polskiej Akademii Nauk i Szkoły Wyższej Psychologii Społecznej, prof. Jerzego Ważnego z Instytutu Technologii Drewna w Poznaniu. Nagrody za wybitne osiągnięcia naukowe otrzymali: dr hab. Zbigniew Błocki z Instytutu Matematyki Uniwersytetu Jagiellońskiego, prof. **Bogusław Buszewski** (Fot. 5) z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu; analiza środowiskowa, chromatografia i techniki pokrewne (HPLC, SPE, GC, CZE), spektroskopia, fazy stacjonarne, kolumny, charakterystyka powierzchni, adsorpcja, przygotowanie próbek, analiza terenowa, utylizacja odpadów i ścieków, chemometria, modelowanie molekularne; prof. Tomasz Jasiński z Instytutu Historii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; **prof. Jan Szopa-Skórkowski** (Fot. 6) z Uniwersytetu Wrocławskiego (kierownik Zakładu Biochemii Genetycznej Uniwersytetu Wrocławskiego). W ostatniej dekadzie jego zespół wytworzył 25 rodzajów transgenicznych ziemniaków i lnu, opatentował 18 genów, które znajdują się w National Center for Biotechnology Information, światowym banku genów w Bostonie. Profesor wydaje międzynarodowe czasopismo „Cellular and Molecular Biology Letters”. **Specjalne wyróżnienie otrzymali Grzegorz Niedźwiedzki i Piotr Szrek, którzy**



Fot. 6. Prof. Jan Szopa-Skórkowski.

w Górach Świętokrzyskich odkryli odciski stóp najstarszych czworonożnych zwierząt lądowych.

Minister Zdrowia przyznał nagrody za wybitne i wyróżniające się osiągnięcia naukowe i dydaktyczne. W Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie nagrodę naukową I stopnia otrzymała nasza Koleżanka **prof. Ewa Stachowska** z Zakładu Biochemii i Chemii Medycznej za rozprawę habilitacyjną „Wpływ sprzężonych dniów kwasu linolowego na syntezę pochodnych kwasu arachidonowego i linolowego w monocytach/makrofagach”.

Medal im. Mikołaja Kopernika dla dr Claudine Kiedy (Fot. 7). 24 listopada w Warszawie dr Claudine Kieda otrzymała z rąk Prezesa Polskiej Akademii Nauk prof. Michała Kleibera medal im. Mikołaja Kopernika. To najważniejsze z odznaczeń, Prezydium PAN przyznaje naukowcom, którzy nie należą do Akademii, w uznaniu ich zasług dla społeczności badawczej naszego kraju. Dr Kieda jest dyrektorem ds. badawczych w Ośrodku Biofizyki Molekularnej CNRS w Orleanie, gdzie między innymi prowadzi badania nad mechanizmami angiogenezy. Ponadto od wielu lat jest zaangażowana w rozwijanie współpracy pomiędzy swoim ośrodkiem macierzystym a instytucjami



Fot. 7. Dr Claudine Kieda.

naukowymi w Polsce. Od 2009 roku dr Kieda jest profesorem gościnnym na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii i prowadzi zajęcia w ramach studiów polsko-francuskich zorganizowanych przez Uniwersytet Jagielloński i Uniwersytet w Orleanie. Warto w tym miejscu przypomnieć, że 3 lata wcześniej za swoje zasługi dla krakowskiej uczelni dr Kieda otrzymała medal Merentibus UJ.

W 5. edycji Konkursu „Popularyzator Nauki” przyznano sześć nagród i trzy wyróżnienia. Konkurs był

organizowany przez Polską Agencję Prasową oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. W kategorii „Naukowiec lub instytucja naukowa” równorzędne nagrody otrzymali: dr Jan Olejniczak (Fot. 8) z Zakładu Podstawowych Problemów Fizyki Uniwersytetu Łódzkiego, naukowiec prowadzący wykłady i prelekcje dla uczniów szkół średnich, warsztaty pokazowe dla nauczycieli fizyki, wykłady otwarte na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej UŁ. Wykłady dr Olejniczaka mają formę bogato ilustrowanych pokazów; mgr inż. Joanna Szlichcińska (Fot. 9) ze Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, organizatorka warsztatów naukowych „DNA - Encyklopedia Życia”, imprezy popularyzującej biotechnologię w polskim społeczeństwie. Joanna Szlichcińska jest autorką około 30 artykułów o tematyce związanej z biotechnologią medyczną; Koło Naukowe Fizyków Politechniki Łódzkiej „Kot Schrodingera”, działające przy Instytucie Fizyki Politechniki Łódzkiej. Studenci fizyki technicznej z pasją organizują pokazy popularnonaukowe. Są stałymi uczestnikami Łódzkiego Festiwalu Nauki.

W kategorii „Dziennikarz, redakcja lub instytucja nienaukowa” nagrody otrzymali: Dorota Truszczak, autorka codziennego serwisu naukowego i audycji w cyklu „Człowiek i nauka” w Programie Pierwszym Polskiego Radia. Na bieżąco śledzi wydarzenia w ośrodku CERN pod Genewą. Pokazuje też blaski i cienie rozwoju nauki i techniki, w kontrowersyjnych obszarach: klimatologii, klonowania, inżynierii genetycznej, transplantacji, nowych leków, medycyny niekonwencjonalnej, ekologii, energetyki jądrowej; dr Tadeusz Zaleski, fizyk



Fot. 8. Dr Jan Olejniczak.

akustyk, z Uniwersytetu Gdańskiego, pełnomocnik Rady Rektorów Województwa Pomorskiego ds. Bałtyckiego Festiwalu Nauki, specjalizuje się w organizacji Targów Edukacyjnych „Zostań Żakiem” oraz stron internetowych poświęconych edukacji, np. „Przeglądu EUREKA” popularyzującego wyniki prac naukowych; Polskie Radio Szczecin, które doceniono w konkursie „Popularyzator Nauki” m.in. za powstające tam magazyny komputerowe „Trąć myszką” i „Przygody Małej Myszki w świecie informatyki”, tworzące blok publiczno-edukacyjny. Tematy podejmowane przez twórców magazynów dotyczą informatyki i najnowszych osiągnięć techniki w branży IT.

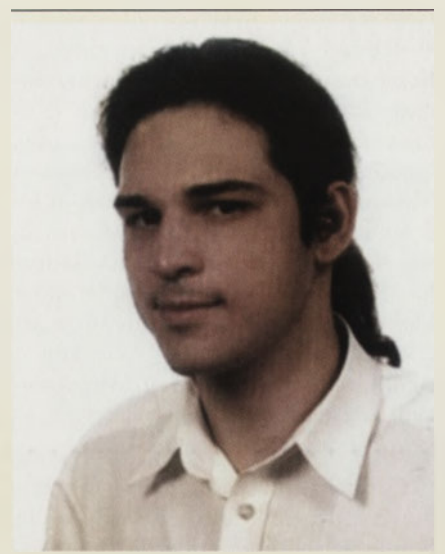
Wyróżnienia za najlepsze prezentacje w tegorocznej edycji konkursu „Popularyzator Nauki” otrzymali: prof. Leszek Woźniak z Politechniki Rzeszowskiej za oryginalny wykład śpiewany „Oblicza globalizacji”, dr Lena Magnone z Wydziału Polonistyki Uniwersytetu Warszawskiego, inicjatorka „Kongresu Psychoanalitycznego”, który odbył się podczas XIII Festiwalu Nauki w Warszawie. Pomysł polegał na zorganizowaniu amatorskiego przedstawienia, w którym udział wzięli studenci z Koła Naukowego Psychoanalizy Kultury na Wydziale Polonistyki UW. Bohaterami spektaklu byli słynni twórcy psychoanalizy, wśród nich Zygmunt Freud; dr Izabella Łęcka z Instytutu Studiów Regionalnych i Globalnych Uniwersytetu Warszawskiego. Jej nietuzinkowa prezentacja „Żar życia na pustyni” przybliżyła publiczności obyczaje mieszkańców krajów arabskich, proponowała degustację arabskich potraw, naukę alfabetu Naskhi, a przede wszystkim irackie i libańskie tańce regionalne w wykonaniu studentów tych narodowości..

Prof. Jacek Jassem i prof. Zdzisław Brodecki zostali laureatami Nagród Naukowych Miasta Gdańska im. Jana Heweliusza za rok 2009. Prof. Jacek Jassem z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego został wyróżniony w dziedzinie nauk przyrodniczych i ścisłych, a prof. Brodecki z Wydziału Prawa i Administracji Uniwersytetu Gdańskiego – w dziedzinie nauk humanistycznych. Wręczenie nagród odbyło się 28 stycznia b.r. Profesora Jassemu doceniono za zastosowanie

technik biologii molekularnej w leczeniu nowotworów złośliwych, dzięki którym leczenie raka może być skuteczniejsze. Prof. Brodeckiego, który pracuje w Katedrze Prawa Europejskiego i Komparatystyki Prawniczej na Uniwersytecie Gdańskim, uhonorowano za „stworzenie teorii zintegrowanego porządku prawnego”.

Prof. Jacek Jassem, absolwent Akademii Medycznej w Gdańsku, jest niemal od 20 lat kierownikiem Katedry i Kliniki Onkologii i Radioterapii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. W swojej pracy naukowej skupia się na raku płuc, raku piersi, nowotworach głowy i szyi, a także na biologii molekularnej nowotworów. Prof. Jacek Jassem uczestniczył w pracach wielu wpływowych instytucji zajmujących się problematyką nowotworów. Był m.in. przewodniczącym największej organizacji badawczej w dziedzinie onkologii w Europie – Grupy Raka Piersi Europejskiej Organizacji do Badań nad Rakiem (EORTC) czy członkiem zarządu Europejskiego Towarzystwa Radioterapii Onkologicznej (ESTRO), największej na świecie organizacji naukowej w dziedzinie radioterapii. Od 10 lat jest przewodniczącym Środkowoeuropejskiej Grupy Onkologicznej (CEEEOG). W Polskich organizacjach pełnił rolę wiceprezesa Polskiego Towarzystwa Radioterapii Onkologicznej (PTRO) i Polskiego Towarzystwa Onkologicznego (PTO). Jest również Członkiem Rady Naukowej Centrum Onkologii - Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie. Nagroda Naukowa Miasta Gdańska im. Jana Heweliusza przyznawana jest od 1987 r. reprezentantom gdańskiego środowiska naukowego za wybitne osiągnięcia naukowe o charakterze poznawczym.

Konkurs miesięcznika „Forum Akademickie” na artykuł popularnonaukowy pod hasłem *Skomplikowane i proste. Młodzi uczeni o swoich badaniach* został rozstrzygnięty. I Nagrodę otrzymał dr **Jacek Śmietański** (Fot. 9), informatyk i biotechnolog (Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej Collegium Medicum UJ) za pracę o perfuzyjnej tomografii komputerowej pt.: *Czy komputer widzi więcej niż człowiek?* II nagroda przypadła mgr **Emilii Grzędzickiej** (Fot. 10) (biolog; doktorantka Instytutu Nauk o Środowisku UJ) za artykuł o obrącz-



Fot. 9. Dr Jacek Śmietański.

kowaniu ptaków pt.: *Do czego obrączka zobowiązuje ornitologa?* III Nagrodę zdobyła mgr **Wioleta Walentowska** (psycholog; doktorantka Zakładu Psychofizjologii w Instytucie Psychologii UJ) za publikację o tym, jak mózg rozpoznaje i zapamiętuje twarze pt.: *Twarzą w twarz z twarzami*. Przyznano także cztery równorzędne wyróżnienia; otrzymali je: **Artur Gmerek** (doktorant Instytutu Automatyki Politechniki Łódzkiej) za pracę o wykorzystywaniu sygnałów biologicznych natury elektrycznej do sterowania robotów pt.: *Trudna decyzja Pana Procesora, czyli jak sterować protezami przy użyciu sygnałów biologicznych*; **Andrzej Kautunin** (asystent w Katedrze Podstaw Konstrukcji Maszyn Politechniki Śląskiej w Gliwicach) za artykuł o lami-



Fot. 10. Mgr Emilia Grzędzicka.

natach polimerowych pt.: *O myślących strukturach i kompozytowych grzankach*; **Sebastian Mariusz Niedźwiecki**, chirurg, doktor nauk medycznych (Klinika Chirurgii Endokrynologicznej, Ogólnej i Naczyniowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi) za pracę o leczeniu raka tarczycy pt.: *W poszukiwaniu słabego punktu*; **Katarzyna Sadecka** (Instytut Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie) za artykuł na temat mieszanin związków o strukturze krystalicznej pt.: *Metalowo-tlenkowa mozaika, czyli o samoorganizujących się strukturach eutektycznych*.

Budowa, rozbudowa lub przebudowa sal i laboratoriów w sześciu uczelniach Polski sfinansowana zostanie w ramach XIII Priorytetu Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko, z kwoty ponad 252 milionów złotych. Politechnika Warszawska, Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego, Politechnika Poznańska, Politechnika Gdańska, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie oraz Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach będą miały **nowoczesne sale wykładowe i laboratoria badawcze**, umożliwiające studentom uczestniczenie w transmitowanych na żywo wykładach naukowców z zagranicy czy symulacje doświadczeń naukowych.

Unikatową metodę wytwarzania wody wrzącej w temperaturze 160°C, i nie zamarzającej w -60°C opracowali **prof. Wiesław Stręk** (Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych im. Włodzimierza Trzebiatowskiego Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu) oraz **Zdzisław Oszczyda** z firmy **Nantes w Bolesławcu**. Twórcy nazywają ją nanowodą; już została wykorzystana w kosmetologii. Według prof. Stręka nanowoda może mieć oprócz kosmetologii jeszcze inne zastosowania. Może służyć np. do produkcji ultra-stabilnych betonów czy do zwiększenia zawartości bakterii w jogurtach. Może być wykorzystana w procesach chemicznych, medycynie i farmacji przy produkcji leków. Nanolaboratorium Nantes zostało nagrodzone złotym medalem za opracowanie unikatowej na skalę światową metody pozyskiwania nanowody podczas 58 Światowych Targów Wynalazczości,

Badań Naukowych i Nowych Technik „Brussels Innova 2009”.

Muzeum Medycyny w Sosnowcu, jako wynik inicjatywy władz miasta oraz Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. Wszystko wskazuje na to, że już za kilka miesięcy mieszkańcy Sosnowca będą mogli podziwiać zabytki medyczne, farmaceutyczne i aptekarskie. Po remoncie nowej siedziby Klubu Kiepury w Sosnowcu, władze miasta zamierzają przeznaczyć ostatnie piętro obiektu, zaś uczelnia zapewni kadre, eksponaty i fachową pomoc. Inicjatorzy przedsięwzięcia wierzą, że jeśli mieszkańcy Sosnowca i miast zaprzyjaźnionych dowiedzą o się o planach tworzenia Muzeum, być może znajdą na strychach i w piwnicach rzeczy, które w dawnych czasach służyły ratowaniu ludzkiego życia. Tworzenie Muzeum zbiega się z oczekiwaną 40. rocznicą powstania Wydziału Farmacji Śląskiego Uniwersytetu Medycznego.

Minister Zdrowia przyznał nagrody za wybitne i wyróżniające się osiągnięcia naukowe i dydaktyczne. Otrzymali je naukowcy z uczelni medycznych w kraju; wśród nich znajdują się Koledzy należący do Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Nagrodą indywidualną naukową I stopnia zostali wyróżnieni prof. dr hab. **Barbara Czarnocka** z Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie za publikację pt.: „Pendred Syndrome in Two Galician Families: Insights into Clinical Phenotypes through Cellular, Genetic, and Molecular Studies”; prof.

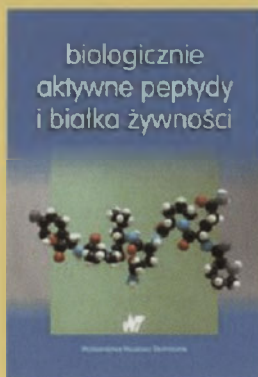
PAM dr hab. Ewa Stachowska z Zakładu Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie za publikację „Wpływ sprzężonych dienów kwasu linolowego na syntezę pochodnych kwasu arachidonowego i linolowego w monocytach/makrofagach”; dr n. farm. **Arkadiusz Surazyński** z Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku za publikację pt.: „Extracellular matrix and HIF - 1 signaling: The role of prolylase”. Naukową nagrodą zespołową uhonorowani zostali: prof. dr hab. **Małgorzata Czyż**, dr n. biol. **Sztiller-Sikorska Małgorzata**, dr n. med. **Justyna Jakubowska** w grupie autorów, łącznie z udziałem niezującego już prof. **Marka Gniazdowskiego**, aktywnego członka Polskiego Towarzystwa Biochemicznego z Medycznego Uniwersytetu w Łodzi, za cykl 6 publikacji dotyczących molekularnych mechanizmów działania antracyklin i ich nowych pochodnych, samodzielnie lub w skojarzeniu z imatinibem (STI571), w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej; dr n. med. **Krzysztof Książek** wśród autorów cyklu 5 publikacji dotyczących biologii komórek mezotelium otrzewnowego oraz prof. UM dr hab. **Paweł Jagodziński** i dr n. przyr. **Radosław Januchowski** i współautorzy z Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu za cykl 5 publikacji dotyczących epigenetycznej regulacji ekspresji wybranych genów w komórkach nowotworowych.

pod redakcją Teresy Wesolowskiej

BIOLOGICZNIE AKTYWNE PEPTYDY I BIAŁKA

Praca zbiorowa pod red. Jerzego Dziuby, Łucji Fornal

WNT, 2010, B5, s. 480, rys. 63, tab. 111, oprawa twarda, ISBN 978-83-204-3582-5, cena katalogowa 89,00



Książka stanowi kompendium wiedzy z zakresu molekularnych i biologicznych właściwości białek i peptydów, które decydują o ich najbardziej istotnym żywieniowym i profilaktycznym oraz terapeutycznym znaczeniu.

Jest to jedyne na polskim rynku opracowanie będące bogatym źródłem wiedzy z pogranicza biologii, biochemii, immunologii, fizjologii, chemii żywności i dietytyki, które zakresem materiału i głębią ujęcia tematu ściśle odpowiada wymaganiom stawianym interdyscyplinarnemu podejściu do zagadnienia białek i peptydów w żywności i jego wieloaspektowej analizie.

Książka jest przeznaczona dla studentów nauk przyrodniczych i medycznych, szczególnie takich kierunków, jak technologia żywności i żywienia człowieka, dietytyka, biotechnologia, biologia, farmacja, towaroznawstwo i pokrewne.

WYDAWNICTWA NAUKOWO-TECHNICZNE

Dział Sprzedaży, ul. Mazowiecka 2/4, 00-048 Warszawa, tel. (0-22) 827 56 87, fax (0-22) 826 82 93, e-mail: handlowy@wnt.pl



STRESZCZENIE

Metylacja cytozyny do 5-metylocytozyny jest poreplikacyjną modyfikacją DNA, odgrywającą istotną rolę w transkrypcyjnym wyciszaniu genów. Proces ten polega na kowalencyjnym połączeniu grupy metylowej z cytozyną, znajdującą się w obrębie dinukleotydów CpG. Reakcja metylacji DNA jest katalizowana przez metylotransferazy DNA, które przenoszą grupę metylową z S-adenozylometioniny na resztę cytozyny w DNA. Wzór metylacji DNA ustalany jest nie tylko w wyniku działania metylotransferaz, ale również na drodze demetylacji. Niniejsza praca przedstawia biochemiczny aspekt procesów metylacji i demetylacji cytozyn DNA, uwzględniając ich rolę w regulacji ekspresji genów, a także możliwości modulacji procesu metylacji cytozyny w terapii przeciwnowotworowej.

WPROWADZENIE

Wzór metylacji DNA ustalany jest we wczesnych fazach rozwoju zarodkowego i utrzymywany podczas życia osobniczego przez metylotransferazy DNA (DNMTs, ang. *DNA methyltransferases*). W warunkach prawidłowych metylacja DNA jest wykorzystywana w komórce m.in. do wyciszania licznych sekwencji powtórzonych, piętnowania rodzicielskiego i wyłączenia drugiego chromosomu X w komórkach żeńskich. Metylacja reszty cytozyny w DNA odgrywa ważną rolę w kontroli procesów decydujących o poziomie ekspresji genów w komórkach [1].

Około 3-4% wszystkich cytozyn genomu ulega metylacji, a powstająca 5-metylocytozyna stanowi 0,75-1% wszystkich zasad w DNA prawidłowej komórki ssaków [2]. Ocenia się, że około 70-80% wszystkich sekwencji CpG w DNA jest zmetylowanych [3,4]. Metylacji ulega głównie cytozyna dinukleotydów CpG pojedynczo rozrzuconych w całym genomie, występujących szczególnie często w endogennych retrowirusach i sekwencjach transpozonowych. W genomie występują również sekwencje CpG, które są chronione przed metylacją. Są to obszary DNA (około 1 kb) o zwiększonej w porównaniu z całym genomem zawartości CpG, tak zwane wyspy CpG [5]. Usytuowane są one w rejonach końców 5' wielu genów człowieka, najczęściej w promotorach i pierwszych eksonach [2,3]. Genom człowieka zawiera około 29 000 wysp CpG, które są zlokalizowane w około 50-60% promotorów genów człowieka, tj. wszystkich genów metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping genes*) i około 40% genów specyficznych tkankowo [3,4]. Uważa się, że aktywne transkrypcyjnie geny wykazują hipometylację, podczas gdy transkrypcyjnie nieaktywne sekwencje są zazwyczaj zmetylowane [6]. W genomie człowieka dinukleotydy CpG występują ze znacznie niższą częstością niż pozostałe dinukleotydy. Stanowią one ok. 20% wartości wyliczonej na podstawie łącznej zawartości cytozyny i guaniny [7]. Jedynie w obrębie wysp CpG, gdzie cytozyna pozostaje niezmetylowana, dinukleotyd CpG występuje z oczekiwaną frekwencją. Uzasadnieniem tego zjawiska może być tendencja 5-metylocytozyny do deaminacji. Wskutek deaminacji cytozyny powstaje uracyl, który jest efektywnie eliminowany w procesie naprawy przez glikozylazy uracylowe [7,8]. Natomiast spontaniczna deaminacja 5-metylocytozyny, która zachodzi 2-4 razy szybciej niż deaminacja cytozyny, powoduje powstanie tyminy (Ryc. 1). Błąd ten może prowadzić do tranzycji C:G→T:A, a tym samym do zmniejszenia ilości dinukleotydu CpG w genomie [7].

MECHANIZM REAKCJI METYLACJI CYTOZYN

Metylacja DNA polega na przyłączeniu grupy metylowej do węgla w piątej pozycji pierścienia cytozyny (Ryc. 1). Reakcję tę katalizują metylotransferazy DNA. Wszystkie metylotransferazy charakteryzuje podobny mechanizm katalityczny z wykorzystaniem S-adenozylometioniny jako donora grup metylowych [9]. W pierwszym etapie reakcji cytozyna zostaje wyciągnięta na zewnątrz po-

Jolanta Guz[✉]

Marek Foksiński

Ryszard Oliński

Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

[✉]Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz; tel.: (52) 585 37 45, e-mail: jolaguz@cm.umk.pl

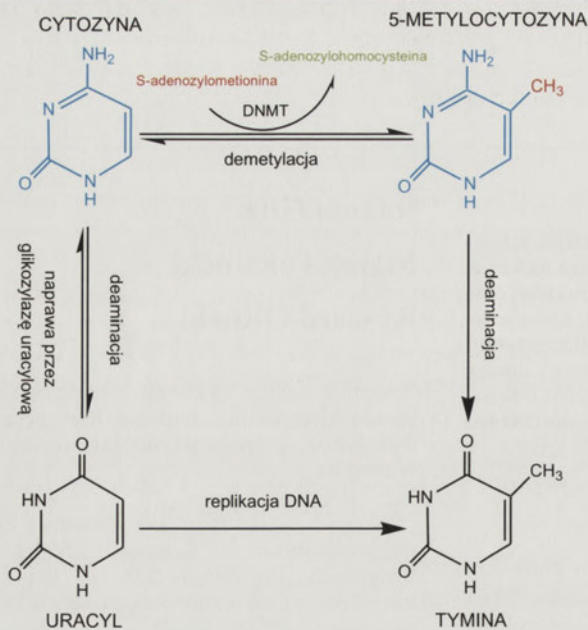
Artykuł otrzymano 30 czerwca 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 29 października 2009 r.

Słowa kluczowe: 5-metylocytozyna, metylotransferazy DNA, metylacja DNA, demetylacja DNA

Wykaz skrótów: 5-MeC – 5-metylocytozyna; C – cytozyna; DNMT (ang. *DNA methyltransferase*) – metylotransferaza DNA; ES (ang. *embryonic stem cells*) – embrionalne komórki macierzyste; G – guanozyna; HDAC – deacetylaaza histonowa; ICF (ang. *immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome*) – zespół niedoboru odporności, niestabilność centromerów i anomalii twarzy; MBD (ang. *methyl-CpG binding domain*) – domena wiążąca metylo-CpG; MBP (ang. *methyl-CpG binding proteins*) – białka wiążące metylowaną DNA; NLS (ang. *nuclear localization signal*) – sygnał lokalizacji jądrowej; NuRD – kompleks remodelujący chromatynę; PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*) – jądrowy antygen komórek proliferujących; RFTD (ang. *replication foci targeting domain*) – region nakierowujący enzym do widełek replikacyjnych; T – tymina; TRD (ang. *transcriptional repression domain*) – domena represji transkrypcji

Podziękowania: Autorzy są partnerami sieci doskonałości ECNIS (Environmental Cancer Risk, Nutrition and Individual Susceptibility, contract No 513943). Praca częściowo finansowana w ramach projektu MNiSW nr 1021/6. PR UE/2009/7.



Rycina 1. Schemat procesu metylacji i deaminacji cytozyny oraz demetylacji i deaminacji 5-metylocytozyny (zmodyfikowano wg [8]).

dwójnej helisy DNA i wpasowana do centrum aktywnego metylotransferazy [10,11], gdzie następuje atak nukleofilowy grupy tiolowej cysteiny na atom węgla w pozycji szóstej (C-6) pierścienia cytozyny. Prowadzi to do kowalencyjnego wiązania enzymu z resztą cytozyny w DNA. Następnie dochodzi do protonowania atomu azotu w pozycji trzeciej (N-3) przez grupę karboksylową reszty kwasu glutaminowego enzymu i powstania 4,5-enaminy, która atakuje cząsteczkę S-adenozylometioniny, będącą donorem grupy metylowej. Grupa metylowa zostaje przyłączona do aktywnego atomu węgla C-5, a z cząsteczki S-adenozylometioniny powstaje S-adenozylhomocysteina. Po przyłączeniu grupy metylowej w pozycję 5 pierścienia cytozyny następuje odtworzenie podwójnego wiązania pomiędzy węglami C-5 i C-6 oraz uwolnienie enzymu na drodze β -eliminacji [12,10].

W komórce funkcjonują dwa typy reakcji metylacji: metylacja zachowawcza (ang. *maintenance methylation*) i metylacja *de novo*. W metylacji zachowawczej utrzymanie wzoru metylacji polega na przyłączeniu grup metylowych do nowo syntetyzowanych łańcuchów DNA, w miejscach komplementarnych do miejsc metylowanych w nici rodzicielskiej. W ten sposób oryginalny wzór metylacji zostaje zachowany i przekazany do komórek potomnych. Metylacja *de novo* oznacza metylację cytozyn w uprzednio niezmetylowanych sekwencjach DNA i zachodzi ona głównie podczas embriogenezy i procesu różnicowania komórek [13].

METYLOTRANSFERAZY DNA

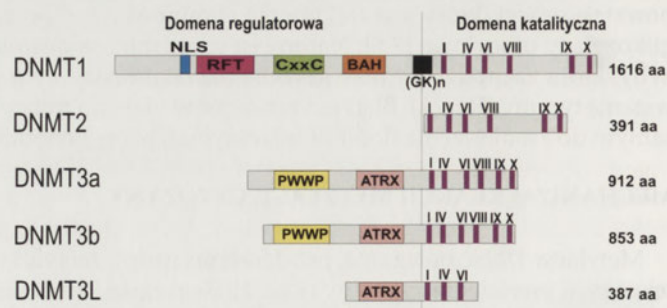
W komórkach ssaków zidentyfikowano pięć genów kodujących metylotransferazy DNA: *DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3a*, *DNMT3b* i *DNMT3L*. Klasyczną „zachowawczą” metylotransferazą, odpowiedzialną za utrzymanie stanu metylacji podczas replikacji DNA, jest *DNMT1*. Dwa inne enzymy – *DNMT3a* i *DNMT3b* – uczestniczą w ustaleniu *de novo* wzoru metylacji podczas wczesnego rozwoju embrionalnego. *DNMT2* i *DNMT3L* są białkami o budowie

zblizonej do metylotransferaz, ale nie wykazują aktywności enzymatycznej [9,10,12].

DNMT1 i *DNMT3* zawierają dwie domeny: regulatorową na N-końcu i katalityczną na C-końcu łańcucha polipeptydowego, natomiast *DNMT2* ma tylko domenę katalityczną. Domeny na N-końcach różnią się pomiędzy metylotransferazami i są odpowiedzialne za lokalizację w jądrze, rozpoznawanie specyficznych sekwencji DNA oraz oddziaływanie z licznymi białkami. C-końcowe domeny metylotransferaz cytozynowych zawierają 10 charakterystycznych motywów sekwencji łańcucha polipeptydowego odpowiedzialnych za aktywność katalityczną enzymu [9]. Sześć z tych motywów jest wysoce zachowawcza i jest obecna we wszystkich metylotransferazach cytozynowych u bakterii, grzybów, roślin i ssaków. Do motywów tych należą: I, IV, VI, VIII, IX i X (Ryc. 2). Motywy I i X tworzą miejsce wiązania dla S-adenozylometioniny. Motyw IV zawiera dipeptyd prolina-cysteina (PC), dostarczający grupę tiolową w miejscu aktywnym enzymu. Motyw VI zawiera resztę kwasu glutaminianowego (w sekwencji ENV), będącą donorem protonu. Natomiast motyw IX utrzymuje strukturę miejsca wiązania substratu [13,14].

METYLOTRANSFERAZA DNMT 1

Metylotransferaza DNA 1 (*DNMT1*) człowieka jest dużym białkiem złożonym z 1616 aminokwasów, kodowanym przez gen zlokalizowany na chromosomie 19p13.2 [15]. Enzym ten zawiera na N-końcu domenę regulatorową (składającą się z ok. 1100 reszt aminokwasowych), która pełni kilka funkcji, m.in. odpowiada za transport *DNMT1* do jądra komórkowego, koordynację replikacji i metylacji podczas fazy S cyklu komórkowego [12,10]. N-końcowy region zawiera kilka różnych motywów, m.in.: NLS – sygnał lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization signal*), RFTD – region nakierowujący enzym do widełek replikacyjnych (ang. *replication foci targeting domain*), motywy bogate w reszty cysteinowe wiążące cynk (CxxC) (Ryc. 2) [14]. U ssaków regiony bogate w cysteinę są obecne prawie we wszystkich metylotransferazach DNA, białkach wiążących grupy metylowe, białkach wiążących CpG i innych białkach biorących udział w metylacji cytozyny [12]. N-końcowa część zawiera również dwie domeny BAH (ang. *bromo adjacent homology*), które mogą być zaangażowane w oddziaływania białko-białko [12]. C-końcowa domena katalityczna *DNMT1* zawiera wszystkie zachowane w ewolucji motywy charakterystyczne dla metylotransferaz, ale jest nieaktywna bez części N-końcowej,



Rycina 2. Schemat organizacji głównych domen metylotransferaz DNA. Opis w tekście (zmodyfikowano wg [17] i [15]).

co wskazuje na ważną regulatorową funkcję domeny N-końcowej tego enzymu [11,16]. Domena regulatorowa i katalityczna są połączone krótkim odcinkiem powtórzonych dipeptydów glicyna-lizyna (GK) [10,12].

N-końcowa domena oddziałuje z wieloma białkami, takimi jak: PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*), inhibitor kinazy cyklozależnej (p21^{WAF1}), Rb (produkt genu supresorowego retinoblastomy), czynnik transkrypcyjny E2F1, korepresor transkrypcyjny - DMAP1 (ang. *DNA methyltransferase associated protein-1*). DNMT1 bezpośrednio oddziałuje z enzymem zależnym od ATP, remodelującym chromatynę (hSNF2H), deacetylazami histonów HDAC1 i HDAC2, z białkami wiążącymi metylowane CpG: MBD2, MBD3, MeCP2 oraz z metylotransferazą histonową (SUV39H1) i z białkiem HP1 (ang. *heterochromatin binding protein*) [9,13,17,18]. Oddziaływanie z białkami biorącymi udział w kondensacji chromatyny oraz blokowaniu sekwencji promotorów genów sugerują, że metylotransferaza ta odgrywa znaczącą rolę w represji transkrypcji. DNMT1 przypisywana jest też rola w kontroli cyklu komórkowego poprzez oddziaływanie z jądrowym antygenem komórki proliferującej oraz inhibitorem kinaz cyklozależnych [9]. Wykazano również, że DNMT1 oddziałuje z metylotransferazami *de novo*: DNMT3a i DNMT3b [19].

DNMT1 wykazuje *in vitro* 5-30 razy większą aktywność w stosunku do hemimetylowanego DNA niż do niemetylowanego DNA. Powinowactwo do DNA hemimetylowanego wskazuje, że enzym DNMT1 jest odpowiedzialny za utrzymywanie wzoru metylacji podczas replikacji w komórkach somatycznych [11,12]. W późnej fazie S DNMT1 zakotwiczona na białku PCNA pojawia się w widelkach replikacyjnych [20]. W eksperymentach *in vitro* wykazano również, że DNMT1 posiada aktywność metylotransferazy *de novo* w stosunku do DNA jednoniciowego [21].

W badaniach na myszach wykazano, że zaburzenia w strukturze i funkcji DNMT1 powodują znaczne zredukowanie poziomu metylacji DNA, nieprawidłowy przebieg piętnowania genomowego, ekspresji genów związanych z chromosomem X, aktywację endogennych retrowirusów i w efekcie – letalność embrionów [15,22]. W embrionalnych komórkach macierzystych (ES, ang. *embryonic stem cells*) pozbawionych DNMT1 obserwowano wzrost tempa mutacji oraz defekty w systemie naprawy błędnie sparowanych zasad. Wykazano też, że komórki macierzyste z brakiem DNMT1 wzrastają normalnie w stadiach niezróżnicowania, natomiast przejście w fazę różnicowania powoduje kierowanie ich na drogę apoptozy [1,23].

Zidentyfikowano kilka izoform DNMT1, powstałych w wyniku różnicowego cięcia i składania mRNA, m.in. DNMT1b, DNMT1o. DNMT1b jest izoformą występującą w komórkach somatycznych. Transkrypt zawiera dodatkowo 48 par zasad pomiędzy egzonem 4 a 5, w wyniku czego produkt białkowy jest dłuższy o 16 reszt aminokwasowych w porównaniu z DNMT1. Biologiczna rola tej izoformy pozostaje nadal nieznana [9,15]. DNMT2 jest izoformą krótszą o 118 reszt aminokwasowych na N-końcu białka w porównaniu z DNMT1. Występuje w cytoplazmie dojrzałego oocytu i komórek przedimplantacyjnego embrionu. Po implantacji,

w stadium 8-komórkowego zarodka, DNMT2 przemieszcza się do jądra komórkowego, co może sugerować, że izoforma ta jest niezbędna dla ustalenia wzoru metylacji w piętnowanych allelach [9,15].

METYLOTRANSFERAZA DNMT 2

DNMT2 jest metylotransferazą o strukturze w największym stopniu zachowanej w ewolucji. Zachowawcze rejony homologiczne w strukturze genu kodującego to białko są obecne u wielu gatunków, również u tych, u których uważa się, że metylacja DNA nie zachodzi (np. *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*) [9]. DNMT2 człowieka kodowana jest przez gen, który został zlokalizowany na chromosomie 10p12-10p14. DNMT2 to stosunkowo małe białko (złożone z 391 reszt aminokwasowych), które jest pozbawione dużej N-końcowej domeny obecnej u DNMT1 i DNMT3. DNMT2 zawiera wszystkie 10 zachowanych w ewolucji motywów katalitycznych charakterystycznych dla metylotransferaz DNA (Ryc. 2), co sugeruje, że białko to powinno wykazywać aktywność katalityczną [12,15,24]. W badaniach na embrionalnych komórkach macierzystych (ES) myszy pozbawionych genu *DNMT2* nie stwierdzono nieprawidłowości w ich proliferacji i różnicowaniu. Nie obserwowano również zmian w metylacji DNA, co może sugerować, że DNMT2 nie odpowiada ani za metylację *de novo*, ani zachowawczą [15,22]. Inne badania wykazały jednak, że wyizolowane białko DNMT2 posiada słabą aktywność metylotransferazy *in vitro* [25]. Badania Liu [26] wskazują, że DNMT2 może być aktywna również *in vivo*.

Gen kodujący DNMT2 podlega ekspresji w większości tkanek. Wzór syntezy tego białka jest bardzo podobny do DNMT1. Organizmy, które posiadają enzymy z rodziny DNMT1 i DNMT3 zawsze zawierają też DNMT2 [12]. Sugerowano, że homologi DNMT2 mogą odgrywać rolę w funkcjonowaniu centromeru. Struktura centromeru jest zachowana w ewolucji u gatunków, które mają homolog DNMT2 i jest odmienna u organizmów, które go nie posiadają [23]. Ostatnio wykazano, że DNMT2 może metylować resztę cytozyny w tRNA^{Asp}, a nie w DNA. Na podstawie wyników tych badań, DNMT2, pomimo posiadania ściśle zachowanego w ewolucji motywu katalitycznego metylotransferaz DNA, można by umiejscowić raczej pośród metylotransferaz RNA [27].

METYLOTRANSFERAZY DNMT 3

DNMT3a i DNMT3b są kodowane przez 2 różne geny leżące odpowiednio na chromosomie 2p23 i 20q11.2 [15]. N-końcowe części obu enzymów zawierają domenę PWWP oraz domenę wiążącą cynk bogatą w cysteinę (homologiczną z ATRX) (Ryc. 2) [12], które są zaangażowane w oddziaływanie z heterochromatyną oraz licznymi białkami [28]. DNMT3a wiąże korepresor RP58 [29], czynnik nowotworowy PML-RAR, białko HP1, natomiast DNMT3b może wiązać Sin3a, KIF4a, zależny od ATP enzym remodelujący chromatynę (hSNF2H) oraz SUMO-1/Ubc9. DNMT3a i 3b mogą również współdziałać z DNMT1 i z deacetylazami histonowymi [13,17]. Wskazuje to, że metylotransferazy te mogą być zaangażowane w remodelowanie chromatyny i związaną z tym modulację transkrypcji genów. Domeny

katalityczne DNMT3a i DNMT3b są aktywne również po usunięciu z enzymu części N-końcowej [30].

DNMT3a oraz DNMT3b ulegają syntezie na wysokim poziomie w niezróżnicowanych embrionalnych komórkach macierzystych, a ich poziom spada w różnicujących się komórkach macierzystych i pozostaje niski w tkankach somatycznych [31]. Ponieważ DNMT3a, DNMT3b są odpowiedzialne za całkowitą metylację po implantacji zarodka, traktowane są jako metylotransferazy *de novo*. DNMT3a występuje we wszystkich tkankach organizmu, podczas gdy synteza DNMT3b w większości tkanek, z wyjątkiem jąder, tarczycy i szpiku kostnego, jest bardzo niska. Badania *in vitro* wykazały, że katalityczna aktywność DNMT3a, jak i DNMT3b jest około 20 razy niższa niż aktywność DNMT1 [31]. Defekt lub brak DNMT3a albo DNMT3b wiąże się z występowaniem licznych aberracji i chorób rozwojowych. Wykazano, że myszy z wyłączonym genem *DNMT3a* rodzą się żywe, ale umierają po około 4 tygodniach, natomiast myszy z wyłączonym genem *DNMT3b* giną w okresie embrionalnym [1,11,22]. DNMT3b specjalizuje się w metylacji CpG specyficznych regionów, takich jak: centromerowe sekwencje powtórzone, wyspy CpG w inaktywowanym chromosomie X. Mutacja genu *DNMT3b* może być związana z występowaniem zespołu ICF (ang. *immunodeficiency, centomeric region instability, facial anomalies syndrome*; zespół niedoboru odporności, niestabilność centromerów i anomalii twarzy), w którym utrata aktywności DNMT3b powoduje demetylację sekwencji powtórzonych w regionach centromerowych chromosomu 1, 9, 16 [12].

Chociaż DNMT3a jest specyficzna dla metylacji CpG, enzym ten jest również zdolny do metylacji cytozyny w dinukleotydach CpA oraz CpT [32]. *In vitro* DNMT3a nie wykazuje aktywności w stosunku do DNA jednoniciowego, natomiast reakcję metylacji DNA dwuniciowego, zarówno niemetylowanego, jak i częściowo metylowanego katalizuje z podobną szybkością [21]. DNMT3a generuje asymetryczny wzór metylacji na obu niciach DNA [33]. Uważa się, że metylotransferazy *de novo* mogą uczestniczyć również w utrzymywaniu metylacji poprzez przywrócenie metylacji w miejscach opuszczonych przez DNMT1 podczas replikacji [21,34]. Możliwe, że istnieje współdziałanie pomiędzy DNMT1 i DNMT3. W nowotworowych liniach komórkowych z niedoborem DNMT1 wykazano obniżenie globalnej metylacji o około 20%, a z niedoborem DNMT3b o około 3%. W liniach komórkowych z wyłączonymi genami obydwu enzymów – DNMT1 i DNMT3b, obserwowano spadek metylacji genomowego DNA nawet poniżej 95% w porównaniu z wariantem dzikim [35].

Rodzina DNMT3 zawiera jeszcze trzeci homolog nazywany DNMT3L [12]. Gen *DNMT3L* zlokalizowany jest na chromosomie 21q22.3, a jego ekspresja ma miejsce przede wszystkim podczas gametogenezy, kiedy zachodzi imprinting genomowy. DNMT3L zawiera sekwencję NLS i motyw wiążący cynk (ATRX), które umożliwiają temu białku translokację do jądra i wiązanie z DNA (sekwencje te są obecne w DNMT3a i DNMT3b) [31,36]. Zawiera też niektóre zachowane w ewolucji motywy metylotransferaz DNA: I, IV i VI (Ryc. 2), ale nie posiada aktywności enzymatycznej. Białko to może być katalitycznie nieaktywne z

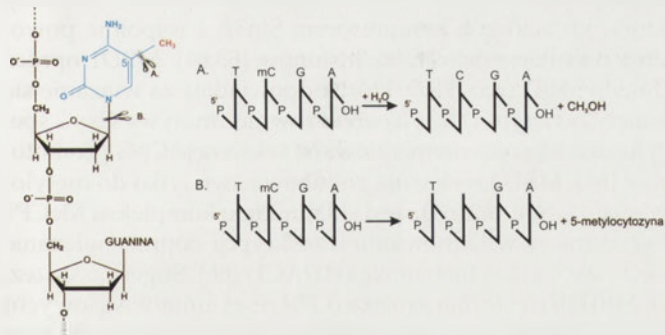
powodu braku krytycznych reszt aminokwasów uczestniczących w katalizie. Przykładami są reszty PC w motywie IV czy ENV w motywie VI, które formują centrum katalityczne metylotransferaz [10]. Uważa się, że DNMT3L może odgrywać rolę w procesie spermatogenezy, podczas ustalania matczynego wzoru piętnowania w oocytach oraz w metylacji retrotranspozonów. Dowiedziono, że DNMT3L oddziałuje z DNMT3a i DNMT3b oraz że enzymy te wykazują wspólną lokalizację w jądrze komórkowym [10]. DNMT3L działa jako czynnik stymulujący aktywność enzymatyczną DNMT3a i DNMT3b, nie wpływa natomiast na aktywność DNMT1 [37]. *In vitro*, DNMT3L wzmacnia aktywność metylotransferaz *de novo* około 15-krotnie. Odbywa się to na drodze bezpośredniego wiązania C-końcowej części DNMT3L z katalitycznymi domenami DNMT3a i DNMT3b [38]. Dodatkowo, kompleks DNMT3a/DNMT3L wykazuje wyższą zdolność wiązania DNA i S-adenozylometioniny niż DNMT3a [39]. DNMT3L wiąże HDAC1 przez motyw ATRX, co wskazuje, że białko to jest również zaangażowane w deacetylację histonów, remodelowanie chromatyny i represję transkrypcji [36].

DEMETYLACJA DNA

Wzór metylacji DNA jest nie tylko konsekwencją przyłączenia grup metylowych do cytozyn, ale również demetylacji DNA [40]. Demetylacja może być rozpatrywana jako proces zależny oraz niezależny od replikacji DNA. Demetylacja DNA zależna od replikacji nazywana jest demetylacją pasywną. Może mieć miejsce, kiedy DNMT1 nie metyluje nowo zsintetyzowanego łańcucha DNA. Druga runda replikacyjna, której nie towarzyszy metylacja zachowawcza, daje w rezultacie całkowicie niemetylowany DNA. Demetylacja aktywna przebiegająca niezależnie od replikacji DNA, zachodzi na drodze enzymatycznej [40-42].

W przeciwieństwie do solidnie udokumentowanych wyników badań dotyczących procesów metylacji DNA, wyniki dokumentujące aktywną demetylację cytozyny są raczej skąpe. Niektóre badania sugerują obecność aktywnego, niezależnego od replikacji, sposobu demetylacji DNA. Na przykład, w aktywowanych limfocytach T sekwencje wzmacniające genu interleukiny-2 są demetylowane w czasie 20 minut od chwili aktywacji komórek [43]. Podobnie, sekwencje receptorowe dla estrogenów wykazują cykliczną demetylację niepowiązaną z replikacją [44,45]. Podczas rozwoju embrionalnego myszy w zygotach tuż po zapłodnieniu dochodzi do usunięcia wzoru metylacji, przy czym wykazano, że genom ojcowski jest demetylowany aktywnie, przed rozpoczęciem pierwszej rundy replikacyjnej [44,46]. Aktywną demetylację DNA podczas zapłodnienia sugerują również wyniki innych badań przeprowadzonych na embrionach ryby z gatunku *Danio peregowae* (ang. *zebrafish*) [47]. Na uwagę zasługują także wyniki badań przeprowadzone na różnych gatunkach roślin, sugerujące obecność kompleksu glikozylaza/liaza DNA, zaangażowanego w proces aktywnej demetylacji 5-metylocytozyny [48].

Najbardziej prawdopodobnymi mechanizmami aktywnej demetylacji DNA kręgowców są: 1. bezpośrednie usuwanie grupy metylowej z 5-metylocytozyny (Ryc. 3A), 2. wycinanie 5-metylocytozyny i zastąpienie cytozyną na dro-



Rycina 3. Schemat aktywnej demetylacji DNA: (A) enzymatyczna hydroliza 5-metylocytozyny, (B) wycięcie 5-metylocytozyny przez glikozylazę DNA (zmodyfikowano wg [40]).

dze naprawy przez wycinanie zasad (BER, ang. *base excision repair*) (Ryc. 3B), 3. konwersja 5-metylocytozyny do tyminy poprzez jej deaminację, a następnie wolna od błędów naprawa (przywrócenie pary G:C), 4. wycięcie fragmentu oligonukleotydowego zawierającego 5-metylocytozynę i wolna od błędów naprawa [49,50].

Nawiązując do proponowanego pierwszego mechanizmu, należy zauważyć, że u kręgowców występują ortologu bakteryjnych demetylaz (dioksygenaz) typu AlkB, które bezpośrednio usuwają grupę metylową [51]. Nie stwierdzono jednak możliwości usuwania przez te enzymy grupy metylowej 5-metylocytozyny. Wyniki Bhattacharya i wsp. sugerują, że enzymem o właściwościach demetylasy jest białko MBD2b, należące do rodziny białek wiążących zmetylowane CpG, które może bezpośrednio hydrolizować 5-metylocytozynę do cytozyny, uwalniając metanol [52]. Aktywności demetylującej białka MBD2 nie potwierdziły badania innych zespołów [42]. Dodatkowo, u myszy ze zknokautowanym genem *Mbd2* nie stwierdzono znacznego obniżenia poziomu metylacji, którego można by oczekiwać gdyby MBD2 było główną demetylazą DNA [53]. Wydaje się, że drugi z proponowanych mechanizmów, aktywny u roślin, w którym 5-metylocytozyna jest wycinana przez glikozylazę DNA, jest także prawdopodobny u kręgowców. Wykazano, że glikozylazy DNA (TDG i MBD4) rozpoznające i usuwające tyminę w parach G:T, wykazują także powinowactwo do 5-metylocytozyny, chociaż znacznie słabsze niż do tyminy [50]. W świetle badań, które stwierdzają, że niektóre enzymy z niedawno odkrytej rodziny deaminaz cytydyny – Apobec (m.in.: AID i Apobec 1) mogą deaminować także 5-metylocytozynę w jednoniciowym DNA, atrakcyjnym wydaje się mechanizm trzeci. Reakcja deaminacji prowadzi do przekształcenia 5-metylocytozyny w tyminę i pojawienia się błędnej pary G:T. Ponadto, okazało się że geny dla obu wymienionych powyżej enzymów (AID i Apobec1) ulegają ekspresji w oocytach i komórkach embrjonalnych w okresie epigenetycznego przeprogramowania, czyli globalnej demetylacji i następującej po niej remetylacji DNA [50]. Intrygujące są także ostatnio opublikowane wyniki badań [44], które wskazują, że DNMT3A i DNMT3B mogą funkcjonować, albo jako metylotransferazy DNA, albo, alternatywnie, jako deaminazy 5-metylocytozyny, w warunkach niskiego stężenia S-adenozylometioniny.

W badaniach prowadzonych na embrionach ryby z gatunku *Danio pręgowane* (ang. *zebrafish*) udowodniono, że aktywne usuwanie grupy metylowej z 5-metylocytozyny wymaga obecności białek AID i MBD4. W wyniku deaminacji 5-metylocytozyny przez AID powstaje tymina, która jest rozpoznawana i usuwana przez MBD4, a następnie na drodze naprawy zastąpiona przez cytozynę. W powyższym modelu, do aktywnej demetylacji wymagane jest także nieenzymatyczne białko GADD45, które jest odpowiedzialne za oddziaływania pomiędzy białkami AID i MBD4 (Ryc. 4) [49].

MECHANIZMY WYCISZANIA GENÓW PRZEZ METYLACJĘ CYTOZYN

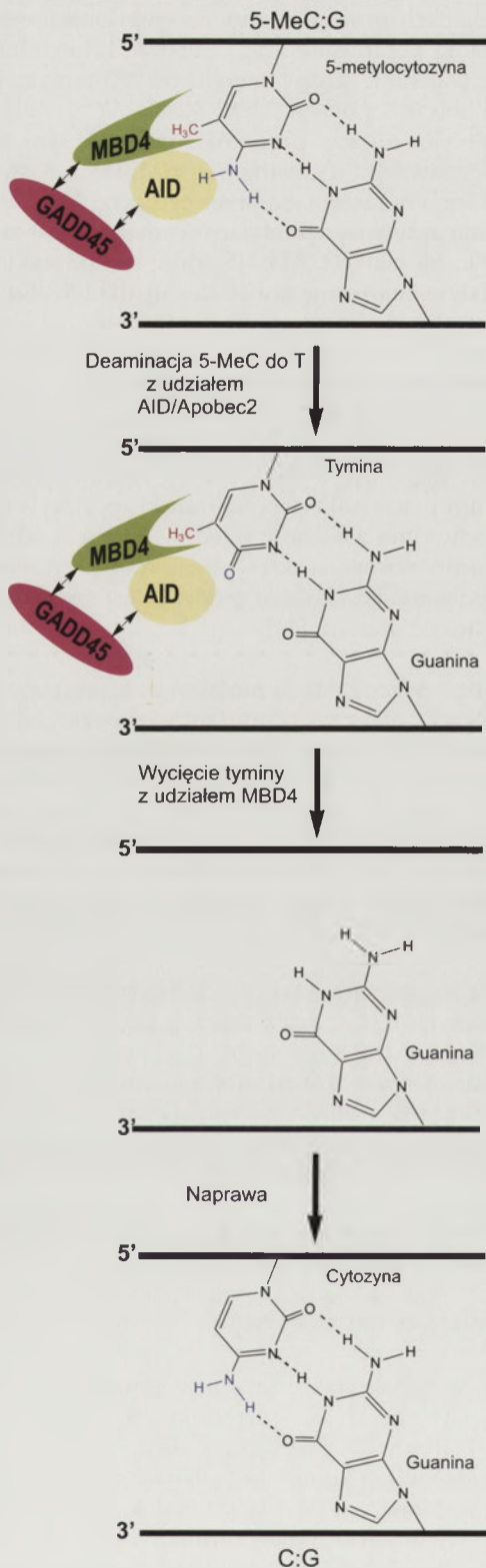
Stopień metylacji wysp CpG w obrębie promotorów określa informację o aktywności transkrypcyjnej w tych loci. Istnieje odwrotna zależność między stopniem metylacji w obrębie promotorów, a aktywnością transkrypcyjną odpowiedniego genu. Wyciszanie genów przez metylację zachodzi na kilku poziomach [41].

Model pierwszy zakłada zablokowanie oddziaływań metylowanego DNA z czynnikami transkrypcyjnymi. Zawada przestrzenna jaką stanowi grupa metylowa przyłączona do cytozyny powoduje, że niektóre czynniki transkrypcyjne, np.: E2F, CREB, NF-κB, c-Myc, AP2, w wyniku metylacji CpG tracą powinowactwo do rozpoznawanych sekwencji w DNA. Transkrypcja jest więc zahamowana z powodu braku możliwości powstania kompleksu DNA/czynnik transkrypcyjny [11].

Do hamowania transkrypcji dochodzi również, gdy do metylowanych CpG przyłączają się białka wiążące metylowane DNA (MBP, ang. *methyl-CpG binding proteins*) [54]. Zawierają one przy końcu aminowym zachowawczą domenę MBD (ang. *methyl-CpG binding domain*) rozpoznającą i wiążącą się do rejonów DNA, w których występuje 5-metylocytozyna. Ilość i lokalne zagęszczenie dinukleotydów CpG rozpoznawanych przez MBD, może decydować o sile wiązania tych białek do określonych sekwencji DNA [55]. Oksydacyjne uszkodzenia DNA, jak 8-oksyguanina, mogą hamować zdolność wiązania się białek MBP do zmienionych dinukleotydów CpG [56].

Represja transkrypcji może następować także wskutek zmian pojawiających się w architekturze rdzenia nukleosomu [54]. Białka MBP, przyłączając się do 5-metylocytozyny, jednocześnie wiążą kompleks białkowy składający się z deacetylaz histonowych (HDACs) i białek zależnych od ATP, przebudowujących strukturę chromatyny [54,57]. W efekcie następuje deacetylacja histonów, która prowadzi do zmiany struktury promotora poprzez zwiększenie kondensacji chromatyny, co z kolei utrudnia przyłączenie czynników transkrypcyjnych [58]. W przyłączeniu HDACs do metylowanych cytozyn mogą również brać udział metylotransferazy DNA, pełniąc funkcję supresorów transkrypcji [59,60].

Do białek wiążących metylowany DNA należą: MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 (Ryc. 5) [61,62]. MeCP2 wiąże się z DNA zawierającym pojedyncze symetrycznie me-



Rycina 4. Model aktywnej demetylacji DNA z udziałem białek AID i MBD4. (A) Oddziaływania pomiędzy AID i MBD4 za pośrednictwem białka GADD45. (B) Deaminacja 5-metylocytozyny do tyminy z udziałem białek AID/ Apobec2, skutkująca powstaniem błędnej pary T:G. (C) Wycięcie tyminy z udziałem MBD4 i powstanie miejsca apirymidynowego (miejsce AP). (D) przywrócenie pary C:G na drodze naprawy, z udziałem AP endonukleazy, polimerazy β , ligazy DNA. (zmodyfikowano wg [49]).

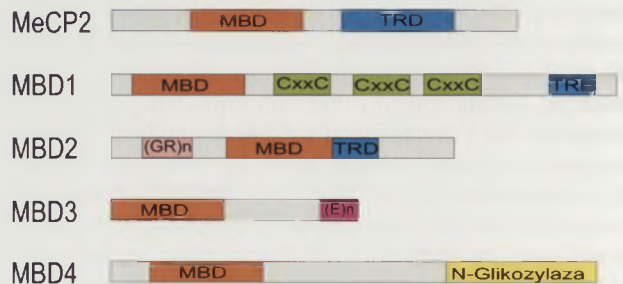
tylowane dinukleotydy CpG. Za bezpośrednie wiązanie się tego białka z DNA odpowiada domena wiążąca metylo-CpG (MBD). MeCP2 zawiera również domenę represji

transkrypcji (TRD, ang. *transcriptional repression domain*), która oddziałuje z korepresorem Sin3A i wspólnie powodują rekrutację deacetylaz histonów [63,64]. MBD1 oprócz domeny MBD oraz TRD, które odpowiadają za wiązanie się z metylowanym DNA, zawiera również motywy CxxC specyficznie wiążące niemetylowane sekwencje CpG promotorów [65]. MBD2 wykazuje powinowactwo tylko do metylowanego DNA. Białko to jest składnikiem kompleksu MeCP1 i uczestniczy w hamowaniu transkrypcji poprzez wiązanie się z deacetylazą histonową (HDAC1) [66]. Sugeruje się też, że MBD2b (izoforma krótsza o 140 reszt aminokwasowych) ma aktywność enzymu demetylującego 5-metylocytozynę [52,67]. MBD3 bezpośrednio nie wiąże się z metylowanym DNA, ale białko to wchodzi w skład kompleksu remodelującego chromatinę NuRD [68]. MBD4 jest natomiast białkiem o aktywności glikozylazy DNA, zaangażowanym w naprawę błędnie sparowanych zasad. MBD4 rozpoznaje i usuwa m.in. uracyl z pary U:G oraz tyminę z pary T:G, powstającej jako produkt deaminacji 5-metylocytozyny [8].

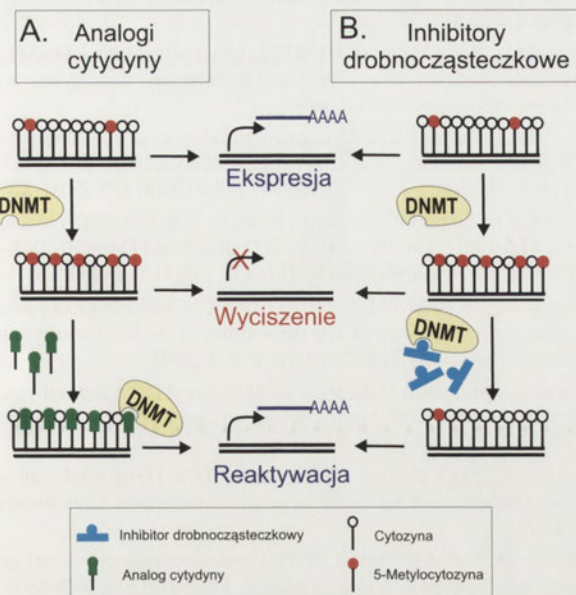
HAMOWANIE METYLACJI DNA I ZNACZENIE W TERAPII

U osób dorosłych wzór metylacji DNA jest tkankowo specyficzny i względnie stały. Wiadomo, że może on ulegać zmianom na wczesnych etapach rozwoju embrionalnego, w czasie różnicowania się komórek. Istotne zmiany w profilu metylacji DNA są powszechnie wykrywane w komórkach transformowanych nowotworowo. W wielu nowotworach wykazano, że inaktywacji genów supresorowych towarzyszy hipermetylacja ich regionów promotorowych [4,6,69,70]. Hipermetylacja w obrębie wysp CpG, które normalnie w genomie pozostają niemetylowane, jest czynnikiem hamującym proces transkrypcji i ekspresji genów. Biorąc pod uwagę, że geny supresorowe uczestniczą w różnicowaniu się komórek oraz są zaangażowane w regulację cyklu komórkowego, apoptozę i naprawę DNA, konsekwencje nadmiernej metylacji ich sekwencji promotorowych skutkującej wyciszeniem genów stają się oczywiste [71,72].

Wobec powyższego, związki hamujące proces metylacji DNA mogą odgrywać istotną rolę w terapii przeciwnowotworowej. Najbardziej znanymi inhibitorami metylotransferaz DNA (DNMTs) są zmodyfikowane w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego analogi cytydyny: 5-azacytydina, 5-aza-2'-deoksycytydina (decytabina) [70]. Mechanizmy farmakologicznego działania tych związków polega na ich przekształceniu w komórkach do trifosforanów deoksynukleotydu i wbudowaniu do nici DNA w miejsce cytozyn



Rycina 5. Schemat budowy białek wiążących zmetylowany DNA. Szczegółowy opis w tekście. (zmodyfikowano wg [54] i [64]).



Rycina 6. Porównanie mechanizmów działania inhibitorów DNMT. (A) Analogi cytydyny po przemianie w komórkach do trifosforanów deoksynukleotydów są wbudowane do DNA podczas replikacji, stając się substratem dla DNMT. Kowalencyjne związanie DNMT ze zmodyfikowanym pierścieniem pirymidynowym prowadzi do zahamowania aktywności enzymu. Kolejne rundy replikacyjne skutkują pasywną demetylacją DNA i reaktywacją ekspresji genu. (B) Inhibitory drobnocząsteczkowe, m.in. EGCG i RG108 blokują centrum aktywne DNMT, w wyniku czego bezpośrednio hamują działanie enzymu. (zmodyfikowano wg [75]).

podczas replikacji. Modyfikacja ta zostaje rozpoznana przez DNMT, a następnie dochodzi do kowalencyjnego związania metylotransferazy z DNA [73] (Ryc. 6A). Formowanie adduktów enzym-DNA powoduje zmniejszenie ilości aktywnych cząsteczek DNMT w jądrze, co w kolejnych rundach replikacyjnych skutkuje pasywną demetylacją DNA, a co za tym idzie – reaktywacją epigenetycznie wyciszonych genów. Kowalencyjne wiązanie się metylotransferaz z DNA jest prawdopodobnie odpowiedzialne za cytotoksyczność tych inhibitorów DNMT, zwłaszcza w wysokich dawkach. Niska stabilność w roztworach wodnych oraz wysoka toksyczność azanukleozydów znacznie ogranicza ich potencjał terapeutyczny [74]. Innym analogiem cytydyny, pozbawionym grupy aminowej przy C4 w pierścieniu pirymidynowym, jest zebularyna. Wykazuje ona podobny mechanizm działania do azanukleozydów. Zebularyna jest związkiem mniej toksycznym niż 5-azacytydyna i decytabina oraz bardziej stabilnym w roztworach wodnych, jednakże jego biodostępność po podaniu doustnym jest dość niska [75].

Inną grupą związków działających hamująco na DNMTs są inhibitory drobnocząsteczkowe, do których należą m.in. hydralazyna (lek o działaniu hipotensyjnym), prokaina (lek miejscowo znieczulający) czy prokainamid (lek przeciwarteryjny). Prokaina i prokainamid są pochodnymi kwasu 4-aminobenzoesowego, które mają zdolność przyłączania się do sekwencji bogatych w CpG, powodując zamaskowanie sekwencji docelowych dla metylotransferaz i tym samym zablokowanie wiązania tych enzymów z DNA [75]. Do grupy inhibitorów, które nie są analogami nukleozydów, należą również związki blokujące bezpośrednio aktywność metylotransferazy DNA, takie jak: galusan epigalokatechiny (EGCG), uznawany za najbardziej aktyw-

ny przedstawiciel polifenoli zielonej herbaty i pochodna L-tryptofanu (RG108). Mechanizm działania tych związków polega na zablokowaniu centrum aktywnego enzymu (Ryc. 6B). RG108 ze względu na dobre dopasowanie do centrum aktywnego DNMT1 oraz niską toksyczność jest atrakcyjnym kandydatem do dalszych badań nad zastosowaniem w terapii przeciwnowotworowej [75].

Alternatywnym mechanizmem zahamowania aktywności DNMT może być zastosowanie oligonukleotydów antysensownych skierowanych przeciwko mRNA dla DNMT. Hybrydyzacja oligonukleotydu antysensownego z komplementarnym mRNA może blokować translację, zmniejszając tym samym poziom metylotransferaz DNA [76].

PODSUMOWANIE

Metylacja DNA pełni ważną funkcję w złożonej i wieloetapowej regulacji ekspresji genów, których regiony promotorowe są bogate w sekwencje CpG. Przedstawione powyżej dane wskazują, że metylacja i ekspresja genów są procesami powiązаныmi ze sobą przez wiele elementów, takich jak: aktywność metylotransferaz DNA, czynniki transkrypcyjne, białka biorące udział w demetylacji, białka wiążące metylowany DNA, czynniki remodelujące strukturę chromatyny, acetylazy i deacetylazy histonów. Dalsze badania procesów epigenetycznych pozwolą lepiej zrozumieć mechanizmy ich działania, m.in. wzajemną zależność pomiędzy metylacją DNA a działaniem białek decydujących o strukturze chromatyny oraz aktywności genów. Szersza wiedza o epigenetycznych mechanizmach biorących udział w procesach transformacji nowotworowej oraz farmakologicznym regulowaniu stopnia metylacji DNA daje szansę na ulepszenie działań terapeutycznych w walce z chorobą nowotworową.

PIŚMIENICTWO

- Robertson KD (2005) DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 6: 597-610
- Esteller M (2003) Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 4: 351-358
- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6-21
- McCabe DC, Caudill MA (2005) DNA methylation, genomic silencing, and links to nutrition and cancer. *Nutr Rev* 63: 183-195
- Takai D, Jones PA (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3740-3745
- Costello JF, Plass C (2001) Methylation matters. *J Med Genet* 38: 285-303
- Pfeifer GP (2006) Mutagenesis at methylated CpG sequences. *Curr Top Microbiol Immunol* 301: 259-281
- Walsh CP, Xu GL (2006) Cytosine methylation and DNA repair. *Curr Top Microbiol Immunol* 301: 283-315
- Hermann A, Gowher H, Jeltsch A (2004) Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 61: 2571-2587
- Pradhan S, Esteve PO (2003) Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. *Clin Immunol* 109: 6-16
- Jeltsch A (2006) Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol* 301: 203-225
- Goll MG, Bestor TH (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74: 481-514
- Buryanov YI, Shevchuk TV (2005) DNA methyltransferases and structural-functional specificity of eukaryotic DNA modification. *Biochemistry (Mosc)* 70: 730-742

14. Abreu PA, Dellamora-Ortiz G, Leao-Ferreira LR, Gouveia M, Braggio E, Zalberg I, Santos DO, Bourguinhon S, Cabral LM, Rodrigues CR, Castro HC (2008) DNA methylation: a promising target for the twenty-first century. *Expert Opin Ther Targets* 12: 1035-1047
15. Robertson KD (2002) DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* 21: 5361-5379
16. Fatemi M, Hermann A, Pradhan S, Jeltsch A (2001) The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J Mol Biol* 309: 1189-1199
17. Chen T, Li E (2006) Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Curr Top Microbiol Immunol* 301: 179-201
18. Maison C, Almouzni G (2004) HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 296-304
19. Kim GD, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S (2002) Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J* 21: 4183-4195
20. Iida T, Suetake I, Tajima S, Morioka H, Ohta S, Obuse C, Tsurimoto T (2002) PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes Cells* 7: 997-1007
21. Hsieh CL (2005) The de novo methylation activity of Dnmt3a is distinctly different than that of Dnmt1. *BMC Biochem* 6: 6
22. Brenner C, Fuks F (2006) DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries. *Curr Top Microbiol Immunol* 301: 45-66
23. Siedlecki P, Zielenkiewicz P (2006) Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Biochim Pol* 53: 245-256
24. Dong A, Yoder JA, Zhang X, Zhou L, Bestor TH, Cheng X (2001) Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. *Nucleic Acids Res* 29: 439-448
25. Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A (2003) The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J Biol Chem* 278: 31717-31721
26. Liu K, Wang YF, Cantemir C, Muller MT (2003) Endogenous assays of DNA methyltransferases: Evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells *in vivo*. *Mol Cell Biol* 23: 2709-2719
27. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH (2006) Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 311: 395-398
28. Ge YZ, Pu MT, Gowher H, Wu HP, Ding JP, Jeltsch A, Xu GL (2004) Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. *J Biol Chem* 279: 25447-25454
29. Fuks F, Burgers WA, Godin N, Kasai M, Kouzarides T (2001) Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J* 20: 2536-2544
30. Gowher H, Jeltsch A (2002) Molecular enzymology of the catalytic domains of the Dnmt3a and Dnmt3b DNA methyltransferases. *J Biol Chem* 277: 20409-20414
31. Turek-Plewa J, Jagodzinski PP (2005) The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 10: 631-647
32. Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R (2000) Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5237-5242
33. Lin JG, Han L, Taghva A, O'Brien LE, Hsieh CL (2002) Murine de novo methyltransferase Dnmt3a demonstrates strand asymmetry and site preference in the methylation of DNA *in vitro*. *Mol Cell Biol* 22: 704-723
34. Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA (2002) Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* 22: 480-491
35. Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B (2002) DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 416: 552-556
36. Aapola U, Liiv I, Peterson P (2002) Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Res* 30: 3602-3608
37. Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S (2004) DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem* 279: 27816-27823
38. Gowher H, Liebert K, Hermann A, Xu G, Jeltsch A (2005) Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J Biol Chem* 280: 13341-13348
39. Kareta MS, Botello ZM, Ennis JJ, Chou C, Chedin F (2006) Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. *J Biol Chem* 281: 25893-25902
40. Kress C, Thomassin H, Grange T (2001) Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted? *FEBS Lett* 494: 135-140
41. Jeltsch A (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem* 3: 274-293
42. Kapoor A, Agius F, Zhu JK (2005) Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Lett* 579: 5889-5898
43. Bruniquel D, Schwartz RH (2003) Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol* 4: 235-240
44. Metivier R, Gallais R, Tiffocche C, Le Peron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, Ibberson D, Barath P, Demay F, Reid G, Benes V, Jeltsch A, Gannon F, Salbert G (2008) Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452: 45-50
45. Kangaspeka S, Stride B, Metivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche RP, Benes V, Gannon F, Reid G (2008) Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* 452: 112-115
46. Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J (2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 10: 475-478
47. Mhanni AA, McGowan RA (2004) Global changes in genomic methylation levels during early development of the zebrafish embryo. *Dev Genes Evol* 214: 412-417
48. Ikeda Y, Kinoshita T (2009) DNA demethylation: a lesson from the garden. *Chromosoma* 118: 37-41
49. Rai K, Huggins IJ, James SR, Karpf AR, Jones DA, Cairns BR (2008) DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell* 135: 1201-1212
50. Gehring M, Reik W, Henikoff S (2009) DNA demethylation by DNA repair. *Trends Genet* 25: 82-90
51. Sedgwick B (2004) Repairing DNA-methylation damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 148-157
52. Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M (1999) A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397: 579-583
53. Hendrich B, Guy J, Ramsahoye B, Wilson VA, Bird A (2001) Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev* 15: 710-723
54. Clouaire T, Stancheva I (2008) Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cell Mol Life Sci* 65: 1509-1522
55. Fraga MF, Ballestar E, Montoya G, Taysavang P, Wade PA, Esteller M (2003) The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. *Nucleic Acids Res* 31: 1765-1774
56. Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC (2004) Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* 32: 4100-4108
57. Feng Q, Zhang Y (2001) The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev* 15: 827-832

58. Leonhardt H, Cardoso MC (2000) DNA methylation, nuclear structure, gene expression and cancer. *J Cell Biochem Suppl* 35: 78-83
59. Jones PA, Takai D (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293: 1068-1070
60. Kimura H, Shiota K (2003) Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1. *J Biol Chem* 278: 4806-4812
61. Ballestar E, Wolffe AP (2001) Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur J Biochem* 268: 1-6
62. Hendrich B, Tweedie S (2003) The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends Genet* 19: 269-277
63. Wade PA (2001) Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene* 20: 3166-3173
64. Jorgensen HF, Bird A (2002) MeCP2 and other methyl-CpG binding proteins. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8: 87-93
65. Fujita N, Shimotake N, Ohki I, Chiba T, Saya H, Shirakawa M, Nakao M (2000) Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1. *Mol Cell Biol* 20: 5107-5118
66. Berger J, Bird A (2005) Role of MBD2 in gene regulation and tumorigenesis. *Biochem Soc Trans* 33: 1537-1540
67. Detich N, Theberge J, Szyf M (2002) Promoter-specific activation and demethylation by MBD2/demethylase. *J Biol Chem* 277: 35791-35794
68. Saito M, Ishikawa F (2002) The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2. *J Biol Chem* 277: 35434-35439
69. Belinsky SA (2004) Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 4: 707-717
70. Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3: 415-428
71. Esteller M (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21: 5427-5440
72. Gerson SL (2004) MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 4: 296-307
73. Stresemann C, Lyko F (2008) Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer* 123: 8-13
74. Lyko F, Brown R (2005) DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *J Natl Cancer Inst* 97: 1498-1506
75. Brueckner B, Kuck D, Lyko F (2007) DNA methyltransferase inhibitors for cancer therapy. *Cancer J* 13: 17-22
76. Peedicayil J (2006) Epigenetic therapy—a new development in pharmacology. *Indian J Med Res* 123: 17-24

Mechanism of DNA methylation and demethylation – its role in control of genes expression

Jolanta Guz[✉], Marek Foksiński, Ryszard Oliński

Department of Clinical Biochemistry, Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum in Bydgoszcz, 24 Karłowicza St., 85-092 Bydgoszcz, Poland

[✉]e-mail: jolaguz@cm.umk.pl

Key words: 5-methylcytosine, DNA methyltransferases, DNA methylation, DNA demethylation

ABSTRACT

Cytosine methylation is a post-replicative DNA modification associated with transcriptional repression. This process consists in covalent addition of a methyl group to cytosine within the CpG dinucleotide. DNA methylation is catalyzed by DNA methyltransferases which transfer a methyl group from S-adenosyl-L-methionine to cytosine bases in DNA. Methylation patterns are determined by DNA methyltransferases, but also by the process of DNA demethylation. This review describes biochemical aspects of DNA methylation and demethylation and its role in regulation of genes expression, as well as shows cytosine methylation as promising target for anticancer therapy.

Jolanta Guz

Marek Foksiński

Ryszard Oliński

Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz, tel. (52) 585 37 45, e-mail: jolaguz@cm.umk.pl

Artykuł otrzymano 30 czerwca 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 29 października 2009 r.

Słowa kluczowe: metylacja cytozyny, hipometylacja DNA, nowotwory, reaktywne formy tlenu

Wykaz skrótów: 5-metdC – 5-metylo-2'-deoksycytidyna; 8-oksydG – 8-oksyo-2'-deoksiguanozyna; 8-oksyoGua – 8-oksyoгуана; CSB – syntaza β-cystationowa; DNMT (ang. DNA methyltransferase) – metylotransferaza DNA; HERV – endogenne retrowirusy człowieka; HPCE (ang. high performance capillary electrophoresis) – elektroforeza kapilarna; HPLC (ang. high performance liquid chromatography) – wysokosprawna chromatografia cieczowa; LINE (ang. long interspersed nuclear elements) – długie rozproszone elementy jądrowe; MBD (ang. methyl-CpG binding domain) – domena wiążąca metylo-CpG; MTR – syntaza metioninowa; MTHFR – reduktaza metylenotetrahydrofolianowa; PCNA (ang. proliferating cell nuclear antigen) – jądrowy antygen komórek proliferujących; RFT – reaktywne formy tlenu; SINE (ang. short interspersed nuclear elements) – krótkie rozproszone elementy jądrowe; THF – tetrahydrofolian

Podziękowania: Autorzy są partnerami sieci doskonałości ECNIS (Environmental Cancer Risk, Nutrition and Individual Susceptibility, contract No 513943). Praca częściowo finansowana w ramach projektu MNiSW nr 1021/6. PR UE/2009/7.

STRESZCZENIE

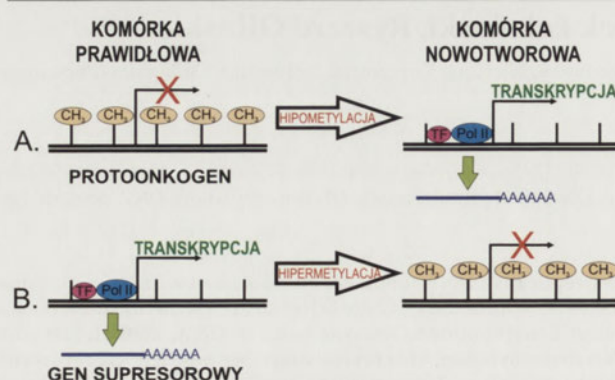
Metylacja DNA odgrywa istotną rolę w regulacji ekspresji genów. Komórki nowotworowe wykazują zmiany w profilu metylacji DNA, identyfikowane jako lokalna hipermetylacja wysp CpG oraz globalna hipometylacja genomu. Hipometylacji ulegają liczne sekwencje powtórzone i elementy transpozonowe, co może skutkować niestabilnością chromosomową i wzrostem częstości mutacji. Poniższy artykuł jest próbą podsumowania obecnego stanu wiedzy o roli mechanizmów epigenetycznych w nowotworach, szczególnie związku hipometylacji DNA z procesem nowotworzenia.

WPROWADZENIE

Metylowana cytozyna jest ważnym epigenetycznym czynnikiem regulującym ekspresję genów, którego obecność lub brak ma istotne znaczenie dla procesu przekazywania informacji genetycznej. Uważa się, że aktywne transkrypcyjne regiony genomu charakteryzują się niską zawartością zmetylowanej cytozyny, podczas gdy obecność metylowanych dinukleotydów CpG w obrębie regionów promotorowych genów może skutkować zahamowaniem transkrypcji, brakiem ekspresji tych genów, a co za tym idzie – utratą funkcji ich produktów [1]. Warunkiem wyciszenia ekspresji genu wskutek metylacji DNA jest utworzenie odpowiedniej struktury chromatyny. Tym samym, w epigenetycznych zjawiskach regulacji ekspresji genów niemniej ważną rolę co metylacja DNA, odgrywają kowalencyjne modyfikacje histonów, m.in. reakcje acetylacji i deacetylacji. W przeciwieństwie do acetylacji, deacetylacja histonów prowadzi do kondensacji chromatyny, która staje się niedostępna dla czynników transkrypcyjnych. Związek metylacji DNA i modyfikacji histonów nie jest do końca poznany. Niemniej w układzie tym istotną rolę odgrywają białka wiążące się do metylowanych sekwencji CpG (MBP, ang. *methyl-CpG binding proteins*), jak i same metylotransferazy DNA, które mogą przyłączać deacetylasy histonowe (HDAC) oraz białka remodelujące chromatynę [2,3].

Wyniki wielu badań wskazują, że mechanizmy związane z epigenetyczną kontrolą ekspresji genów odgrywają istotną rolę w patogenezie nowotworów. Profil metylacji genomowego DNA w komórkach nowotworowych różni się od obserwowanego w komórkach prawidłowych. W komórkach transformowanych nowotworowo obserwuje się globalną hipometylację genomu oraz towarzyszącą jej nadmierną metylację wysp CpG, które w prawidłowym genomie nie ulegają metylacji [4-6]. Zarówno hipometylacja, jak i hipermetylacja DNA wywierają określony efekt i mogą mieć wpływ na proces powstawania nowotworu (Ryc. 1).

Warto wspomnieć, że zmieniony wzór metylacji DNA obserwuje się również w niektórych chorobach autoimmunologicznych. Przykładem mogą być bada-



Rycina 1. Zmiany wzoru metylacji genów kontrolujących cykl komórkowy i różnicowanie w komórkach nowotworowych.

nia przeprowadzone u pacjentów z toczeniem rumieniowatym układowym (SLE, ang. *systemic lupus erythromatosus*), u których stwierdzono globalną hipometylację w limfocytach T [7,8].

ZMIANY WZORU METYLACJI DNA W PROCESIE KANCEROGENEZY

Hipermetylacja wysp CpG może być związana z transkrypcyjnym wyciszeniem genów supresorowych oraz genów naprawy DNA [9,10]. Hamowanie ekspresji tych genów w konsekwencji pozbawia komórkę niezbędnych ograniczeń w proliferacji, a także zmniejszona zostaje szansa na przeprowadzenie ewentualnej śmierci apoptotycznej, w której ważną rolę odgrywają geny supresorowe. Również osłabienie wydajności naprawy DNA, wynikające z unieczynnienia genów kodujących białka uczestniczące w naprawie, może w istotny sposób zwiększać ryzyko rozwoju nowotworu [4,5]. Wśród genów, w których zaobserwowano zwiększony poziom metylacji sekwencji CpG w regionach promotorowych współzależny od spadku ich ekspresji, są m.in.: *p14, p15, p16, GSTP1, APC, BRCA1, RB, VHL, RASS-F1A, MGMT, hMLH1* [9-11].

Globalna hipometylacja DNA może wpływać na rozwój nowotworu poprzez obniżenie stabilności chromosomów, aktywację protoonkogenów oraz innych genów związanych z inwazyjnością i metastazą nowotworu. Hipometylacji ulegają głównie powtórzone sekwencje centromerowe i telomerowe, a także sekwencje transpozycyjne. W komórkach somatycznych i dojrzałych komórkach płciowych większość transpozycjonów i retrosekwencji wykazuje wysoki poziom metylacji [1,12]. Zmniejszenie stopnia metylacji genomu może prowadzić do aktywacji transpozycjonów, powodując ich transpozycję i rekombinację [13]. Z przemieszczaniem transpozycjonów w obrębie genomu związane mogą być zmiany w DNA, typu delekcje, inwersje czy duplikacje powodujące utratę funkcji lub wzmożoną ekspresję genów, co w konsekwencji prowadzić może do obniżenia stabilności chromosomów.

Hipometylację sekwencji repetytywnych DNA satelitarnego (*Sat1, Sat2, Sat3*) obserwowano w różnych typach nowotworów, m.in.: w nowotworach sutka, jajnika, nerek, wątroby [14]. Stwierdzono, że demetylacja DNA satelitarnego współzależny od obniżonej zawartości 5-metylocytozyny w DNA komórek rakowych [15]. Liczne dane doświadczalne donoszą o obniżonej metylacji cytozyny także w powtórzeniach rozproszonych LINE (długie rozproszone elementy jądrowe, ang. *long interspersed nuclear elements*) oraz SINE (krótkie rozproszone elementy jądrowe, ang. *short interspersed nuclear elements*) reprezentowanych głównie przez sekwencje *Alu*. Hipometylację w sekwencjach LINE-1 wykazano w nowotworach pęcherza moczowego, stercza, jajnika, wątroby, a także jelita grubego. Zmniejszony stopień metylacji DNA w sekwencjach *Alu* obserwowano głównie w komórkach nowotworów zarodkowych [12,14]. Kolejną klasą retroelementów wykazujących hipometylację w komórkach transformowanych nowotworowo są endogenne retrowirusy (HERV). Obniżoną metylację HERV stwierdzono m.in. w komórkach nowotworowych pęcherza moczowego i jajnika [12,14]. Biorąc pod uwagę fakt, iż sateli-

tarne DNA stanowi 10% genomu, natomiast powtórzenia rozproszone ok. 40-45% genomu, można przypuszczać, że demetylacja sekwencji repetytywnych przyczynia się do globalnej hipometylacji DNA obserwowanej w niektórych komórkach nowotworowych.

Poza globalną hipometylacją genomu w nowotworach człowieka obserwuje się hipometylację regionów promotorowych protoonkogenów. Uważa się, że hipometylacja protoonkogenów może przyczyniać się do nadekspresji tych genów i aktywacji ich produktów, a co za tym idzie - nadmiernej proliferacji komórkowej [15]. Hipometylację protoonkogenów wykazano w wielu ludzkich komórkach nowotworowych, np. *Ras* w nowotworach jelita grubego i płuc, *c-Myc* w raku wątrobowokomórkowym, raku pęcherza moczowego, raku jelita grubego, *Erb-A1* w przewlekłej białaczce limfatycznej [16,17].

Uważa się, że zmniejszenie stopnia metylacji DNA może odgrywać również ważną rolę w procesie metastazy. W różnych ludzkich nowotworach wykazano, że hipometylacja DNA indukuje ekspresję genów, których produkty białkowe zaangażowane są w proliferację, inwazyjność i zdolność komórek nowotworowych do przerzutowania. Należą do nich m.in.: urokinazowy aktywator plazminogenu (uPA) [18-20], heparanaza [21,22], białko S100A4 wiążące wapń [23].

GLOBALNA HIPOMETYLACJA DNA A NOWOTWORY

Istnieje wiele danych literaturowych, w których obniżony poziom 5-metylocytozyny w komórkach nowotworowych w stosunku do komórek prawidłowych, obserwowano w różnych typach nowotworów ludzi i zwierząt. W badaniach tych do oceny zawartości 5-metylocytozyny wykorzystuje się różne metody bezpośrednie i pośrednie, takie jak: HPLC, elektroforezę kapilarną (HPCE, ang. *high performance capillary electrophoresis*), metodę immunohistochemiczną (IHC), metodę wbudowywania znakowanych izotopowo [³H] grup metylowych do DNA.

U szczurów z pierwotnym rakiem wątroby w tkankach nowotworowych stwierdzono obniżoną metylację DNA o ok. 20-45% w porównaniu z wątrokami zdrowych zwierząt. Podobnie u chomików, u których indukowano nowotwór nerek estrogenami odnotowano 11-24% spadek metylacji DNA w guzie w stosunku do tkanki zdrowej [24].

W badaniach z wykorzystaniem metody HPLC, wykazano 10-20% niższą zawartość 5-metylocytozyny w genomach komórek różnych złośliwych nowotworów niż w komórkach prawidłowych [15,24]. Hipometylację DNA tkanek zmienionych nowotworowo w odniesieniu do DNA odpowiadających im tkanek zdrowych wykazano m.in.: w raku wątrobowo-komórkowym [25], raku żołądka [26], raku stercza [27], raku sutka [28,29], nowotworach układu krwiotwórczego, szczególnie w przewlekłej białaczce limfatycznej [30].

Liczne badania poświęcone są analizie stopnia metylacji DNA u chorych na nowotwory jelita grubego. W badaniach wykorzystujących metodę immunohistochemiczną wyka-

ziano niższy o 17-29% poziom metylacji cytozyny w DNA gruczolakoraków jelita grubego niż w odpowiadających im tkankach zdrowych [31]. Korzystając z metody elektroforezy kapilarnej, Esteller i wsp. wykazali obniżoną zawartość 5-metylocytozyny w DNA komórek nowotworowych zarówno u pacjentów ze sporadycznym, jak i dziedzicznym rakiem jelita grubego [28]. Hipometylację DNA komórek rakowych w porównaniu ze zdrowymi śluzówkami jelita grubego wykazano również stosując metodę opartą na ocenie zdolności włączania znakowanych izotopowo [³H] grup metylowych [32]. Podobne rezultaty zostały uzyskane również w badaniach z wykorzystaniem techniki HPLC, w których obserwowano niższy odsetek zmetylowanej cytozyny w guzach nowotworowych w stosunku do zdrowych fragmentów jelita grubego [33].

Hipometylację DNA odnotowano nie tylko w nowotworach złośliwych, ale również w polipach jelita grubego. Wykazano spadek poziomu 5-metylocytozyny w DNA izolowanym z gruczolaków i gruczolakoraków jelita grubego (o odpowiednio 8% i 10%) w stosunku do poziomu metylacji DNA normalnej śluzówki osób zdrowych oraz brak istotnych różnic między metylacją DNA guzów łagodnych i złośliwych [15]. Obniżony poziom zmetylowanej cytozyny obserwowano również w sąsiadujących z guzem fragmentach jelita grubego wolnych od zmian nowotworowych [34]. W naszych niedawno opublikowanych badaniach do porównania stopnia metylacji cytozyny w komórkowym DNA osób zdrowych i chorych ze zdiagnozowanymi gruczolakorakami oraz polipami jelita grubego wykorzystano dodatkowo DNA leukocytów krwi obwodowej. Zaobserwowano sekwencyjne obniżanie stopnia metylacji cytozyny w kolejności: DNA leukocytów osób zdrowych, DNA leukocytów pacjentów z polipami i nowotworami, DNA zdrowych tkanek jelita grubego, DNA tkanek nowotworowych. Średnia zawartość 5-metdC w DNA leukocytarnym osób z grupy kontrolnej (3,59%) była istotnie wyższa w stosunku do grupy pacjentów z polipami (3,38%) oraz pacjentów z nowotworami jelita grubego (3,40%) [33]. Wahlfors i wsp. uzyskali podobną średnią zawartość zmetylowanej cytozyny w DNA leukocytów osób zdrowych (3,68±0,41%), a ponadto wykazali znacznie obniżoną zawartość 5-metdC (2,71±0,46%) w DNA leukocytów pacjentów chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną [30]. Dane te mogą sugerować, iż odsetek zmetylowanej cytozyny ulega znacznemu zmniejszeniu, w komórkach które uległy transformacji nowotworowej, ale jest również obniżony w DNA innych komórek organizmu, nie objętych bezpośrednio procesem nowotworowym. Obserwowany istotnie obniżony poziom metylacji w DNA leukocytów chorych na nowotwory i u pacjentów z polipami jelita grubego sugeruje, że hipometylacja DNA jest zjawiskiem sygnalizującym wczesne etapy powstawania nowotworu i może odgrywać istotną rolę w inicjacji kancerogenezy.

Bariol i wsp. w swoich badaniach obserwowali wyższą zawartość 5-metylocytozyny w DNA normalnej śluzówki jelita grubego niż w DNA rozrostowych zmian jelita grubego, zarówno łagodnych, jak i złośliwych. Nie stwierdzili natomiast istotnych różnic pomiędzy stopniem metylacji DNA polipów hiperplastycznych, małych gruczolaków (<10mm), dużych gruczolaków oraz raków jelita grubego

[32]. W badaniach *in vitro* wykazali natomiast, że stopień metylacji genomowego DNA stymulowanych limfocytów jest odwrotnie zależny od tempa ich proliferacji. Podobną zależność stwierdzili w komórkach polipów zarówno hiperplastycznych, jak i gruczolakowatych [32]. Rezultaty te sugerują, że obniżona metylacja DNA w obu typach polipów oraz nowotworach złośliwych w stosunku do metylacji normalnej śluzówki może odzwierciedlać wzmożoną proliferację komórkową. W tych samych badaniach nie odnotowano zależności między stopniem demetylacji DNA tkanek nowotworowych a stopniem zróżnicowania i zaawansowania nowotworu, rozmiarem oraz umiejscowieniem guza [32].

MOŻLIWE PRZYCZYNY HIPOMETYLACJI DNA

Mechanizm prowadzący do hipometylacji DNA u chorych na nowotwory nie jest do końca wyjaśniony. Proponowanych jest kilka możliwości, m.in. niedobory prekursorów S-adenozylometioniny czy kwasu foliowego w diecie lub genetyczne zaburzenia w szlaku metabolicznym donorów grup metylowych. Możliwe jest również, że hipometylacja jest rezultatem dysfunkcji metylotransferaz lub deregulacji enzymów demetylujących, jednak dane literaturowe w tej kwestii nie są jednoznaczne. Utratę funkcji DNMT1, skutkującą demetylacją DNA, obserwowano w wielu eksperymentach z użyciem inhibitorów metylotransferaz, takich jak 5-aza-2'-deoksycytidyna. Z doświadczeń prowadzonych na myszach wynika, że obniżenie ekspresji genu *Dnmt1* do 10% powoduje hipometylację sekwencji repetytywnych genomu [35]. Brak jest jednak danych literaturowych wskazujących na bezpośredni związek pomiędzy obniżonym poziomem DNMT1 a globalną hipometylacją genomu w ludzkich nowotworach. W komórkach nowotworowych najczęściej obserwuje się wzrost aktywności DNMT1, co najprawdopodobniej związane jest z hipermetylacją wysp CpG sekwencji promotorowych genów supresorowych [1,14]. Również w przypadku białek uczestniczących w demetylacji DNA rezultaty badań są rozbieżne. Wysoką ekspresję MBD2 powiązaną z demetylacją wysp CpG w regionie promotorowym *c-Erb-B2* wykazano w raku jajnika [36]. Również w raku sutki stwierdzono istotnie wyższy poziom mRNA MBD2 niż w tkance prawidłowej [37]. W przypadku raka płuc [38], raka żołądka i jelita grubego [39] obserwowano jednak odwrotną zależność.

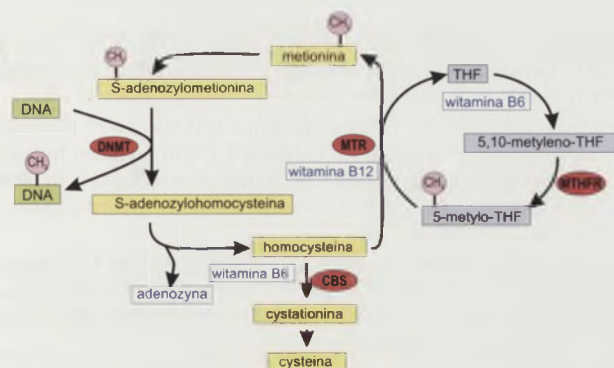
Wyniki wielu badań wskazują na zależność pomiędzy prawidłowym wzorem metylacji DNA a zawartością w diecie takich składników, jak: metionina, cholina, kwas foliowy, witamina B12. Rezultaty doświadczeń prowadzonych na zwierzętach dowodzą, że długotrwałe stosowanie diety pozbawionej folianów i donorów grup metylowych skutkuje globalną hipometylacją genomowego DNA, a także prowadzi do rozwoju nowotworu wątroby [35,40]. Globalną hipometylację DNA po zastosowaniu diety z niedoborem folianów obserwowano także w ludzkich limfocytach [24]. Podobnie obniżony poziom kwasu foliowego wraz z hipometylacją DNA odnotowano w śluzówce jelita grubego chorych z nowotworami, jak i polipami, w komórkach szyjki macicy z różnym stopniem dysplazji, w komórkach raka płaskonabłonkowego płuc [41]. Badania epidemiologiczne wskazują ponadto na odwrotną zależność pomiędzy

zawartością folianów w diecie a częstością zachorowania na nowotwory, zwłaszcza raka jelita grubego [24]. Warto także zauważyć, że obniżony stopień metylacji DNA wykazano w przypadkach ekspozycji na niektóre związki chemiczne, jak arsen, trichloroetylen, dietanolamina, alkohol [35].

Utrzymanie prawidłowego wzoru metylacji DNA zależy od wystarczającej ilości grup metylowych, których donorem jest nie tylko metionina pochodząca z diety, ale też z endogennej, zależnej od folianów, resyntezy z homocysteiny. Enzymem zaangażowanym w ten proces jest syntaza metioninowa (MTR), a także reduktaza metylenotetrahydrofolianowa (MTHFR), przekształcająca 5,10-metylenotetrahydrofolian w 5-metylotetrahydrofolian, będący donorem grup metylowych (Ryc. 2) [42]. Można przypuszczać, że mutacje i polimorficzne warianty genów kodujących enzymy uczestniczące w szlaku metabolicznym grup metylowych mogą być odpowiedzialne za różnice w stopniu metylacji DNA [42]. Mutacja w genie *MTHFR* (C677T) powoduje zamianę reszty alaniny na resztę waliny w białku enzymatycznym, co skutkuje jego obniżoną aktywnością. Paz i wsp. wykazali obniżoną średnią zawartość 5-metylocytozyny w DNA guzów nowotworowych w stosunku do odpowiadających im tkanek zdrowych, a ponadto u chorych na nowotwory z genotypem homozygotycznym *MTHFR-677TT* i heterozygotycznym *MTHFR-677CT* obserwowali znacznie niższą zawartość zmetylowanej cytozyny w DNA tkanek prawidłowych w porównaniu z homozygotami *MTHFR-677CC*. Również badania prowadzone na zdrowych ochotnikach, wykazały hipometylację DNA leukocytnego w genotypach homozygotycznych *MTHFR-677TT* w porównaniu z wariantem dzikim [43]. Inne wyniki badań wskazują, że krótkotrwałe obniżenie zawartości kwasu foliowego w diecie nie jest wystarczające do zmiany stopnia metylacji DNA leukocytów osób z genotypem *MTHFR-677CC* [44].

METYLACJA DNA A STRES OKSYDACYJNY

Komórka ulega transformacji nowotworowej wskutek utraty kontroli nad procesami wzrostu i różnicowania, co związane jest z nagromadzeniem mutacji w materiale genetycznym komórki. Obecnie uważa się, że istotną rolę w inicjacji, promocji oraz progresji kancerogenezy odgrywają mechanizmy oksydacyjne. Proces powstawania nowotworu może mieć związek z uszkodzeniami DNA wywołanymi działaniem reaktywnych form tlenu (RFT), szczególnie rodnika hydroksylowego ($\cdot\text{OH}$), jednego z najsilniejszych

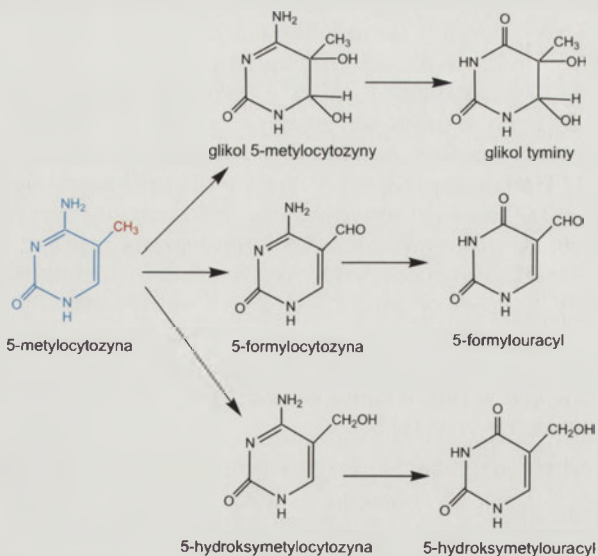


Rycina 2. Metabolizm donorów grup metylowych (zmodyfikowano wg [40]).

utleniający komórkowych. Jedną z najczęściej analizowanych oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych DNA o właściwościach mutagennych jest 8-oksyguanina (8-oksyoGua) [45,46]. Jeżeli w procesie replikacji DNA naprzeciwko 8-oksyoGua zostanie włączona adenina, to po dwóch rundach replikacyjnych pojawi się transwersja G→T. Transwersje GC→TA typowe dla błędnego parowania 8-oksyoGua, są obserwowane *in vivo*, jako częste przyczyny mutacji protoonkogenu *Ras* i genu supresorowego *p53*. Na rolę jaką mogą odgrywać oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe w procesie kancerogenezy wskazują wyniki badań, w których wykazano znacznie wyższy poziom 8-oksyo-2'-deoksyguanozyny (8-oksyoG) w tkankach nowotworowych w porównaniu z obrzeżami wolnymi od zmian nowotworowych [45].

Jest też możliwe, że zwiększony poziom 8-oksyoG może mieć związek ze zmienionym wzorem metylacji DNA i w ten sposób wpływać na proces kancerogenezy [47]. W badaniach przeprowadzonych przez nasz zespół została wykazana wysoce znamienna statystycznie ujemna korelacja pomiędzy poziomem 8-oksyoG a stopniem metylacji cytozyny w DNA leukocytów osób zdrowych [33]. W doświadczeniu *in vitro*, przy użyciu oligonukleotydów zawierających 8-oksyoG, wykazano że obecność tej oksydacyjnie zmodyfikowanej zasady azotowej w sekwencjach CCGG hamuje metylację sąsiadujących reszt cytozynowych [47,48]. Stwierdzono znacznie zmniejszoną zdolność metylowania cytozyny przez ludzką metylotransferazę DNA, gdy 8-oksyoG występuje w odległości jednego lub dwóch nukleotydów po stronie 3' cytozyny w tej samej nici [48]. Można przypuszczać, że wzrost poziomu 8-oksyoG w DNA może prowadzić do kancerogenezy nie tylko z powodu właściwości mutagennych, ale także wpływając na proces metylacji cytozyny, a przez to na ekspresję genów. Valinluck i wsp. wykazali ponadto, że utlenienie guaniny w sekwencjach CpG znacznie hamuje przyłączanie białek specyficznie rozpoznających metylowane CpG. Białka te nie tylko odgrywają rolę w hamowaniu ekspresji genów, ale również posiadają zdolność wiązania metylotransferaz DNA, deacetylaz histonowych i innych białek zaangażowanych w remodelowanie chromatyne [49].

5-Metylocytozyna, podobnie jak cztery podstawowe nukleozydy DNA, w wyniku działania RFT, głównie rodnika hydroksylowego, może ulegać oksydacyjnym modyfikacjom. Reakcja 5-metylocytozyny z reaktywnymi formami tlenu prowadzi do powstania wielu produktów, m.in. glikolu 5-metylocytozyny, który jest niestabilnym intermedialem i ulega deaminacji do glikolu tyminy, 5-hydroksymetylocytozyny oraz 5-formylocytozyny, z których w reakcji deaminacji powstaje 5-hydroksymetylouracyl i 5-formylouracyl (Ryc. 3) [50,51]. Wykazano też, że reaktywne formy tlenu mogą modyfikować wyspy CpG, generując wiązania między 5-metylocytozyną a sąsiadującą guaniną, jak również między cytozyną a guaniną [52,53]. Efektem końcowym oddziaływania reaktywnych form tlenu na 5-metylocytozynę może być obniżenie zawartości tej zmetylowanej zasady w genomowym DNA utrwalane w kolejnych podziałach komórkowych. Wykazano również, że oksydacyjna modyfikacja 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny uniemożliwia metylację zachowawczą reszty cytozyny w



Rycina 3. Produkty reakcji 5-metylocytozyny z reaktywnymi formami tlenu.

nici komplementarnej podczas replikacji. Wyniki te sugerują, że zredukowana aktywność DNMT1 w stosunku do oksydacyjnie zmodyfikowanych metylowanych CpG może stanowić jedną z przyczyn zmienionego wzoru metylacji DNA obserwowanego w komórkach nowotworów człowieka [54].

PODSUMOWANIE

Pomimo że mechanizmy epigenetyczne, zwłaszcza przyczyny hipometylacji DNA, u chorych na nowotwory nie zostały do końca wyjaśnione, to cechy nieprawidłowej metylacji mogą mieć duże znaczenie kliniczne. Wyniki badań analizowane w tej pracy wskazują, że zmniejszenie zawartości zmetylowanej cytozyny związane jest z rozwojem nowotworu. U pacjentów z chorobą nowotworową spadek metylacji DNA jest charakterystyczny dla komórek, które uległy transformacji nowotworowej, ale być może zachodzi również w innych tkankach, nie objętych procesem nowotworowym, m.in. w leukocytach krwi obwodowej. Możliwe jest również, że stres oksydacyjny oraz oksydacyjne uszkodzenia DNA mogą być czynnikami wpływającymi na proces metylacji DNA.

PIŚMIENNICTWO

- Wilson AS, Power BE, Molloy PL (2007) DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1775: 138-162
- Ballestar E, Esteller M (2002) The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. *Carcinogenesis* 23: 1103-1109
- D'Alessio AC, Szyf M (2006) Epigenetic tete-a-tete: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem Cell Biol* 84: 463-476
- Watson RE, Curtin GM, Doolittle DJ, Goodman JI (2003) Progressive alterations in global and GC-rich DNA methylation during tumorigenesis. *Toxicol Sci* 75: 289-299
- Worm J, Guldberg P (2002) DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J Oral Pathol Med* 31: 443-449
- Clark SJ, Melki J (2002) DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene* 21: 5380-5387

- Ballestar E, Esteller M, Richardson BC (2006) The epigenetic face of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 176: 7143-7147
- Sekigawa I, Kawasaki M, Ogasawara H, Kaneda K, Kaneko H, Takasaki Y, Ogawa H (2006) DNA methylation: its contribution to systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Med* 6: 99-106
- Esteller M (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21: 5427-5440
- Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE, Menounos PG (2002) DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum Genet* 111: 115-127
- Verma M, Srivastava S (2002) Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. *Lancet Oncol* 3: 755-763
- Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR (2006) Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 310: 211-250
- Kazazian HH, Jr. (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303: 1626-1632
- Hoffmann MJ, Schulz WA (2005) Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem Cell Biol* 83: 296-321
- Ehrlich M (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21: 5400-5413
- Kisseljova NP, Kisseljev FL (2005) DNA demethylation and carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 70: 743-752
- Szyf M (2003) DNA methylation and cancer therapy. *Drug Resist Updat* 6: 341-353
- Guo Y, Pakneshan P, Gladu J, Slack A, Szyf M, Rabbani SA (2002) Regulation of DNA methylation in human breast cancer. Effect on the urokinase-type plasminogen activator gene production and tumor invasion. *J Biol Chem* 277: 41571-41579
- Pakneshan P, Szyf M, Farias-Eisner R, Rabbani SA (2004) Reversal of the hypomethylation status of urokinase (uPA) promoter blocks breast cancer growth and metastasis. *J Biol Chem* 279: 31735-31744
- Pakneshan P, Szyf M, Rabbani SA (2005) Hypomethylation of urokinase (uPA) promoter in breast and prostate cancer: prognostic and therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 5: 471-488
- Ogishima T, Shiina H, Breault JE, Terashima M, Honda S, Enokida H, Urakami S, Tokizane T, Kawakami T, Ribeiro-Filho LA, Fujime M, Kane CJ, Carroll PR, Igawa M, Dahiya R (2005) Promoter CpG hypomethylation and transcription factor EGR1 hyperactivate heparanase expression in bladder cancer. *Oncogene* 24: 6765-6772
- Ogishima T, Shiina H, Breault JE, Tabatabai L, Bassett WW, Enokida H, Li LC, Kawakami T, Urakami S, Ribeiro-Filho LA, Terashima M, Fujime M, Igawa M, Dahiya R (2005) Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 11: 1028-1036
- Rosty C, Ueki T, Argani P, Jansen M, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Goggins M (2002) Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation. *Am J Pathol* 160: 45-50
- Dunn BK (2003) Hypomethylation: one side of a larger picture. *Ann N Y Acad Sci* 983: 28-42
- Lin CH, Hsieh SY, Sheen IS, Lee WC, Chen TC, Shyu WC, Liaw YF (2001) Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* 61: 4238-4243
- Kaneda A, Tsukamoto T, Takamura-Enya T, Watanabe N, Kaminishi M, Sugimura T, Tatematsu M, Ushijima T (2004) Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation. *Cancer Sci* 95: 58-64
- Brothman AR, Swanson G, Maxwell TM, Cui J, Murphy KJ, Herrick J, Speights VO, Isaac J, Rohr LR (2005) Global hypomethylation is common in prostate cancer cells: a quantitative predictor for clinical outcome? *Cancer Genet Cytogenet* 156: 31-36
- Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, Trojan J, Vaur-Barriere C, Bignon YJ, Ramus S, Benitez J, Caldes T, Akiyama Y, Yuasa Y, Launonen V, Canal MJ, Rodriguez R, Capella

- G, Peinado MA, Borg A, Aaltonen LA, Ponder BA, Baylin SB, Herman JG (2001) DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 10: 3001-3007
29. Jackson K, Yu MC, Arakawa K, Fiala E, Youn B, Fiegl H, Muller-Holzner E, Widschwendter M, Ehrlich M (2004) DNA hypomethylation is prevalent even in low-grade breast cancers. *Cancer Biol Ther* 3: 1225-1231
30. Wahlfors J, Hiltunen H, Heinonen K, Hamalainen E, Alhonen L, Janne J (1992) Genomic hypomethylation in human chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 80: 2074-2080
31. Hernandez-Blazquez FJ, Habib M, Dumollard JM, Barthelemy C, Benchaib M, de Capoa A, Niveleau A (2000) Evaluation of global DNA hypomethylation in human colon cancer tissues by immunohistochemistry and image analysis. *Gut* 47: 689-693
32. Bariol C, Suter C, Cheong K, Ku SL, Meagher A, Hawkins N, Ward R (2003) The relationship between hypomethylation and CpG island methylation in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 162: 1361-1371
33. Guz J, Foksinski M, Siomek A, Gackowski D, Rozalski R, Dziaman T, Szpila A, Olinski R (2008) The relationship between 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine level and extent of cytosine methylation in leukocytes DNA of healthy subjects and in patients with colon adenomas and carcinomas. *Mutat Res* 640: 170-173
34. Suter CM, Martin DI, Ward RL (2004) Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. *Int J Colorectal Dis* 19: 95-101
35. Pogribny IP, Beland FA (2009) DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. *Cell Mol Life Sci* 66: 2249-2261
36. 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
37. Billard LM, Magdinier F, Lenoir GM, Frappart L, Dante R (2002) MeCP2 and MBD2 expression during normal and pathological growth of the human mammary gland. *Oncogene* 21: 2704-2712
38. Sato M, Horio Y, Sekido Y, Minna JD, Shimokata K, Hasegawa Y (2002) The expression of DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins is not associated with the methylation status of p14(ARF), p16(INK4a) and RASSF1A in human lung cancer cell lines. *Oncogene* 21: 4822-4829
39. Kanai Y, Ushijima S, Nakanishi Y, Hirohashi S (1999) Reduced mRNA expression of the DNA demethylase, MBD2, in human colorectal and stomach cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 962-966
40. McCabe DC, Caudill MA (2005) DNA methylation, genomic silencing, and links to nutrition and cancer. *Nutr Rev* 63: 183-195
41. Johnson IT, Belshaw NJ (2008) Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. *Food Chem Toxicol* 46: 1346-1359
42. Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, Sanchez-Cespedes M, Herman JG, Esteller M (2002) Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res* 62: 4519-4524
43. Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi SW (2000) Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 849-853
44. Axume J, Smith SS, Pogribny IP, Moriarty DJ, Caudill MA (2007) Global leukocyte DNA methylation is similar in African American and Caucasian women under conditions of controlled folate intake. *Epigenetics* 2: 66-68
45. Olinski R, Gackowski D, Rozalski R, Foksinski M, Bialkowski K (2003) Oxidative DNA damage in cancer patients: a cause or a consequence of the disease development? *Mutat Res* 531: 177-190
46. Halliwell B (2007) Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 401: 1-11
47. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI (2008) Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* 266: 6-11
48. Cerda S, Weitzman SA (1997) Influence of oxygen radical injury on DNA methylation. *Mutat Res* 386: 141-152
49. Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC (2004) Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* 32: 4100-4108
50. Zuo S, Boorstein RJ, Teebor GW (1995) Oxidative damage to 5-methylcytosine in DNA. *Nucleic Acids Res* 23: 3239-3243
51. Pfeifer GP (2006) Mutagenesis at methylated CpG sequences. *Curr Top Microbiol Immunol* 301: 259-281
52. Cao H, Wang Y (2007) Quantification of oxidative single-base and intrastrand cross-link lesions in unmethylated and CpG-methylated DNA induced by Fenton-type reagents. *Nucleic Acids Res* 35: 4833-4844
53. Zhang Q, Wang Y (2005) Generation of 5-(2'-deoxycytidyl)methyl radical and the formation of intrastrand cross-link lesions in oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res* 33: 1593-1603
54. Valinluck V, Sowers LC (2007) Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* 67: 946-950

Global DNA hypomethylation - the meaning in carcinogenesis

Jolanta Guz[✉], Marek Foksiński, Ryszard Oliński

Department of Clinical Biochemistry, Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum in Bydgoszcz, 24 Karłowicza St., 85-092 Bydgoszcz, Poland

[✉]e-mail: jolaguz@cm.umk.pl

Key words: cytosine methylation, DNA hypomethylation, cancers, reactive oxygen species

ABSTRACT

DNA methylation plays an important role in the regulation of gene expression. Tumor cells are characterized by alterations of DNA methylation pattern, namely local CpG island hypermethylation and genome wide hypomethylation. The hypomethylation of the genome affects many repetitive sequences and transposable elements and is believed to result in chromosomal instability and increased mutations events. In this review we summarize the current knowledge concerning epigenetic mechanisms related to cancer, especially the relationship of DNA hypomethylation to carcinogenesis.

Hanna Lewandowska-Siwkiewicz[✉]

Sylvia Męczyńska-Wielgosz

Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa

✉Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa; tel.: (22) 504 13 24, faks: (22) 504 13 41, e-mail: lewando@ichtj.waw.pl

Artykuł otrzymano 21 maja 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 6 września 2009 r.

Słowa kluczowe: przeniesienie ładunku w DNA, naprawa DNA, oksydacyjne uszkodzenie zasad, wycinanie uszkodzonej zasady, klastr 4Fe-4S, *MutY* (glikozylaza DNA błędnie sparowanej adeniny) fotoliaza

Wykaz skrótów: A – adenina; *AlkA* – glikozylaza DNA 3-metyloadeniny; BER (ang. *Base Excision Repair*) – naprawa przez wycinanie zasad; C – cytozyna; dG:C – para deoksyguanozyna-deoksycytozyna; FapyG – 2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyna; G – guanina; HiPIP (ang. *High-Potential Iron-sulfur Protein*) – białka żelazowe o wysokim potencjale oksydoredukcyjnym; *M.HhaI* – metylotransferaza DNA metylująca cytozynę w pozycji 5; *MutM* – glikozylaza DNA okso-guaniny, która usuwa zasadę OG z par zasad OG/C, OG/T, OG/G; *MutY* – glikozylaza DNA adeniny, która usuwa adeninę z par zasad A:G, A:C i A:OG; *MYH* – DNA glikozylaza adeniny rozpoznająca pary zasad OG:A; OG – 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoksyguanozyna; OGG1 – glikozylaza wycinająca OG; *R.PvuII* – endonukleaza restrykcyjna II *Proteus vulgaris*; T – tymina; U – uracyl

Podziękowanie: Praca wykonana w ramach grantu „Rola wysokocząsteczkowych ligandów w powstawaniu dinitrozylowych kompleksów żelaza”, projekt badawczy własny MSZiNW, NN204 077833, 2007-2009.

STRESZCZENIE

Zarówno fizyczne, jak i chemiczne wyniki badań wskazują, że DNA w różnych warunkach (między innymi w swej uwodnionej formie) może zachowywać się jak półprzewodnik pasm wąskich dziur/luk. Przeniesienie ładunku wzdłuż łańcucha DNA jest zależne od sekwencji nukleotydowej oraz odległości i możliwe tylko w przypadku idealnego sparowania obu nici. Wpływ na przenoszenie ładunku w obrębie DNA mogą mieć procesy tworzenia kompleksów z białkami, zarówno te zachodzące podczas normalnego przebiegu regulacji ekspresji genów, jak i te związane z procesami naprawy. Z drugiej strony, potencjalny oksydoredukcyjny białek zawierający metale mogą różnić się znacząco w zależności od tego czy są one wolne, czy też związane z DNA. Do takich białek należą glikozylazy [4Fe-4S], enzymy z klastrem żelazowo-siarkowym, biorące udział w procesie naprawy DNA przez wycinanie zasad. Istnieje hipoteza, że zaburzenie przenoszenia ładunku w DNA jest sygnałem uruchamiającym szlaki naprawy DNA. W poniższym przeglądzie opartym na pracach Barton i współpracowników dyskutowana jest kwestia czy klastr [4Fe-4S] może uczestniczyć w procesie odnajdywania uszkodzeń DNA przez białka naprawy na zasadzie wykrywania zaburzeń struktury elektronowej.

WPROWADZENIE

Niemal pół wieku temu Albert Szent-Györgyi [1] napisał niewielką monografię, zatytułowaną „Wstęp do biologii molekularnej”, w której przedstawił swoją wizję żywej komórki. W uproszczeniu – komórka byłaby układem supramolekularnym, w którym zachodzi przenoszenie ładunków. Szent-Györgyi nie zdołał udowodnić swoich idei eksperymentalnie. Jego teorię, łączącą elementy fizyki i biologii podziwiano jako otwierającą nowe horyzonty, ale także krytykowano za to, że jest zbyt fantastyczna lub za trudna do udowodnienia. Krytycy podkreślali, że makrocząsteczki wprawdzie mogą się zachowywać w warunkach doświadczalnych jak półprzewodniki, ale jest to związane ze stanami wzbudzonymi wymagającymi znacznych energii, przekraczających zakres spotykany w żywej komórce. Poniższa praca przeglądowa pokazuje, że w przynajmniej kilku przypadkach przenoszenie ładunku ma znaczenie biologiczne podobne do tego, jakie przewidywał Szent-Györgyi. Przenoszenie ładunku w obrębie modelowych cząsteczek DNA jest bardzo dobrze udokumentowane. Posłużyło to jako podstawa hipotezy o roli tego zjawiska *in vivo* w funkcjonowaniu niektórych enzymów naprawy DNA [2]. Chodzi o fotoliazy, zaś przede wszystkim o glikozylazy z klastrem żelazowo-siarkowym [4Fe-4S], usuwające z DNA uszkodzone lub nieprawidłowo sparowane zasady.

PRZENOSZENIE ŁADUNKÓW W DNA - ZALEŻNOŚĆ OD SEKWENCJI I ODLEGŁOŚCI

Dotychczas wiadomo było, że niezwykła struktura podwójnej helisy DNA z komplementarnymi parami zasad umożliwia replikację i transkrypcję DNA. Okazało się, że prawidłowe sparowanie zasad azotowych jest także potrzebne do przeniesienia ładunku w obrębie cząsteczek DNA na zaskakująco duże odległości. Do badań przeniesienia ładunku w DNA stosowano różne podejścia doświadczalne. Fizycy mierzyli przepływ prądu we włóknach DNA [3] lub cząsteczkach DNA tworzących uporządkowane warstwy [4]. Należy podkreślić, że przewodnictwo elektronów stwierdzano metodami fizycznymi przeważnie w suchym DNA; jest to sytuacja nie dająca się porównać do tej *in vivo*. Jedna z ostatnich prac [5] dowodzi, że w uwodnionym DNA wiązania wodorowe zasad azotowych z cząsteczkami wody prowadzą do przesunięcia gęstości elektronów π z atomów węgla do atomów azotu, co może zmieniać symetrię funkcji falowej dla niektórych zasad azotowych (wyjaśnienie pojęć w ramce). W rezultacie energie orbitali są przesunięte, a to prowadzi do zmniejszenia bariery potencjału dla przenoszenia „dziur” pomiędzy parami G:C i A:T z 0,7 eV dla DNA odwodnionego do 0,123 eV dla uwodnionego. To stwierdzenie ma bardzo duże znaczenie

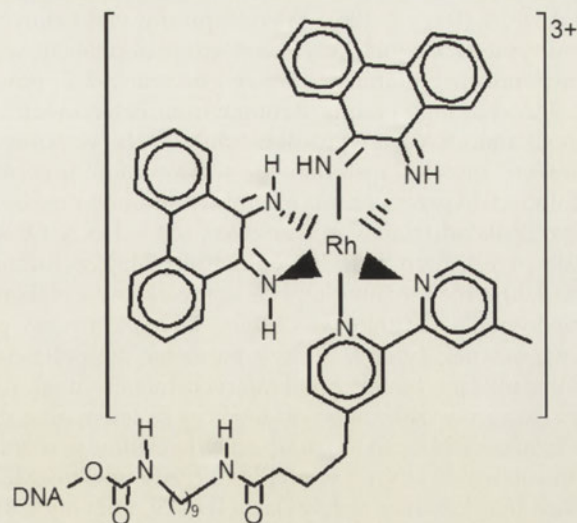
dla biologów, jako że wspomniana duża bariera energii dla przenoszenia „dziur” w suchym DNA wydaje się być główną przeszkodą dla zaakceptowania idei biologicznej roli przenoszenia ładunku.

Doświadczenia nad przeniesieniem ładunku w DNA prowadzone metodami chemicznymi i biochemicznymi oraz przy użyciu cząsteczek modelowych dały bardzo interesujące wyniki. Większość prac z tej dziedziny prowadzono w Kalifornijskim Instytucie Technologii [6-8]. Do doświadczeń użyto modelu dupleksu oligodeoksynukleotydowego, do którego przyłączano fotoutleniacze kowalencyjnie lub kompleksowano nimi (na zasadzie interkalacji) cząsteczki oligodeoksynukleotydów o zdefiniowanych sekwencjach. Pod wpływem foto-pobudzenia dublety guaniny (G) umieszczane w określonej odległości od reszt fotoutleniacza zostają oksydacyjnie uszkodzone i można ocenić stopień tych uszkodzeń, nazwanych uszkodzeniami oksydacyjnymi dalekiego zasięgu [9]. Wśród fotoutleniaczy użytych w tych doświadczeniach były etydyna – kowalencyjnie związana z DNA [10,11] oraz „interkalator Rh”, $Rh(\phi)_2(bpy)^{3+}$, gdzie ϕ to 9,10-diimino fenatrenochinon, zaś bpy to kwas 4'-metylo- bipyridyno-4-masłowy (Ryc. 1) [12]. W niektórych doświadczeniach mierzono gaszenie przez interkalator Rh fluorescencji kompleksu Ru (II) z dipirydofenazyną [13,14]. Okazało się również, że naruszenie komplementarności dupleksu oligodeoksynukleotydowego przez wprowadzenie pary C:A powoduje zaburzenie przeniesienia elektronów, natomiast DNA przenosi ładunek tak samo w postaci wolnej nici („nagi” DNA), jak i wtedy gdy jest nawinięty na nukleosomy [15,16]. Na rycinie 2 przedstawiono przykład doświadczenia z gaszeniem fluorescencji kompleksu Ru (II) z dipirydofenazyną w modelowym dupleksie oligodeoksynukleotydowym idealnie sparowanym lub zawierającym niekomplementarną parę C:A.

- Zmieniając liczbę par zasad oraz sekwencję oligodeoksynukleotydów, można było modyfikować przenoszenie ładunku i wnioskować o następujących uwarunkowaniach przenoszenia ładunku w DNA;
- zachodzi ono przez przeskakowanie (ang. *hopping*) pomiędzy resztami G i tunelowaniem przez parę zasad T:A [7,17];
- jest wrażliwe na oddziaływania warstwowe π [11,18-21] i jedno błędne sparowanie zasad wystarczy, aby spowodować zahamowanie przenoszenia ładunku [18];
- jest zależne od odległości oraz sekwencji oligodeoksynukleotydów. Przenoszenie ładunku w modelu dupleksu oligodeoksynukleotydowego słabo zależy od odległości, zaś przeciwnie – wykazuje silną zależność od rodzaju sekwencji. Obecność powtórzeń 5'-TA-3' powoduje znaczny spadek przenoszenia ładunku. Jest to zgodne z założeniem, że przenoszenie za pośrednictwem tunelowania przez pary T:A spada wykładniczo wraz ze wzrostem odległości, natomiast przy przeskakowaniu ładunku przez pary G:C zależność od odległości jest słaba [22-24].

PRZENOSZENIE ŁADUNKÓW W DNA W KOMPLEKSIE Z BIAŁKAMI

W omówionych układach modelowych stosowano „nagi” DNA, jednak w komórkach DNA występuje w



Rycina 1. Struktura interkalatora zawierającego rod, $Rh(\phi)_2(bpy)^{3+}$, gdzie ϕ to 9,10-diimino fenatrenochinon, zaś bpy to kwas 4'-metylo- bipyridyno-4-masłowy [12].

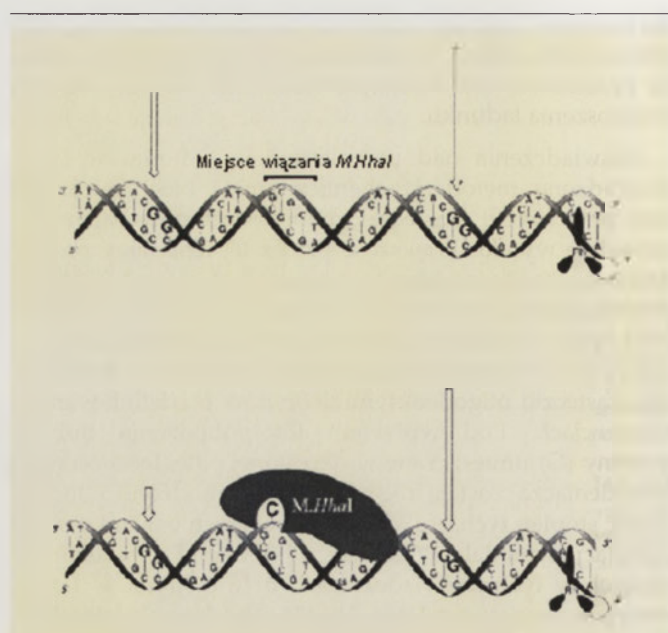
kompleksie z histonami, białkami niehistonowymi, regulatorowymi, czynnikami transkrypcyjnymi i in. Dla biologa istotne jest zatem poznanie wpływu białek na przenoszenie ładunku w DNA. W badaniach Rajskego i Barton [25] zastosowano dupleksy oligodeoksynukleotydowe zawierające swoiste miejsca wiązania dla różnych białek, m.in. dla enzymów naprawczych, charakteryzujących się powinowactwem do określonych sekwencji DNA. Wspomniany już poprzednio interkalator zawierający rod („interkalator Rh”) przyłączony do DNA był fotoutleniaczem, podobnie jak w doświadczeniach opisanych w poprzednim rozdziale. Mierzono proporcję uszkodzeń oksydacyjnych dwóch miejsc o sekwencji 5'-GG-3': dubletów GG usytuowanych przed i za miejscem wiązania białka.

Stwierdzono m. in. hamujący wpływ endonukleazy restrykcyjnej *R.PvuII* (wiążącej sekwencję TATA i mającej zdolność zginania helisy DNA) na powstawanie uszkodzenia oksydacyjnego dubletu GG umieszczonego za miejscem wiązania enzymu. Można było wnosić, że odkształcenie modelowej cząsteczki DNA hamowało przenoszenie ładunku. Badano także oddziaływanie DNA z dzikim i zmutowanym białkiem M.HhaI. Białko to należy do metylotransferaz, enzymów metylujących reszty cytozyny we fragmentach dinukleotydowych CG. Metylacja DNA jest formą regulacji ekspresji genów i wiąże się z kilkoma kluczowymi procesami, między innymi z wyciszaniem genów i piętnowaniem (imprintingiem) genomowym (u eukariontów) czy z kontrolą czasu rozpoczęcia duplikacji chromosomu (u prokariotów). Są to enzymy mające zdolność zwaną „base-flipping”, powodującą obrót i wysunięcie się nukleotydu z helisy DNA. W ten sposób metylotransferaza uzyskuje dostęp do reszty cytozyny, która ulega metylacji. Miejsce cytozyny przejściowo umieszczonej w tak zwanej kieszonce katalitycznej w cząsteczce metylotransferazy jest zajmowane przez resztę glutaminy 237 tego enzymu. Wysłunięcie nukleotydu z helisy zrywa wiązania wodorowe między komplementarnymi zasadami, co narusza lokalne oddziaływania warstwowe π i powoduje w rezultacie za-

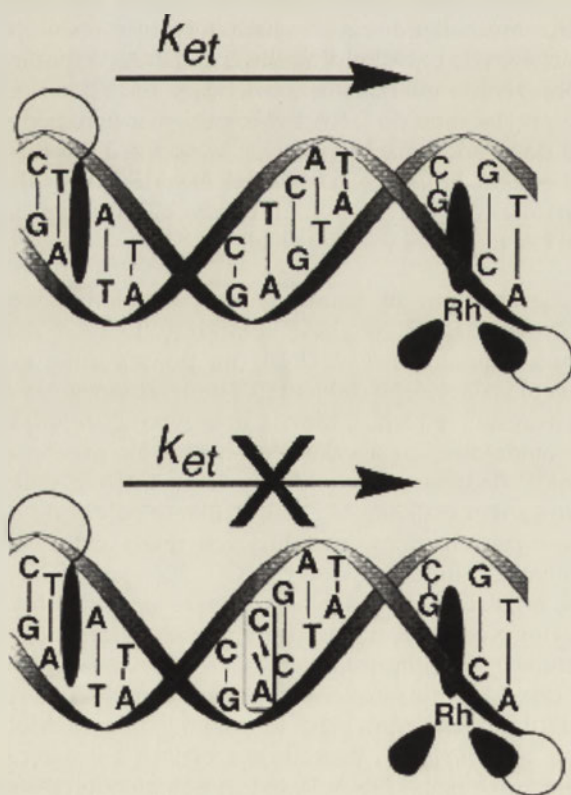
hamowanie przenoszenia ładunku w badanym kompleksie M.HhaI-DNA (Ryc. 2) [26]. Wyżej opisany efekt dotyczy enzymu typu dzikiego. Modyfikacja enzymu polegająca na podstawieniu tryptofanu w miejsce glutaminy 237, powoduje zakłócenie tego efektu. Aromatyczna heterocykliczna część tego aminokwasu wpasowuje się w wyżej wspomnianą „kieszneń” metylotransferazy i to wystarcza do utrzymania zdolności do przenoszenia ładunku pomimo miejscowego zniszczenia oddziaływań warstwowych w DNA. Obserwuje się przejściowo rodnik tryptofanu [26]. Przytoczony przykład ilustruje możliwy wpływ kompleksów z białkami na przenoszenie ładunku w obrębie DNA, zarówno pozytywny, jak negatywny. Należy pamiętać, że potencjały oksydoredukcyjne białek zawierających metale mogą różnić się znacząco w zależności od tego czy są one wolne, czy też związane z DNA i to może się odzwierciedlać w różnicy powinowactwa do DNA o więcej niż 3 rzędy wielkości [27]. Do takich białek należą glikozyłazy [4Fe-4S], enzymy z klastrem żelazowo-siarkowym.

GLIKOZYLAZY [4FE-4S]

Glikozyłazy DNA to rodzina enzymów uczestniczących w naprawie DNA przez wycinanie zasad (BER, ang. *Base Excision Repair*). Naprawa typu BER jest przede wszystkim odpowiedzialna za naprawę uszkodzeń heterocyklicznych zasad DNA [28,29]. Główną rolę zdają się tu odgrywać



Rycina 3. Wiązanie metylotransferazy M.HhaI do podwójnego oligodeoksynukleotydu hamuje przepływ ładunku. Daleko zasięgowe przenoszenie ładunku w reakcji utleniania fragmentów 5'-GG-3' DNA kowalencyjnie związanego z interkalatorem zawierającym rod [Rh(phi)2bpy]³⁺ zostało opisane przez [12]. Wykorzystanie konstruktu DNA-Rh zawierającego dwa fragmenty 5'-GG-3' rozdzielone fragmentem wiążącym metylotransferazę (M.HhaI), pozwala na zbadanie wpływu odległości, struktury i wiązania z białkiem na przenoszenie ładunku w reakcji daleko zasięgowego utleniania. Górna część ryciny: przed związaniem białka uszkodzenia oksydacyjne w obrębie fragmentu bardziej oddalonego występują z mniejszą częstotliwością niż we fragmencie leżącym bliżej interkalatora (por. wielkość strzałek); dolna część ryciny: po związaniu białka częstość uszkodzeń we fragmencie oddalonym od interkalatora ulega dalszemu zmniejszeniu. Przedrukowano za zgodą Elsevier z Rajska SR, Jackson BA, Barton JK (2000) DNA repair: models for damage and mismatch recognition. *Mut Res* 447: 49-72.

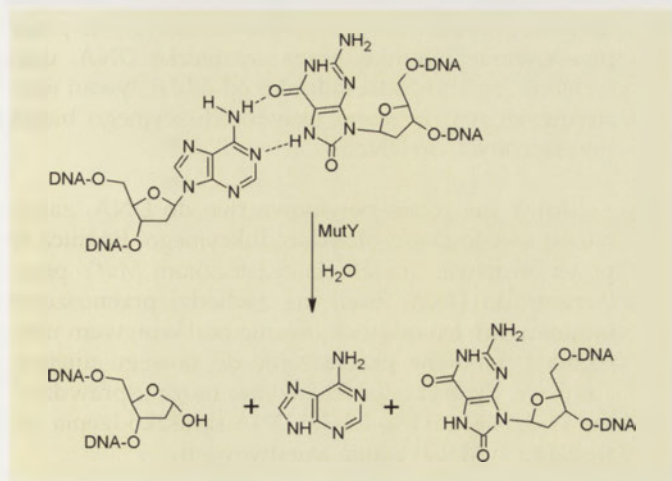


Rycina 2. Wysycanie fluorescencji bromku etydydy (owalna struktura z lewej strony dupleksu) na drodze przenoszenia ładunku z kompleksu zawierającego rod (Rh). Oba interkalatory kowalencyjnie związane z DNA tworzą system, w którym etydydy jest fotoutleniaczem; k_{et} – stała szybkości reakcji przeniesienia elektronu; po wstawieniu źle sparowanej zasady szybkość tej reakcji drastycznie spada. Przedrukowano za zgodą Elsevier z Rajska SR, Jackson BA, Barton JK (2000) DNA repair: models for damage and mismatch recognition. *Mut Res* 447: 49-72.

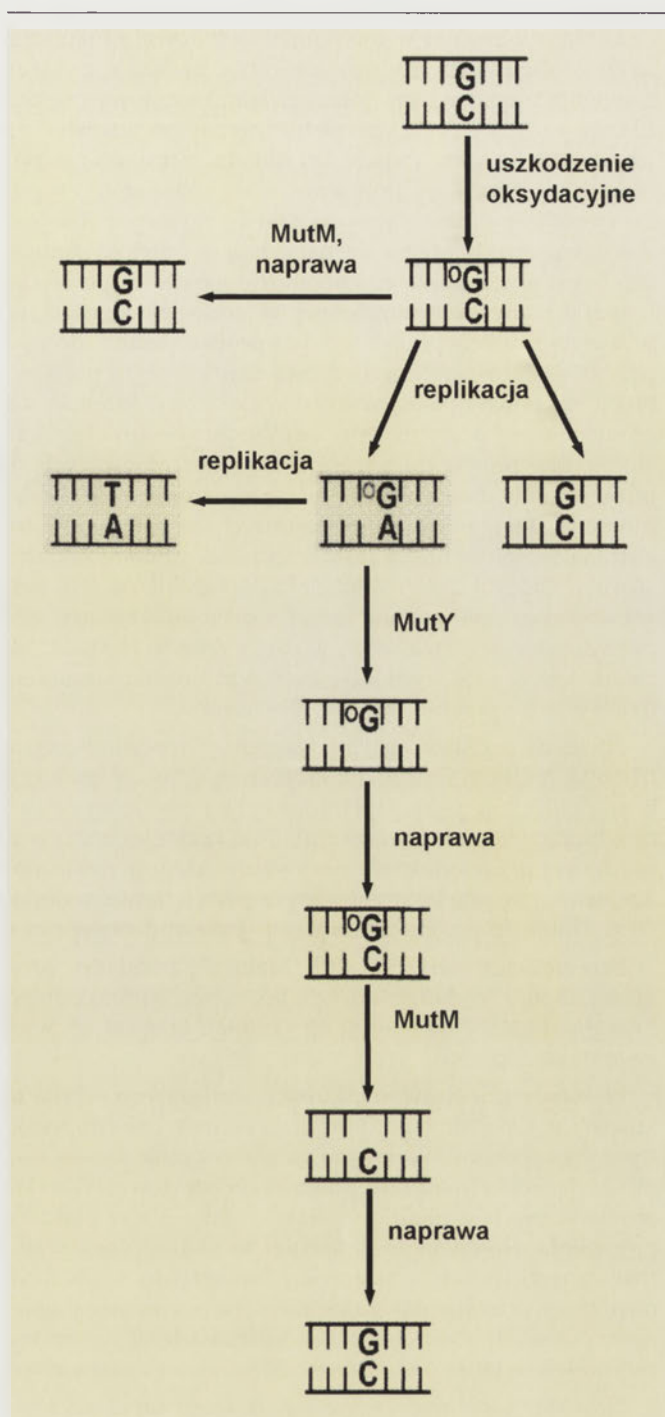
glikozyłazy DNA, które rozpoznają niedopasowaną lub uszkodzoną zasadę i katalizują reakcję hydrolizy wiązania β -N glikozydowego między uszkodzoną zasadą a cząsteczką deoksyrybozy. Powstałe w ten sposób miejsce apurynowe/apirymidynowe jest rozpoznawane przez endonukleazę apurynową/apirymidynową, która nacina DNA w kierunku 5' od miejsca apurynowego/apirymidynowego, tworząc wolny koniec 3'-OH. Nić ulega wydłużeniu, poczynając od wolnego końca 3'-OH, wskutek działania polimerazy DNA. Należy wspomnieć, iż polimeraza DNA ma także zdolność usuwania nukleotydów, jeśli nie w pełni pasują one do matrycy (aktywność egzonukleazy 3' \rightarrow 5', czyli aktywność korekcyjna). Następnie nowa nić jest łączona ze starą za pomocą ligazy DNA [29]. W związku z różnorodnością uszkodzeń zasad DNA rozwinęły się różne grupy glikozyłaz, specyficzne dla danego substratu: Glikozyłazy wycinające uracyl, który może się pojawiać w DNA wskutek m. in. dezaminacji cytozyny, występują u wielu prokariotów i eukariotów, jednak szczególnie istotne wydają się być dla rozwoju bakterii termofilnych, u których wskutek wysokiej temperatury zwiększona jest częstość wspomnianej mutacji. Glikozyłazy wycinające alkilowane zasady; przykładem takiej zasady jest 3-metyloadenina, natomiast glikozyłazy – *AlkA* w *E. coli*. Szczególnie dużą grupę stanowią glikozyłazy zasad uszkodzonych oksydacyjnie (głównymi tego typu uszkodzeniami są 2,6-diamino-4-hydrokso-5-formamidopirymidyna (FapyG) i 8-okso-guanina), które powszechnie tworzą się wskutek działania reaktywnych form tlenu generowanych w trakcie procesów

metabolicznych. Jedną z takich glikozylaz jest OGG1, której homologi można znaleźć u wielu gatunków, między innymi u człowieka. Przykładami glikozylaz rozpoznających 8-oksoguaninę błędnie sparowaną z adeniną, ale wycinających adeninę są szeroko tu omawiane *MutY* i *MutM* u *E. coli*. Komórki bakterii pozbawione tego enzymu wykazują zwiększoną częstość powstawania mutacji. U człowieka jedną z glikozylaz jest białko *MYH*. Jego brak u człowieka jest bezpośrednio wiązany z występowaniem dziedzicznego raka okrężnicy. Utlenienie 2'-deoksyguanozyny (G) do 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoksyguanozyny (OG) jest jednym z najczęstszych uszkodzeń DNA. Taka modyfikacja może prowadzić do błędnego sparowania zasad w trakcie procesu replikacji. Nienaprawiona OG może być parowana z adeniną, co przy kolejnej replikacji powoduje stałą transwersję pary G:C do T:A. Glikozylazy rozpoznają zaburzenie struktury DNA spowodowane przez utlenienie zasady lub błędne sparowanie zasad i wycinają uszkodzoną/błędnie sparowaną zasadę, poprzez hydrolizę N-glikozydowego wiązania pomiędzy zasadą a szkieletem DNA (Ryc. 3). Rycina 4 przedstawia udział dwóch przykładowych glikozylaz: *MutY* oraz *MutM* w naprawie uszkodzeń DNA przez wycinanie zasad w *E. coli*.

Klaster [4Fe-4S] jest powszechnie występującym motywem w enzymach biorących udział w BER. Początkowo był uważany za element strukturalny a nie regulatorowy ze względu na swój bardzo stabilny, w warunkach fizjologicznych, charakter oksydoredukcyjny. Jednak badania Porello i wsp. [30] nad strukturą glikozylazy adeninowej DNA, *MutY*, pokazały że obecność klastra nie jest niezbędna przy prawidłowym zwijaniu tego białka, a także nie wpływa znacząco na jego stabilność termiczną. Niemniej jednak, klaster jest niezbędny przy tworzeniu kompleksu z DNA i warunkuje aktywność enzymatyczną. Przykładową strukturę kompleksu DNA-glikozylaza przedstawia Rycina 5. Modyfikacja genetyczna *MutY* w miejscu wiązania klastra prowadzi do zaniku jego aktywności naprawczej. Badania *MutY* i endonukleazy III z *E. coli* [27] ujawniły, że utworzenie kompleksu z DNA zmienia charakter klastra i możliwy staje się odwracalny transfer elektronu analogicz-



Rycina 4. Równanie reakcji wycięcia adeniny z fragmentu DNA, zawierającego parę OG:A. Glikozylaza *MutY* katalizuje reakcję hydrolizy wiązania glikozydowego pomiędzy adeniną i szkieletem cukrowym DNA, co daje w wyniku miejsce apurynowe/apirimidynowe naprzeciwko uszkodzonej oksydacyjnie guaniny [36]



Rycina 5. Udział glikozylaz *MutY* i *MutM* w naprawie DNA [37].

ny do zachodzącego w białkach żelazowych o wysokim potencjale oksydoredukcyjnym (HiPIP, ang. *high potential iron proteins*). To odkrycie zainspirowało Boal i wsp. [6] do podjęcia próby odpowiedzi na pytanie czy klaster [4Fe-4S] może uczestniczyć w procesie odnajdywania przez białka naprawcze uszkodzeń DNA na zasadzie wykrywania zaburzeń struktury elektronowej.

Funkcja falowa to w mechanice kwantowej funkcja zmierzających konfiguracyjnych, np. położenia, będąca rozwiązaniem równania Schrödingera, opisująca stan kwantowy cząstki (lub układu cząstek), czyli kompletny zestaw parametrów opisujących stan fizyczny cząstki lub układu. Parametrami tymi są m.in. pęd cząstki, jej położenie, spin, dziwność czy powab. Powierzchnię opisaną funkcją falową obliczoną dla jednego elektronu znajdującego się na jednej z powłok atomowych lub tworzących wiązanie chemiczne nazywamy orbitalem, a kwadrat wartości bezwzględnej tej jednoelektronowej funkcji w danym punkcie przestrzeni jest proporcjonalny do gęstości prawdopodobieństwa znalezienia cząstki w tym punkcie. Orbitale atomowe opisują wszystkie elektrony, które w danym momencie nie uczestniczą w tworzeniu wiązań chemicznych ale są przypisane do określonych jąder atomowych, natomiast orbitale molekularne opisują elektrony, które w danym momencie mogą tworzyć wiązania chemiczne w cząsteczce. Zmiana symetrii funkcji falowej oznacza zmianę kształtu obszaru w którym z wysokim prawdopodobieństwem przebywa elektron, czyli zmianę kształtu orbitalu. Obszary gęstości prawdopodobieństwa mogą w różny sposób nakładać się, co umożliwia w większym lub mniejszym stopniu wzajemne oddziaływanie i przemieszczanie elektronów.

Niekiedy w cząsteczkach występują potencjalne stany elektronowe o niskiej energii, na których mógłby się znaleźć elektron, czyli nie w pełni zajęte orbitale walencyjne (wiązące – biorące udział w wiązaniu). Taki brak elektronu w teorii pasmowej przewodnictwa nazywamy „dziurą elektronową”. Zachowuje się ona jak swobodna cząstka o ładunku dodatnim i jest zdolna do przemieszczania się (przewodzenia prądu).

Przeniesienie elektronu (lub „dziury”) pomiędzy orbitalami wiąże się z nakładem energii, tak zwaną barierą potencjału. Energia ta zależy od energii obu orbitali oraz od ich wzajemnego nakładania się.

Elektrony π – elektrony, których stan opisuje orbital molekularny π . Orbitale tego typu mają zerowe prawdopodobieństwo występowania elektronu na płaszczyźnie zawierającej oś międzyjądrową (mają tzw. płaszczyznę węzłową). W układach aromatycznych orbitale „wystają” z obu stron płaszczyzny pierścienia. Równoległe zbliżenie do siebie płaszczyzn aromatycznych dwóch cząsteczek prowadzi do oddziaływania między ich orbitalami π . Takie zjawisko ma miejsce między innymi pomiędzy równoległe leżącymi zasadami purynowymi/pirymidynowymi i nosi nazwę oddziaływań warstwowych.

Zjawisko tunelowe zwane też efektem tunelowym – zjawisko przejścia cząstki przez barierę potencjału o wysokości większej niż energia cząstki, opisane przez mechanikę kwantową. Z punktu widzenia fizyki klasycznej stanowi paradoks łamiący klasycznie rozumianą zasadę zachowania energii, gdyż cząstka przez pewien czas przebywa w obszarze zabronionym przez zasadę zachowania energii.

Układ supramolekularny – struktura złożona z wielu podjednostek, które powstają samorzutnie wskutek słabych oddziaływań międzycząsteczkowych (takich jak: siły van der Waalsa, słabe wiązania wodorowe, oddziaływania typu π - π), elektrostatycznych lub poprzez wzajemne mechaniczne zaplecenie. Poszczególne elementy układów supramolekularnych mogą także być połączone za pomocą klasycznych wiązań kowalencyjnych.

PRZENOSZENIE ŁADUNKU A KOMUNIKACJA POMIĘDZY CZĄSTECZKAMI GLIKOZYLAZY ADENINOWEJ *MutY*

Oddziaływanie *MutY* z DNA sprawdzono w układzie modelowym z użyciem opisanego we wcześniejszych rozdziałach interkalatora zawierającego rod [31,32]. Jak przewidywano na podstawie poprzednich doświadczeń, interkalator Rh przyłączony do dupletu oligodeoksynukleotydowego utleniał *MutY* tylko za pośrednictwem dupletu idealnie sparowanego. Strukturę dupletu modyfikowano, zmieniając skład i sekwencję nukleotydów i komplementarność zasad. Wprowadzenie obszaru jednoniciowego przeciwdziało utlenianiu *MutY*. Związanie *MutY* z DNA przesuwało potencjał klastra $[4Fe-4S]^{3+/2+}$ w stronę utleniania, zaś tworzenie się rodnika guaniny dodatkowo ułatwiało utlenianie *MutY* [31,32]. Czas życia rodnika guaniny (G) jest wystarczająco długi (milisekundy), by mógł on reagować z *MutY* dzięki oddziaływaniom warstwowym π w DNA. Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego potwierdziła, że ruten, który uległ wbudowaniu do DNA i rodnik G generowany w tym doświadczeniu, ułatwia utlenianie klastra $[4Fe-4S]^{2+}$ do $[4Fe-4S]^{3+}$ i jego produktu rozpadu, $[3Fe-4S]^+$.

Zbadano także pełne absorpcyjne widmo różnicowe poli(dG:C) wolnego lub związanego z *MutY*. Wyniki potwierdzały tworzenie się najpierw rodnika G pod wpływem wzbudzonego „interkalatora Rh” związanego z poli(dG:C) z przyłączonym *MutY*, w następnej kolejności pojawiało się widmo $[4Fe-4S]^{3+}$. W duplekcie DNA zawierającym dublet 5'-GG-3' i interkalator rutenowy obserwowano uszkodzenie G pochodzące od „utleniania na odległość” poprzez przeniesienie ładunku za pośrednictwem poli(dG:C) z interkalatora rutenowego. Co istotne, w obecności *MutY* takie uszkodzenie G nie miało miejsca.

W powyższym modelu doświadczalnym potwierdzono zatem wszystkie prawidłowości przenoszenia ładunku: sprzężenie par oksydoredukcyjnych przez przenoszenie ładunku przez cząsteczkę DNA, uzależnienie przenoszenia ładunku od oddziaływań warstwowych π i od stanu oksydoredukcyjnego białek przyłączonych do DNA.

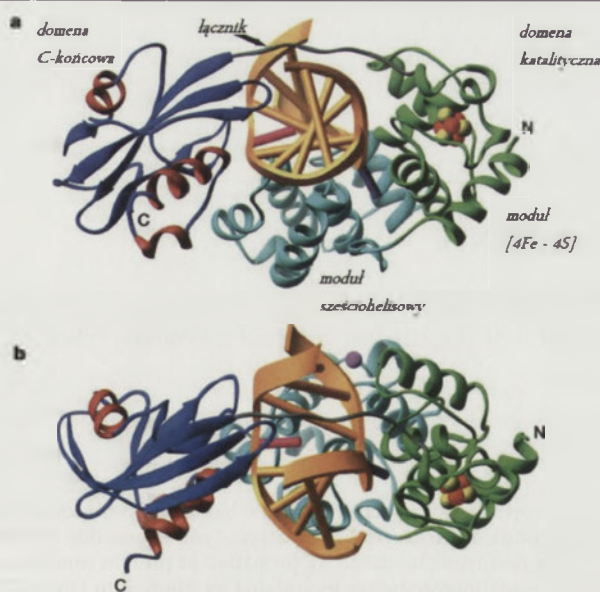
MutY ma różne powinowactwo do DNA, zależnie od swego stanu oksydoredukcyjnego. Różnica w powinowactwie umożliwia cząsteczkom *MutY* przyłączenie do DNA, jeżeli nie zachodzi przenoszenie ładunku, lub ich oddysocjowanie pod wpływem utlenienia i ponowne przyłączenie do nowego miejsca. Tak więc, dwie cząsteczki enzymu mogą „sprawdzić” czy w dzielącym je odcinku DNA są uszkodzenia naruszające oddziaływania warstwowe π .

Rycina 6 przedstawia schematycznie zasadę takiego skanowania DNA przez *MutY* w poszukiwaniu uszkodzeń. Jeśli brak zmiany stanu oksydoredukcyjnego – co sygnalizuje złe sparowanie zasad, a więc

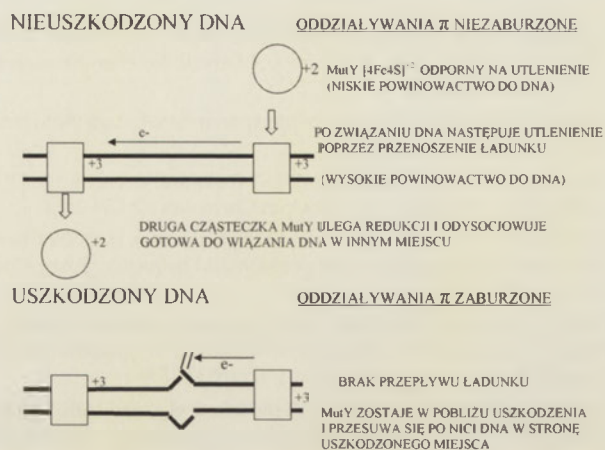
prawdopodobne uszkodzenie zasady – cząsteczki enzymu pozostają na miejscu. Jeżeli nastąpi utlenienie – oznacza to prawidłową komplementację par zasad i cząsteczki enzymu odłączają się od DNA. Dzięki temu Mut Y łatwiej trafia do obszarów genomowego DNA zawierającego uszkodzenia. Należy dodać, że taki sam model działania stosuje się dla innych enzymów naprawczych zawierających klaster [4Fe-4S], takich jak bakteryjna endonukleaza III. Trzeba przyznać, że opisany model działania Mut Y przemawia do wyobraźni i wydaje się bardzo prawdopodobne, że tak właśnie działają „enzymatyczni kontrolerzy” podwójnej helisy DNA.

UWAGI KOŃCOWE

Przenoszenie ładunku w obrębie prawidłowo sparowanego DNA może zachodzić na zaskakująco dużych odległościach, rzędu kilkunastu par zasad. Zjawisko to jest znacznie silniejsze w DNA w środowisku wodnym niż w stanie krystalicznym, co uzasadnia wniosek o biologicznym znaczeniu tego procesu. Naruszenie komplementarności sekwencji nukleotydów powoduje zaburzenie przeniesienia elektronów, natomiast wpływ nukleosomów jest zanedbywalny [15,16]. Modyfikacja długości nici i sekwencji nukleotydów pozwoliła stwierdzić, że do procesów składających się na przenoszenie ładunku w DNA należą przeskakiwanie (ang. *hopping*) pomiędzy resztami G oraz tunelowanie przez parę zasad T:A [7,17]. Przenoszenie ładunku w modelu dupletu oligodeoksynukleotydowego słabo zależy od odległości, silnie zaś od rodzaju sekwencji [22-24]. Białka, które wiążą się z DNA, zmieniając jego lokalną strukturę przestrzenną (białka regulatorowe, naprawcze), mają istotny wpływ na przenoszenie ładunku w obrębie objętym oddziaływaniem. Zmiany te mogą polegać zarówno na odkształceniu helisy (np. wygięcie jej przez utworzenie kompleksu z białkiem *R.PvuII*), jak i wysunięcie nukleotydu z helisy (np.: poprzez białko *M.HhaI*), co narusza lokalne oddziaływania warstwowe π i powoduje w rezultacie zahamowanie przenoszenia



Rycina 6. Struktura kompleksu glikozylazy MutY z DNA. Rycina dostosowana za pozwoleniem Macmillan Publishers Ltd: [Nature] z Fromme JC, Banerjee A, Huang SJ, Verdine GL (2004) Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase. Nature 427: 652-656.



Rycina 7. Schemat pokazujący jak przeniesienie ładunku ułatwia redystrybucję enzymu naprawczego i sprzyja wiązaniu w innym obszarze jądra w pobliżu takiej modyfikacji składników DNA (np. uszkodzenia zasady), która zakłóca oddziaływania warstwowe π par zasad. Dla uproszczenia schematu, strzałki są skierowane tylko w jednym kierunku, podczas gdy w rzeczywistości asocjacja/dysocjacja i przeniesienie ładunku odbywają się w obu kierunkach (patrz: tekst).

ładunku [26]. Utworzenie kompleksu z DNA zmienia potencjał oksydoredukcyjny białek, m. in. tych zawierających centra żelazowo-siarkowe [27]. Z kolei ze zmianą stopnia utlenienia białka zmienia się jego powinowactwo do nici DNA. Możliwość wzajemnego przekazywania ładunków po nici DNA pomiędzy cząsteczkami tego samego białka i wrażliwość tego procesu na zaburzenia struktury helisy sugerują, że istnieje możliwość odnajdywania przez białka naprawcze uszkodzeń DNA na zasadzie wykrywania zaburzeń struktury elektronowej. Opisaną zasadę przenoszenia ładunku w cząsteczce DNA stosowano także do wyjaśnienia fotoreaktywacji dimerów pirymidynowych powstających w DNA pod wpływem promieniowania ultrafioletowego C [33], a także mechanizmu oddysocjowania czynników transkrypcyjnych aktywnych oksydoredukcyjnie od sekwencji promotorowych [8,34] lub przenoszenia (sływania, „*funneling*”) oksydacyjnych uszkodzeń DNA do niekodujących sekwencji dGC [23]. Ostatnio Elson [35] zaproponował, że przenoszenie ładunku służy koordynacji replikacji poszczególnych domen genomowego DNA, a także koordynacji transkrypcji genów w rozwoju zarodkowym. Taki model regulacji nie ma jednak podstaw doświadczalnych. Dalszy rozwój badań nad rolą przenoszenia ładunku w biologii komórki wymaga podejścia interdyscyplinarnego – trudnego w praktyce do osiągnięcia zbliżenia chemii, fizyki, informatyki oraz biologii komórkowej i molekularnej.

PIŚMIENNICTWO

1. Szent-Gyorgyi A (1960) Introduction to a Submolecular Biology. Academic Press, New York, London
2. Dandliker PJ, Nunez ME, Barton JK (1998) Oxidative charge transfer To repair thymine dimers and damage guanine bases in DNA assemblies containing tethered metallointercalators. Biochemistry 37: 6491-6502
3. Elley DD, Spivey DI (1962) Semiconductivity of organic substances. IX Nuclei acids in the dry state. Trans Faraday Soc 58: 411-415
4. Okahata Y, Kobayashi T, Tanaka K, Shimomura M (1998) Anisotropic Electric Conductivity in an Aligned DNA Cast Film. J Am Chem Soc 120: 6165-6166

5. Berashevich J, Chakraborty T (2008) Water induced weakly bound electrons in DNA. *J Chem Physics* 128: 235101-235106
6. Boal AK, Yavin E, Barton JK (2007) DNA repair glycosylases with a [4Fe-4S] cluster: a redox cofactor for DNA-mediated charge transport? *J Inorg Biochem* 101: 1913-1921
7. Boon EM, Barton JK (2002) Charge transport in DNA. *Curr Opin Struct Biol* 12: 320-329
8. Merino EJ, Boal AK, Barton JK (2008) Biological contexts for DNA charge transport chemistry. *Curr Opin Chem Biol* 12: 229-237
9. Williams TT, Odom DT, Barton JK (2000) Variations in DNA Charge Transport with Nucleotide Composition and Sequence. *J Am Chem Soc* 122: 9048-9049
10. Hall DB, Kelley SO, Barton JK (1998) Long-range and short-range oxidative damage to DNA: photoinduced damage to guanines in ethidium-DNA assemblies. *Biochemistry* 37: 15933-15940
11. Kelley SO, Barton JK (1998) DNA-mediated electron transfer from a modified base to ethidium: pi-stacking as modulator of reactivity. *Chem Biol* 5: 413-425
12. Hall DB, Holmlin RE, Barton JK (1996) Oxidative DNA damage through long-range electron transfer. *Nature* 382: 731-735
13. Arkin MR, Stemp ED, Pulver SC, Barton JK (1997) Long-range oxidation of guanine by Ru(III) in duplex DNA. *Chem Biol* 4: 389-400
14. Nunez ME, Hall DB, Barton JK (1999) Long-range oxidative damage to DNA: effects of distance and sequence. *Chem Biol* 6: 85-97
15. Nunez ME, Holmquist GP, Barton JK (2001) Evidence for DNA charge transport in the nucleus. *Biochemistry* 40: 12465-12471
16. Nunez ME, Noyes KT, Barton JK (2002) Oxidative charge transport through DNA in nucleosome core particles. *Chem Biol* 9: 403-415
17. O'Neill MA, Barton JK (2004) DNA charge transport: conformationally gated hopping through stacked domains. *J Am Chem Soc* 126: 11471-11483
18. Kelley SO, Barton JK, Jackson NM, Hill MG (1997) Electrochemistry of methylene blue bound to a DNA-modified electrode. *Bioconjug Chem* 8: 31-37
19. Kelley SO, Barton JK (1999) Electron transfer between bases in double helical DNA. *Science* 283: 375-381
20. Murphy CJ, Arkin MR, Jenkins Y, Ghatlia ND, Bossmann SH, Turro NJ, Barton JK (1993) Long-range photoinduced electron transfer through a DNA helix. *Science* 262: 1025-1029
21. Ly D, Sanii L, Schuster GB (1999) Mechanism of charge transport in DNA: internally-linked anthraquinone conjugates support phonon-assisted polaron hopping. *J Am Chem Soc* 121: 9400-9410
22. Bixon M, Giese B, Wessely S, Langenbacher T, Michel-Beyerle ME, Jortner J (1999) Long-range charge hopping in DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11713-11716
23. Giese B (2002) Long-distance electron transfer through DNA. *Annu Rev Biochem* 71: 51-70
24. Giese B (2006) Electron transfer through DNA and peptides. *Bioorg Med Chem* 14: 6139-6143
25. Rajski SR, Barton JK (2001) How different DNA-binding proteins affect long-range oxidative damage to DNA. *Biochemistry* 40: 5556-5564
26. Wagenknecht HA, Rajski SR, Pascaly M, Stemp ED, Barton JK (2001) Direct observation of radical intermediates in protein-dependent DNA charge transport. *J Am Chem Soc* 123: 4400-4407
27. Gorodetsky AA, Boal AK, Barton JK (2006) Direct electrochemistry of endonuclease III in the presence and absence of DNA. *J Am Chem Soc* 128: 12082-12083
28. David SS, Williams SD (1998) Chemistry of glycosylases and endonucleases involved in base-excision repair. *Chem Rev* 98: 1221-1262
29. Scharer OD, Jiricny J (2001) Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays* 23: 270-281
30. Porello SL, Cannon MJ, David SS (1998) A substrate recognition role for the [4Fe-4S]²⁺ cluster of the DNA repair glycosylase *MutY*. *Biochemistry* 37: 6465-6475
31. Yavin E, Stemp ED, O'shea VL, David SS, Barton JK (2006) Electron trap for DNA-bound repair enzymes: a strategy for DNA-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 3610-3614
32. Yavin E, Boal AK, Stemp ED, Boon EM, Livingston AL, O'shea VL, David SS, Barton JK (2005) Protein-DNA charge transport: redox activation of a DNA repair protein by guanine radical. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3546-3551
33. Mees A, Klar T, Gnau P, Hennecke U, Eker AP, Carell T, Essen LO (2004) Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair. *Science* 306: 1789-1793
34. Augustyn KE, Merino EJ, Barton JK (2007) A role for DNA-mediated charge transport in regulating p53: oxidation of the DNA-bound protein from a distance. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18907-18912
35. Elson E (2007) Developmental control in animals and a biological role for DNA charge transfer. *Prog Biophys Mol Biol* 95: 1-15
36. Messick TE, Chmiel NH, Golinelli MP, Langer MR, Joshua-Tor L, David SS (2002) Noncysteineyl coordination to the [4Fe-4S]²⁺ cluster of the DNA repair adenine glycosylase *MutY* introduced via site-directed mutagenesis. Structural characterization of an unusual histidiny-coordinated cluster. *Biochemistry* 41: 3931-3942
37. Sampson JR, Jones S, Dolwani S, Cheadle JP (2005) *MutYH (MYH)* and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans* 33: 679-683

Glycosylases [4Fe-4S] and the charge transfer in DNA

Hanna Lewandowska-Siwkiewicz[✉], Sylwia Męczyńska-Wielgosz

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

✉e-mail: lewando@ichtj.waw.pl

Key words: Charge transfer in DNA; DNA repair; oxidative base damage, base damage excision; 4Fe-4S cluster, *MutY* glycosylase, photolyase

ABSTRACT

Both the physical and chemical test results indicate that the DNA under different conditions can act as a narrow band semiconductor. The charge transfer along the DNA double strand molecule depends both on the nucleotide sequence and the distance, and is possible only in the case of an ideal pairing of both strands. The charge transfer within DNA may be perturbed/modified by formation of protein complexes, e.g. related to the processes of DNA repair. On the other hand, redox potentials of metalloproteins are modulated by binding to DNA [27]. Particularly interesting are [4Fe-4S] glycosylases, iron-sulfur cluster containing enzymes involved in DNA base excision repair. There exists a hypothesis that disturbance of charge transfer along DNA is a signal associated with the regulation of cellular response to damage of the double helix. In the following review, based on the work of J. Barton and coworkers, the question is discussed of whether the [4Fe-4S] cluster may participate in the process of finding the DNA damage by repair proteins through detection of electronic structure perturbations.

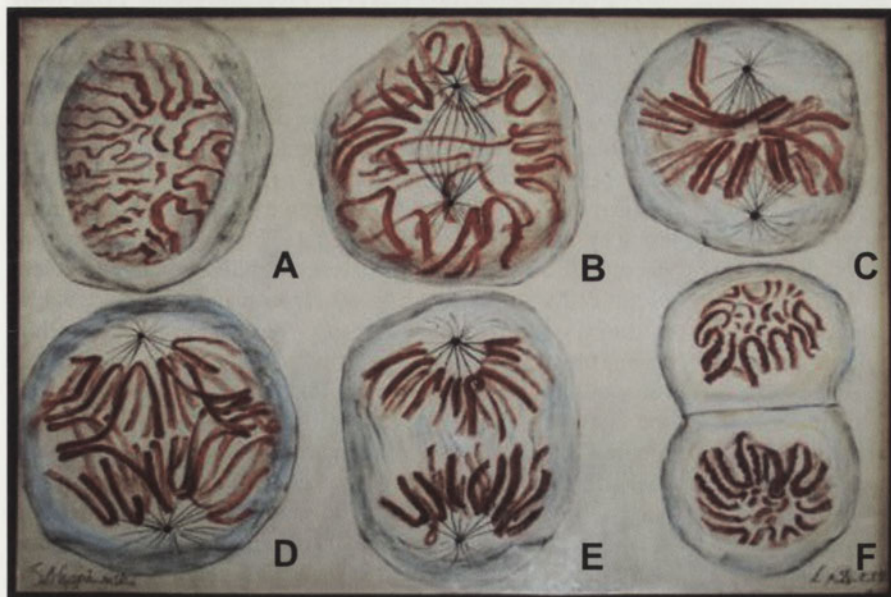
STRESZCZENIE

Wprzebiegu cyklu komórkowego, po fazie replikacji DNA, we wszystkich chromosomach tworzy się dwubiegunowe mikrotubularne wrzeciono mitotyczne, które zapewnia właściwą segregację potomnych chromosomów. W strefie równikowej wytwarza się bruzda podziałowa rozdzielająca genetycznie identyczne komórki potomne. Etapy tego procesu – profaza, metafaza, anafaza i cytokineza – są dobrze scharakteryzowane morfologicznie. Współczesne badania nad procesami rozwoju i badania onkologiczne dotyczą mechanizmów, które mogą powodować zmiany w położeniu (rotację) wrzeciona mitotycznego w profazie i przesunięcie ku tyłowi wrzeciona mitotycznego w anafazie. Oba zjawiska są związane z mitozami asymetrycznymi i różnicującymi. Celem tego artykułu jest omówienie molekularnych mechanizmów regulujących mitozę symetryczną i asymetryczną.

WPROWADZENIE

Mitoza jest procesem, w czasie którego następują kondensacja chromosomów, a następnie rozdzielanie i segregacja chromatyd siostrzanych (chromosomów potomnych) do biegunów wrzeciona mitotycznego. Dwubiegunowe wrzeciono zbudowane jest z mikrotubul, powstaje w trakcie mitozy i odpowiada za fizyczną segregację chromosomów potomnych. Po rozdzieleniu chromosomy potomne rozchodzą się ku biegunom wrzeciona; a w jego strefie równikowej powstaje bruzda podziałowa rozdzielająca komórki potomne [1]. Procesy te ilustruje cykl wspaniałych rycin dzielących się komórek naskórka salamandry, zatytułowany „Komórka w podwojeniu”, które w 1884 roku, na polecenia profesora Henryka Hoyerera, wykonał Stanisław Wyspiański.

Główne stadia mitozy obejmują profazę z kondensacją chromosomów potomnych i wytworzeniem w każdym chromosomie dwóch kinetochorów (Ryc. 1A), prometafazę, podczas której w komórce powstaje dwubiegunowe wrzeciono mitotyczne (Ryc. 1B), metafazę, kiedy dochodzi do skupiania się chromosomów



Rycina 1A-F. Komórka w podwojeniu. Ryciny Stanisława Wyspiańskiego datowane i scharakteryzowane przez Prof. J. Jurę są własnością Muzeum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Są to rysunki preparatów utrwalonych osmem (dobrze uwidaczniające mikrotubularne wrzeciono centralne) i barwionych hematoxyliną (z zastosowaniem metody Haidenhaina), pokazujące kondensację i występowanie chromosomów (rdzawego koloru) w trakcie mitozy. Inne objaśnienia w tekście. Dzięki uprzejmości prof. dr hab. Stanisława Waltosia, Dyrektora Muzeum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Autorzy dziękują Pani prof. dr hab. Teresie Szklarzewicz za informację na ich temat.

Janina Kaczanowska

Andrzej Kaczanowski

Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski,
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: (22)
554 12 24, e-mail: kaczan@biol.uw.edu.pl

Artykuł otrzymano 5 listopada 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 19 stycznia 2009 r.

Słowa kluczowe: dwubiegunowość, wrzeciono mitotyczne, cytokineza, receptory GPCR, przekazywanie sygnału bez pośrednictwa receptora

Wykaz skrótów: APC/C (ang. *anaphase promoting complex*) – białkowy kompleks promujący wejście komórki w anafazę; APC/C^{cdc20} – kompleks APC/C z kofaktorem *cdc20*; APC/C^{cdh1} – kompleks APC/C z kofaktorem *cdh1*; CDK (ang. *cyclin-dependent kinases*) – kinazy serynowo-treoninowe okresowo przyłączające białka regulatorowe cykliny; ERM (ang. *ERM complex ezrin/radixin/moesin*) – kompleks ezryny, radyksyny i moezyny; GAP (ang. *protein G activated proteins*) – białka aktywujące hydrolizę GTP przez GTPazy; GDF (ang. *GDI displacement factors*) – białka wymieniające białka GDI; GDI (ang. *protein G dissociation inhibitors*) – białka wiążące nieaktywne GTPazy; GEF (ang. *protein G exchange factor*) – białka wymieniające nukleotydy w białkach G; GPCR (ang. *protein G coupled receptors*) – receptory sprzężone z białkami G; PLKs (ang. *polokinasas*) – mitotyczne kinazy serynowo-treoninowe zawierające na C końcu specyficzną domenę PBD (ang. *polobox domain*); RGS (ang. *regulator of G protein signaling*) – grupa białek zawierających sekwencję regulującą funkcjonowanie białek G

Podziękowania: Dziękujemy za pozwolenie na reprodukcję oryginalnego zdjęcia z mikroskopu elektronowego komórki w metafazie Pani prof. dr hab. Ewie Szczuce, prof. dr hab. Józefowi Bednarowi (Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie) i prof. dr hab. Mieczysławowi Kurasiowi (Uniwersytet Warszawski). Nasze podziękowania kierujemy także do Pani Moniki Małeckiej-Krawczyk (Biblioteka Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego) za uzyskanie dostępu do wielu współczesnych artykułów, w tym z czasopism niedostępnych w Warszawie. Niniejszy artykuł powstał w trakcie realizacji projektu badawczego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego N303 091 134.

w środku komórki i ich precyzyjnego obustronnego łączenie się z włóknkami wrzeciona mitotycznego w strefie równikowej wrzeciona (Ryc. 1C), przejście od metafazy do anafazy, w trakcie którego dochodzi do fizycznego rozdziału chromosomów potomnych (Ryc. 1D), anafazę, kiedy następuje rozsuwanie kompletów potomnych chromosomów ku biegunom wrzeciona (Ryc. 1E) i cytokinezę, kiedy w strefie równikowej zanikającego wrzeciona powstaje bruzda podziałowa pomiędzy potomnymi komórkami (Ryc. 1F).

Procesy mitozy i cytokinezy są aktywowane przez czynniki mitogenne, które oddziałują na receptory w błonie komórkowej, uruchamiając wewnątrz komórki ścieżki sygnalizacji prowadzące do kolejnych zmian morfologicznych cytoszkieletu i do podziału komórki. Położenie bruzdy podziałowej prostopadłej do osi wrzeciona wyznacza płaszczyzna jego równika [1,2]. W trakcie mitoz symetrycznych osie wrzecion biegną na ogół wzdłuż osi długiej komórki, a w następnym podziale bruzdy podziałowe są prostopadłe względem siebie (reguła Sachs). Ale już w przypadku tworzenia warstwy komórek, na przykład nabłonka, nowe komórki wrastają pomiędzy istniejące komórki, a to wymaga wtórnej rotacji wrzeciona mitotycznego i w konsekwencji odpowiedniej zmiany przyszłego położenia bruzdy podziałowej. Wiele typów komórek nowotworowych charakteryzuje się brakiem regulacji położenia bruzd podziałowych. To wskazuje, jak ważne są reguły dotyczące geometrii podziału komórkowego. Chociaż ogólne reguły znane są od ponad stu lat, to dopiero teraz poznajemy mechanizmy, które wyznaczają zarówno pierwotne położenie wrzeciona mitotycznego w komórce, jak i mechanizmy, które determinują wtórną adjustację jego położenia. W niniejszym artykule przeglądowym zanalizowano globalne przemiany zachodzące w trakcie mitozy i cytokinezy oraz mechanizmy molekularne sterujące tymi przemianami, zarówno w trakcie mitoz symetrycznych, jak i mitoz, w trakcie których położenie bruzdy ulega zmianie.

Nawet w sytuacji, w której początkowo powstaje dwubiegunowe wrzeciono symetryczne, może ono ulegać przemieszczeniu, na przykład pod wpływem adhezji komórki rodzicielskiej do podłoża, a to wyznacza nowe położenie bruzdy podziałowej. Zmiana położenia bruzdy podziałowej może wiązać się z asymetrią podziału komórki i nierównym rozdziałem cytoplazmy. Zmiana położenia wrzeciona mitotycznego i wtórna regulacja lokalizacji bruzdy podziałowej mogą prowadzić do mitozy różnicującej dwie identyczne genetycznie komórki. Mechanizm takiego podziału może być indukowany przez receptorowy, albo przez nie receptorowy mechanizm regulacji i zmiany położenia bruzdy. Przykładem mechanizmu receptorowego jest zmiana położenia bruzdy w trakcie adhezji komórki nabłonka do podłoża zawierającego fibronektynę, co powoduje skupienie receptorów integrynowych w tej części błony komórkowej, która przylega do podłoża [3]. Przykładem stosunkowo niedawno odkrytego mechanizmu nie receptorowego jest rotacja wrzeciona i asymetryczna cytokineza w trakcie brudkowania i embriogenezy nicienia *Caenorhabditis elegans* [4]. Przedstawione poniżej wyniki badań pozwalają na nowe spojrzenie na zagadnienie morfogenezy organizmów wielokomórkowych.

KONTROLA PRZEBIEGU MITOZY

W cyklu komórkowym wyróżnia się kolejne cztery fazy: fazę przedreplikacyjną G1, fazę replikacji sDNA, fazę G2 a następnie mitozę (profaza, metafaza i anafazę) zakończoną rozdziałem komórek potomnych (cytokinezą) i wejściem komórek potomnych w kolejną fazę G1. Nastęstwo tych faz jest pod ścisłą kontrolą. Nieukończenie poszczególnej fazy cyklu, lub jej wadliwy przebieg oznacza zatrzymanie podziału i brak przejścia do następnej fazy, przez aktywację tzw. punktów kontrolnych cyklu. Aktywacja punktów kontrolnych cyklu powoduje albo trwałe uszkodzenie i śmierć komórki, albo powolną naprawę uszkodzeń (zagadnienia te zostały omówione w polskojęzycznych artykułach przeglądowych [5-8]).

ROLA BIAŁEK G W REGULACJI CYKLU KOMÓRKOWEGO

W trakcie mitozy i cytokinezy dochodzi do charakterystycznych zmian cytoszkieletu (Ryc. 1A-F), które są indukowane przez aktywację błonowych receptorów GPCR sprzężonych z heterotrimerycznymi białkami G (ang. *GPCR*, *G-protein coupled receptors*) [4]. Aktywacja tych białek wymaga wymiany GDP na GTP w podjednostce (lub podjednostkach) $G\alpha$ przez odpowiednie białko GEF (ang. *protein G exchange factor*), co powoduje dysocjację podjednostki $G\beta\gamma$; aktywowane podjednostki białka G aktywują wewnątrz komórki monomeryczne GTPazy Ran, Ras, Rho, Rab lub innych typów. Cykl aktywacji heterotrimerycznych białek G kończy hydroliza GTP katalizowana przez podjednostkę $G\alpha$, w wyniku jej pobudzenia przez specyficzne białko GAP (ang. *protein G activating protein*). W konsekwencji GDP $G\alpha$ wraz z podjednostką $G\beta\gamma$ przywracają spoczynkowy stan białek G i receptora GPCR. Monomeryczne GTPazy Rho, w skład których wchodzi białka Rho, Rac i Cdc42, działają jako przełączniki molekularne, które aktywują przemiany cytoszkieletu [4,9-11].

W interfazie, nieaktywne monomeryczne GTPazy mitotyczne Rho, Rac i Cdc42 występują w formie związanej z GDP. W komórce spoczynkowej są związane z białkami GDI (ang. *protein G dissociation inhibitors*) stabilizującymi cytoszkielet. Pod błoną komórkową znajduje się fosfomiozyna cytoszkieletu aktynowego; GTPazy w formie związanej z GDP są hamowane przez odpowiednie GDI szkieletu błony ERM (ang. *ERM complex ezrin/radixin/moesin*). Szkielet błony wykazuje elastyczność. W czasie replikacji DNA następuje aktywacja receptorów GPCR przez zewnątrz komórkowe ligandy, powodując aktywację GTPaz Ran i mitotycznych GTPaz Rho, Rac i Cdc42 [12]. Aktywacja receptorów GPCR pociąga za sobą także aktywację fosfolipazy C (PLC, ang. *phospholipase C*), kinazy 5 (ang. *phosphatidylinositol-4-phosphate 5 kinase*) i kinazy C fosfatydyloinyzylu (PIKC, ang. *phosphatidylinositol kinase C*) [13]. Te przemiany w fosfolipidach umożliwiają przemieszczanie się monomerycznych GTPaz do błony komórkowej. Istnieją także białka GDF (ang. *GDI displacement factors*) sprzyjające wypieraniu GDI z błony komórkowej i aktywujące wewnątrzkomórkowe GTPazy [14]. Wszystkie te procesy powodują zaokrąglenie komórki i usztywnianie jej korteksu przed wejściem w mitozę [15]. Podobnie jak w przypadku heterotrimerycz-

nych białek G, aktywacja monomerycznych GTPaz wymaga odpowiednich białek typu GEF (które wymieniają GDP na GTP), co aktywuje mediatory i efekторы cytoszkieletu [10]; hydroliza GTP katalizowana przez GTPazy Rho i stymulowana przez białka GAP, kończy proces aktywacji [11].

Jak dotąd wykryto około 200 genów regulujących syntezę czynników enzymatycznych i strukturalnych uczestniczących w mitozie. Badania genetyczne nad mutantami z delecją lub inaktywacją poszczególnych genów pozwoliły na rozpoznanie roli niektórych białek w mitozie komórek ssaków, *Drosophila*, *C. elegans* i *Xenopus*.

PRZEBIEG MITOZY SYMETRYCZNEJ W KOMÓRKACH ZWIERZĘCYCH

CENTROSOM I INTERFAZOWA DUPLIKACJA CENTRIOLI

Zwykle w komórkach zwierzęcych (ale nie zawsze) pierwotny biegun wrzeciona mitotycznego jest wyznaczony przez biegunową lokalizację centrosomu [16]. Centrosom składa się z centrioli i skupionych wokół niej specyficznych białek centrosomalnych. Centriola jest pierścieniem zbudowanym z dziewięciu tripletów mikrotubularnych [17]. Obok centrosomu macierzystego powstaje centriola potomna zwana procentriolą, położona pod kątem prostym względem macierzystego centrosomu. W centrosomie zlokalizowane są ligazy ubikwitynowe, a degradacja kinazy PLK4 w macierzystej centrioli jest warunkiem wytworzenia procentrioli [19]. W centrosomach, obok kinazy Aurora A są także zlokalizowane inne regulatory mitozy, takie jak polokinaza Plk, cyklina B i mitotyczne fosfatazy. W takich zduplikowanych centrosomach (macierzystym i procentrioli) związany jest na trwale aktywator Cdc20 ligazy ubikwityny APC/C (ang. *anaphase promoting factor*), który także pojawia się w anafazie w kinetochorach wszystkich chromosomów [20]. Niektóre komórki w końcowych etapach różnicowania tracą zdolność do wejścia w mitozę, co jest związane ze zmianami w centrioli. Centriola podczepia się do błony i wówczas w tym miejscu powstaje z niej (centriola staje się ciałkiem podstawowym) nieruchoma rzęska (ang. *primary cilium*). Dopiero „uwolnienie” centrioli z takiej rzęski przez kinazę Aurora A i białko HEF1 aktywują deacetylazę tubuliny HDAC6, co w konsekwencji prowadzi do inaktywacji punktu kontrolnego cyklu i umożliwia wejście komórki w cykl mitotyczny [18]. W komórkach acentriolarnych (które nie mają centrosomów, np. w linii komórek S2 *Drosophila*) przedni biegun komórki może być wyznaczony albo terminalnymi białkami polarnymi, albo (u drożdży) strukturami polarnymi (ang. *bud-neck sites*).

We wszystkich przypadkach w polarnej przedniej i tylnej lokalizacji biegunów wrzeciona uczestniczą mikrotubularne włókna łączące wrzeciono z błoną komórkową. Ich funkcje regulowane są przez białka G, kotwiczące białka cytoszkieletu aktywnego i miozyny (np. miozynę X) [15,21]. W centrosomach komórek ssaków, wyznaczających bieguny wrzeciona, wykryto podjednostki receptorów białek G (podjednostkę $G_{i\alpha}$) oraz białko RGS (ang. *regulator of G-protein signaling*) uczestniczące w regulacji lokalizacji i funkcji centrosomów w komórce [22]. Ważnym składnikiem centrosomu jest białko NuMA/LIN5 (ang. *nuclear protein associated with mitotic apparatus*) wykryte także w chroma-

tynie. Jest to regulator tworzenia wrzeciona mitotycznego i aktywności białek cytoszkieletu aktywnego kotwiczącego wrzeciono w komórce [15,21]. W anafazie, po degradacji cykliny B, białko NuMA/LIN5 znika z centrosomów, ale pojawia się we wrzecionie mitotycznym i reguluje funkcję białek G wrzeciona [23].

REGULACJA DUPLIKACJI BIEGUNÓW WRZECIONA MITOTYCZNEGO

Niedawno wykryto mechanizm regulacji tylko jednego cyklu duplikacji biegunów wrzeciona w trakcie mitozy. Okazało się, że w przypadku nadmiernej liczby centrioli w komórce (na ogół w komórce nowotworowej), centriole łączą się w zespoły, a komórka może nadal tworzyć dwubiegunowe wrzeciono. Łączenie poszczególnych centrioli w pojedynczą strukturę biegunową odbywa się prawdopodobnie dzięki udziałowi augmin [24].

W trakcie interfazy komórek grzybów, które nie posiadają centrioli, ich funkcje spełniają ciała biegunowe SPB (ang. *spindle pole bodies*) znajdujące się w otoczce jądrowej. W tworzących się biegunach, podobnie jak centriolach wchodzących w skład zespołu centrioli, występuje kompleks białek związanych z γ tubuliną – γ TuRC (ang. *γ tubulin ring complex*). Wyniki badań nad rolą kompleksu γ tubuliny w tworzeniu biegunów przyszłego wrzeciona mitotycznego w acentriolarnych komórkach *Drosophila* S2 wykazały, że białka należące do rodziny augmin (Dgt2-6) regulują biegunową lokalizację kompleksów γ TuRC [25] i organizację dwubiegunowych wrzecion mitotycznych, współdziałając z chromatyną w obecności aktywnych GTPaz Ran [26].

KONDENSACJA CHROMOSOMÓW W KOMÓRCIE I TWORZENIE KINETOCHORÓW

Wejście w mitozę związane jest z aktywacją GTPaz Rho i Ran aktywowanych przez odpowiednie białka GEF. W trakcie tego złożonego procesu dochodzi do kondensacji zduplikowanych chromosomów i wytworzenia dwóch kinetochorów na każdym chromosomie, zdolnych do wiązania włókien mikrotubularnych. Po rozproszeniu otoczki jądrowej, tworzy się lokalny gradient stężeń aktywnej formy Ran-GTP, który sprzyja dośrodkowej lokalizacji skondensowanych chromosomów (ang. *chromosome congression*) (Ryc. 1A) [27].

DWUBIEGUNOWE WRZECIONO MITOTYCZNE W PROMETAFAZIE

Oś dwubiegunowego wrzeciona wyznacza albo lokalizacja macierzystego centrosomu i centrosomu potomnego powstałego z procentrioli (który przesuwają się do drugiego bieguna komórki), albo oba centrosomy (lub ich równoważniki, na przykład u drożdży SPB), które wzajemnie rozsuwają się. Ruch ten zachodzi dzięki polimeryzacji włókien mikrotubularnych centrosomów. Jeżeli procesy aktywacji centrosomów przebiegają z tą samą dynamiką, w obu przypadkach powstaje wrzeciono symetryczne (Ryc. 1B) [2,15,21]. Jeżeli jednak zabraknie jednego z kilkunastu białek regulacyjnych (lub w obecności inhibitorów tych białek), powstaje wrzeciono jednobiegunowe (monopolarne) [2]. Zatem tworzenie dwubiegunowego wrzeciona jest procesem złożonym, w którym uczestniczą (przynajmniej

w komórkach zwierzęcych) kinazy (w tym Aurora A i B, polokinaza, CDK1), białka centrosomów regulujące promienistą polimeryzację mikrotubul na biegunach oraz białka motoryczne typu dynein. Dyneiny transportują dimery α/β mikrotubul do biegunów wrzeciona w czasie polimeryzacji na biegunach wrzeciona (ang. *aster formation*). Bieguny wrzeciona mitotycznego (centrosomy lub ich funkcjonalne równoważniki) stanowią więc ośrodki inicjacji polimeryzacji mikrotubul wrzeciona mitotycznego (MTOC, ang. *microtubule organizing centers*) [28].

Bieguny wrzeciona mitotycznego (MTOC) aktywują zachodzącą stosunkowo wolno polimeryzację cytoplazmatycznych dimerów α/β tubulin we włókna mikrotubularne z tym, że centriole nie są bezpośrednio połączone z tworzącymi się promieniście włóknami mikrotubularnymi. Polimeryzacja włókien mikrotubularnych jest spolaryzowana: rozpoczyna się od biegunów (są to tak zwane końce (-) mikrotubul). Dimery α/β tubulin dodawane są także na końcach (+) włókien; w tym wypadku polimeryzacja jest szybka, ale prowadzi do powstania niestabilnych mikrotubul. Niestabilne końce (+) włókien mikrotubularnych podlegają zmiennym losom; albo polimeryzują a nawet podlegają stabilizacji przez towarzyszące im białka, tzw. białka TIP końców (+), albo depolimeryzują na skutek własnej niestabilności. Ich depolimeryzacja może zachodzić także dzięki białkom o charakterze depolimeraz końców (+) włókien mikrotubularnych, takich np. jak białko MCAK lub katanina. Niektóre białka motoryczne, np. kinezyzna 7, CENP E (ang. *centromere protein E*) i inne białka towarzyszące mikrotubulom (np. KinI o charakterze kinezyzny, ale nie wykazujące aktywności motorycznej), są białkami uczestniczącymi w stabilizacji włókien mikrotubularnych; są to włókna wychodzące z biegunów, które natrafiły na kinetochor chromosomu [2].

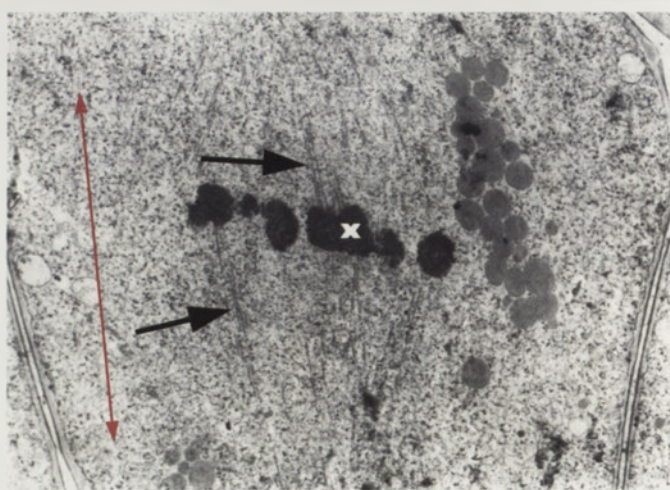
Ostateczna struktura wrzeciona jest wynikiem procesów zachodzących na zasadzie „prób i błędów” i obejmuje trzy typy włókien mikrotubularnych. Pierwszy typ to włókna mikrotubularne skierowane ku biegunom komórki, tworzące tak zwane włókna astralne (lub anastralne w przypadku funkcjonalnych równoważników centrosomów), podczepiające bieguny do błony komórkowej lub biegnące ku strefie równikowej wrzeciona tuż pod błoną komórkową. Często zdarza się, że te włókna pochodzące z różnych biegunów biegną równolegle względem siebie, ale mają różną polarność, a więc są włóknami anty-równoległymi i mogą wtedy wzajemnie oddziaływać ze sobą przez białka sieciujące (sprzyja to stabilizacji włókien centralnego wrzeciona mitotycznego). Drugi typ to włókna mikrotubularne skierowane do wnętrza komórki i tworzące tak zwane włókna międzybiegunowe. Włókna międzybiegunowe mogą mieć położenie anty-równoległe i podlegać sieciowaniu. Trzecią grupę włókien stanowią mikrotubule, które łączą oba bieguny mitotyczne z kinetochorami chromosomów, spychając je ku równikowi. Są to tak zwane włókna kinetochorowe (ang. *K fibers*) [28].

W różnych typach komórek (drożdży, *Drosophila*, *Xenopus* i w liniach komórek człowieka) tworzeniu włókien kinetochorowych towarzyszy wędrująca do końca (+) mikrotubuli kinezyzna motoryczna Eg5/BimC/KLP61F/XIEg5/

HsEg5. Ta niezwykła kinezyzna jest bipolarnym homotetramerem i jest zdolna jednocześnie do sieciowania i wiązania równoległe spolaryzowanych włókien, a także do rozsuwania włókien w położeniu anty-równoległym. Te cechy kinezyzny Eg5 powodują, że może ona powodować ruch przyległej cytoplazmy ku biegunom (ang. *poleward flux*) i zarazem rozsuwać centrosomy i naprężać włókna chromosomowe wrzeciona [29]. Inną ważną grupę białek towarzyszących włóknom chromosomowym są białka motoryczne (+) typu MKLP (ang. *mitotic kinesin like protein*), ulegające fosforylacji w mitozie przez kinazę Aurora A. Nadmiar białek MKLP powoduje nie tylko zaburzenia w tworzeniu dwubiegunowego wrzeciona, ale stymuluje replikację DNA jądrowego i zatrzymanie podziału komórki. Ten rodzaj tetraploidii występuje w komórkach nowotworowych, a zapobiega mu związanie domeny kinezyzny Eg5 C z końcem kinezyzny MKLP kontrolującej przebieg mitozy [30].

METAFAZA

Chromosomy, które nie są jeszcze podczepione dwustronnie do wrzeciona, mogą ślizgać się po prawidłowo podczepionym chromosomie, dzięki występowaniu na kinetochorze mikrotubularnej kinezyzny CENP-E (Ryc. 1C) [31]. Szczególną rolę w metafazie odgrywają także kondensyny wywołujące kondensację chromosomów [32]; kondensacja umożliwia utworzenie kompleksu GTPazy Cdc42 z białkiem mDia3 (ang. *formin*) w kinetochorach, stabilizując połączenia dwóch kinetochorów z mikrotubulami wrzeciona wybiegającymi z dwóch biegunów [33]. W ten sposób chromosomy ostatecznie gromadzą się w strefie równikowej komórki i są podczepione za pomocą włókien K, tworząc tzw. płytkę metafazową (ang. *metaphase plate*) ułożoną prostopadle do osi wrzeciona (Ryc. 2). W tym czasie dochodzi do aktywacji kinezyzny MKLP1 (ang. *mitotic kinesin-like-protein 1*) na końcach (+) włókien mikrotubularnych, która tworzy dimer z białkiem MgcRac GAP (zdolnym do aktywacji GEFGTPaz typu Rac). Dimer ten (MKLP1 i MgcRacGAP) nazwano centralspindliną (ang. *centralspindlin*). Aktywność



Rycina 2. Elektronogram komórki mikrosporocyta w pylniku *Nymphaea alba* wykonany wzdłuż osi dwubiegunowego wrzeciona. W płytce metafazowej widoczne są skondensowane chromosomy (jeden z nich zaznaczono jako X) oraz mikrotubularne włókna kinetochorowe podczepione z obu stron (strzałki) do kinetochorów chromosomów. Zaznaczono również oś wrzeciona (czerwona strzałka). Autorzy dziękują prof. dr hab. Ewie Szczyrze z Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie za udostępnienie zdjęcia.

centralspindliny jest regulowana w metafazie przez białko sieciujące Cep55 (ang. *centrosomal protein 55kDa*) [34], przez białko Rho GEF (czyli białko Ect2/Pebble), białko Cdc20 (kofaktor APC/C) w kinetochorach oraz białko sieciujące PRC1/ase1/MAP65 (ang. *protein regulating cytokinesis*), które hamuje aktywność centralspindliny [35]. Wymienione białka regulują pojawianie się centralspindliny w strukturach mikrotubularnych wrzeciona mitotycznego, a to z kolei inicjuje przejście komórki do anafazy [36].

WCZESNA ANAFAZA

Centralspindlina występuje we włóknach astralnych (mikrotubulach wychodzących z biegunów wrzeciona mitotycznego ku korteksowi) i w korteksie przylegającym do wrzeciona mitotycznego w strefie równikowej (Ryc. 1D). W tym okresie kinaza Aurora B w kinetochorach katalizuje reakcję fosforylacji szeregu białek towarzyszących kinetochorom i aktywuje separazę. Anafazę charakteryzuje spadek aktywności kinazy CDK1 i aktywacja separazy oraz fosfatazy mitotycznej Cdc14, co powoduje rozdział potomnych chromosomów w regionie kinetochorów [21]. Następnie wybiórcza depolimeryzacja włókien chromosomowych (włókien K) wywołuje ich skracanie i segregację chromosomów potomnych. Taka depolimeryzacja włókien kinetochorowych odbywa się tylko na końcu (+) kinetochorów i jest katalizowana przez specyficzną, lokalnie działającą, depolimerazę – białko motoryczne MCAK (ang. *mitotic centromere associated kinesin*). Białko to ulega aktywacji w wyniku fosforylacji przez kinazę Aurora B [36]. Procesowi rozdziału chromatyd towarzyszy także stopniowa degradacja cykliny B, a następnie przemieszczanie białka NuMA z centrosomu do wrzeciona mitotycznego, co wymaga defosforylacji tego białka, w celu uwolnienia go z kompleksu z dyneiną i dynektyną w centrosomie [23].

STREFA RÓWNIKOWA WE WCZESNEJ ANAFAZIE I TWORZENIE BRUZDY PODZIAŁOWEJ

Włókna astralne pełnią zasadniczą rolę w powstawaniu strefy równikowej wyznaczonej przez w kontakt centralnego wrzeciona mitotycznego i centralspindliny z błoną komórkową (Ryc. 1E). W tworzeniu strefy równikowej, a następnie bruzdy podziałowej uczestniczą białka sieciujące Eg5 [29], CEP55 [34] i PRC1 [35]. Białka te przenoszą sygnał z wrzeciona do błony komórkowej i w strefie ich kontaktu tworzą pierścień równikowy. Wytworzenie kurczliwego pierścienia (ang. *contractile assembling of ring*) (przynajmniej w przebiegu mitozy komórek *Drosophila* i ssaków) wymaga bezpośredniego kontaktu mikrotubul połączonych z centralspindliną ze strefą równikową w obecności aktywnej formy białka GTP-GEF (Ect2/Pebble) i cytoplazmatycznych GTPaz RhoA i Cdc42. Aktywne białko RhoA, znajdujące się w regionie bruzdy podziałowej, odpowiada za rekrutację do błony plazmatycznej składników pierścienia kurczliwego, takich jak miozyna II, aktyna, formina i anilina [38]. Dodatkowym elementem strukturalnym pierścienia są GTPazy septyny, które występują jako dwa podbłonowe pierścienie w przewężeniu pomiędzy komórką rodzicielską a pączkiem u drożdży, we fragmoplaście dzielących się komórek roślin, a także w bruzdzie komórek zwierzęcych. Septyny spełniają rolę bariery w dyfuzji wielu czynników

cytoplazmatycznych pomiędzy tworzącymi się komórkami potomnymi [39].

CYTOKINEZA - WYTWORZENIE KURCZLIWEGO PIERŚCIENIA

Następnym etapem jest związanie GTPazy Rho z fosfolipidami błony komórkowej czemu towarzyszy zahamowanie aktywności białka Rho GEF (Ryc. 1F) [15,40]. Cytokineza wymaga bowiem aktywności białka Rac GAP (w celu zahamowania aktywności GTPazy Rac) i lokalnej aktywacji błonowej GTPazy (a więc tylko lokalnie działającego białka Rho GAP). Proces ten opisano przy okazji odkrycia, że białko MgcRac GAP centralspindliny (funkcjonujące jako białko GAP dla GTPaz Rac i Cdc42) jest funkcjonalnie zmienione na białko Rho GAP w wyniku fosforylacji przez kinazę Aurora B [41]. Proces ten jest sprzężony z przemieszczeniem się kinazy Aurora B (i innych białek) z kinetochorów do strefy bruzdy podziałowej i powstaniem w tej strefie kurczliwego pierścienia aktomiozynowego [38]. Podobnie inne białko regulatorowe IQGAP1 (ang. *Cdc2 i Rac1-interacting protein*) przemieszcza się z wrzeciona i korteksu do pierścienia cytokinetycznego oocytów myszy regulując lokalizację septyny i bruzdy podziałowej w mejozie [42]. Podsumowując, przebieg mitozy jest regulowany przez: (1) aktywację kolejnych regulatorów mitozy (kinaz, fosfataz, białek G), a (2) w końcowych stadiach mitozy przez podlegającą ścisłej regulacji proteolizę wielu białek, oraz (3) przemieszczenie białek z jednej struktury mitotycznej (na przykład wrzeciona lub centrosomu) do bruzdy podziałowej [1,42].

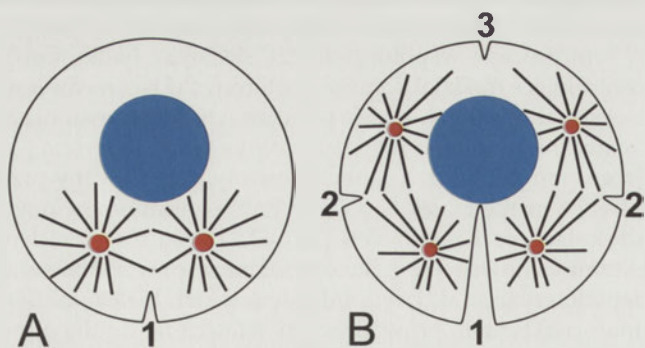
WIELOETAPOWE PROCESY ZWIĄZANE Z POWSTANIEM BRUZDY PODZIAŁOWEJ I ROZDZIAŁEM KOMÓREK POTOMNYCH

W przebiegu cytokinezy wyróżnia się dwa odrębne stadia: stadium pierwotnego wpuklenia się bruzdy podziałowej i stadium rozdzielenia komórek potomnych [1,38,43]. Tworzenie się bruzdy podziałowej wymaga z jednej strony wytworzenia sprawnego pierścienia kurczliwego, a z drugiej wytworzenia dodatkowej błony cytoplazmatycznej umożliwiającej jej wpuklenie. Dodatkowa błona komórkowa dostarczana jest do bruzdy w postaci pęcherzyków wydzielniczych wytwarzanych w systemie trans aparatu Golgiego, a ich fuzja z błoną komórki zależy od GTPaz Rab [43]. W tym procesie współuczestniczy sieciujące białko Cep55, kontrolujące rozdział komórek potomnych i tworzenie kompleksu tak zwanych białek podróżnych, które znajdują się ostatecznie w błonie rozdzielającej komórki potomne [34]. Proces ten jest bardzo skomplikowany i regulowany przez odrębną grupę białek G (GTPaz Rab) i został omówiony w artykułach przeglądowych [1,21,43,44]. Skurcz pierścienia aktomiozynowego w trakcie cytokinezy przyczynia się do depolimeryzacji aktyny z udziałem takich białek, jak kofilina i α -aktynina, prowadzących ostatecznie do depolimeryzacji wrzeciona mitotycznego [44]. Przebieg cytokinezy zależy także od degradacji cyklin i szeregu białek mitotycznych (kinazy Plk i Aurora B), białek sieciujących wrzeciono i aniliny oraz białka regulatorowego IQGAP1 [36]. Degradacji tych białek towarzyszy zanik wrzeciona mitotycznego i przejście komórek potomnych w fazę G1 cyklu [44].

WYZNACZANIE POZYCJI BRUZDY PODZIAŁOWEJ W KOMÓRKACH WIELOBIEGUNOWYCH I W KOMÓRKACH Z PRZESUNIĘTYMI WRZECIONAMI

Jakkolwiek w badaniach na komórkach ssaków stwierdzono, że centralne wrzeciono mitotyczne jest głównym źródłem pozycjonowania i indukcji tworzenia bruzdy podziałowej [45], inni badacze [46] zaobserwowali, że usunięcie z dzielącej się komórki jeźowca wrzeciona mitotycznego nie zakłóca przebiegu cytokinezy. Jeszcze większe zdumienie wzbudził wynik innego doświadczenia [47] przeprowadzonego na dzielących się komórkach jajowych jeźowca. Przy pomocy tępej igły przesunięto w komórce jajowej wrzeciono na jedną stronę, co spowodowało ukończenie mitozy z jednostronną bruzdą podziałową (a więc powstanie dwujądrowej komórki z jednostronną bruzdą 1) (Ryc. 3A). Taka dwujądrowa komórka w następnym cyklu mitotycznym tworzyła oczywiście dwa dwubiegunowe wrzeciona i dwie bruzdy, ale także powstawała w niej dodatkowa trzecia bruzda (mniej sprawna) pomiędzy oboma wrzecionami (Ryc. 3B). Taki wynik sugerował, że u jeźowców dwa bieguny nawet różnych wrzecion mogą indukować powstanie pomiędzy nimi bruzdy, bez bezpośredniego udziału centralnego wrzeciona mitotycznego. W jeszcze innym doświadczeniu przesunięto igłą wrzeciono mitotyczne w komórkach jajowych jeźowca ku tyłowi, co spowodowało bardzo szybką regresję tworzącej się już w środku komórki bruzdy i wytworzenie nowej bruzdy w tylnej części komórki, odpowiadającej nowej lokalizacji wrzeciona [48]. Dane uzyskane w opisanych doświadczeniach pozostawały w sprzeczności z obowiązującym modelem podziału komórki zwierzęcej, w którym wrzeciono mitotyczne wyznacza równikowe położenie bruzdy podziałowej. Problemy te były nierozwiązane przez wiele lat.

Dopiero porównanie przebiegu mitoz w komórkach jajowych jeźowca, w komórkach *Drosophila*, *Xenopus* i ssaków pozwoliło na wyjaśnienie tej sprzeczności [49]. W trakcie badań stwierdzono, że położenie biegunów wrzeciona mitotycznego, począwszy od stadium późnej anafazy, jest już kompetentne i pozwala na wyznaczenie pozycji bruzdy w każdym rejonie korteksu, jeśli tylko mikrotubule astralne,



Rycina 3. Schemat doświadczenia Rappaporta wykonanego na jaju jeźowca, prowadzącego do powstania strefy tworzenia bruzdy podziałowej pomiędzy biegunami różnych wrzecion mitotycznych. Objasnienia: A) schemat powstawania jednostronnej bruzdy (1) w jaju z mechanicznie przesuniętym wrzecionem mitotycznym przez przygniecenie jaja tępej igłą (kolor niebieski regionu zgniecionego), co prowadzi do powstania komórki dwujądrowej. B) następny podział mitotyczny prowadzi do jednostronnego utworzenia bruzd podziałowych w każdym mitotycznym wrzecionie (2), oraz do powstania dodatkowej trzeciej bruzdy (3) pomiędzy biegunami różnych wrzecion. Funkcjonalne bieguny wrzecion z promienistymi włóknami mikrotubularnymi zaznaczono czerwonym kolorem.

biegnące pod korteksem ku równikowi z obu biegunów komórki, przyjmują wzajemne położenie włókien anty-równoległych (ang. *overlapping of astral microtubules*) i zostaną połączone przez białka sieciujące. Takie procesy mogą zachodzić także między biegunami różnych wrzecion mitotycznych. Zdolność do tworzenia dodatkowej bruzdy w takich przypadkach wynika z faktu, że w anafazie cały korteks komórki jest już przygotowany do zapoczątkowania powstania pierścienia aktomiozynowego, w którym uczestniczy GTPaza Cdc42. Wykazano także, że zlokalizowany proces specyficznej aktywacji GTPazy Rho przez białko MgcRac GAP może zachodzić między wszystkimi biegunami wielojądrowej komórki (Ryc. 3) i może być szybko zmieniony w wyniku mechanicznego przesunięcia wrzeciona [15,38,41]. Wobec tego wyznaczenie położenia bruzdy (lub bruzd) i możliwość szybkiej zmiany lokalizacji bruzdy po przesunięciu wrzeciona mitotycznego jest procesem doraźnym i krótkotrwałym (trwającym około 2 minut), a towarzyszy temu gromadzenie się i szybka aktywacja białka Rac GAP, a następnie GTPazy Rho w rejonie tworzącej się bruzdy [41]. Wówczas nawet w przypadkach zmiany położenia wrzeciona lub oddziaływań biegunów różnego pochodzenia, może powstać bardzo szybko (w ciągu 20 sekund) strefa rekrutacji aktomiozyny i innych białek pierścienia kurczliwego.

Przytoczone dane nie do końca tłumaczą, w jaki sposób dochodzi do wyznaczenia pozycji bruzdy podziałowej w komórkach roślin wyższych. W acentriolarnych komórkach roślinnych lokalizacja przyszłej bruzdy odbywa się przed wejściem komórki w mitozę, a nie w trakcie mitozy, jak to ma miejsce w komórkach zwierzęcych i w komórkach drożdży. Ta wczesna lokalizacja bruzdy jest wyznaczona przejściowym pojawianiem się okrężnego pasma mikrotubul i filamentów aktynowych przed przejściem do profazy (PPB ang. *preprophase band*). Pierścień ten zanika po wejściu komórek w mitozę, ale wyznacza miejsce, w którym w trakcie cytokinezy wytworzy się fragmoplast czyli nowa ściana komórkowa pomiędzy komórkami potomnymi. Sugeruje to, że pierścień PPB jest źródłem sygnałów wyznaczających położenie strefy równikowej wrzeciona [44,51].

WYZNACZANIE POZYCJI BRUZDY PODZIAŁOWEJ PRZEZ FIBRONEKTYNĘ

Komórki nabłonkowe linii HeLa, wysiane na podłożu pokrytym fibronektyną, przylegają do tego podłoża. Skoordynowane działanie integryn i receptorów typu RTK wpływa na zdolność komórek do wejścia w mitozę. Adhezja komórek do podłoża powoduje, że w trakcie mitozy wrzeciono aktywnie zmieniają swoją orientację w komórce, przyjmując pozycję równoległą do podłoża. Dzięki temu komórki potomne także przylegają do podłoża pokrytego fibronektyną lub macierzą zewnątrzkomórkową. Proces dostosowania pozycji wrzeciona mitotycznego względem podłoża stanowi odpowiedź na sygnał jakim jest oddziaływanie integryn (receptorów) korteksu i fibronektyny (liganda receptorów integrynowych). Sygnał ten powoduje, że włókna mikrotubularne (ang. *retraction fibers*) wraz z białkami związanymi z cytoskieletem aktynowym w części korteksu, która przylega do podłoża, „ciągną” znacznie silniej, niż słabsze i łatwo odkształcające się włókienka mikrotubularne w „grzbietowej” części korteksu czyli tej, która nie przylega do podłoża

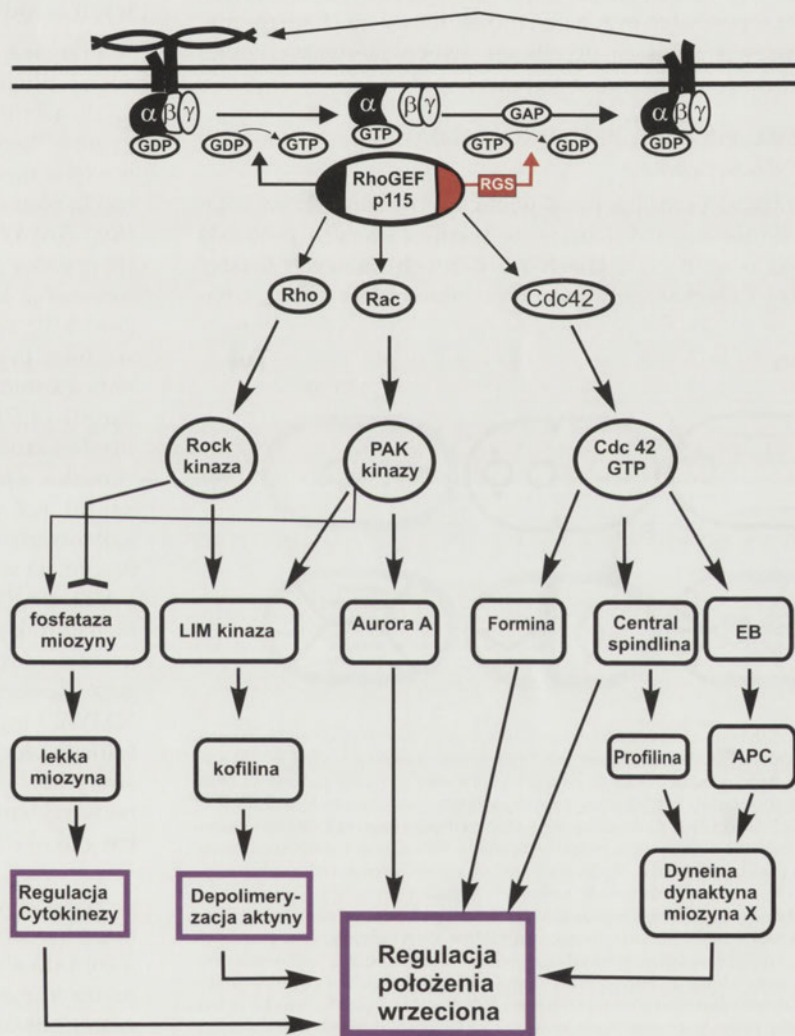
[15,52]. Oznacza to, że proces reorientacji wrzeciona mitotycznego związany jest z dynamicznym generowaniem sił (ang. *force generation*) we wrzecionie, które prowadzą do jego rotacji. [3,15,52]. W trakcie prometafazy proces ten indukuje aktywację GTPazy Rho (Cdc42) i mDia, które regulują odpowiednie ułożenie chromosomów w płycie metafazowej [15,33]. Zmiana położenia wrzeciona, a następnie bruzdy podziałowej, zachodzi w wyniku oddziaływań włókien astralnych z korteksem poprzez silniejsze lub słabsze działanie białek kotwiczących mikrotubule wrzeciona w błonie komórkowej. Białkami kotwiczącymi są białko EB (ang. *end binding protein*) i białko APC (ang. *adenomatous polyposis coli*). Oba białka należą do rodziny białek przesuwających się po mikrotubulach ku końcowi (+) (ang. *plus end tracking proteins*), a ich przesuwanie i zakotwiczenie w błonie reguluje stopniową zmianę położenia wrzeciona komórki przylegającej do podłoża [15]. Mechanika procesu rotacji wymaga

obecności w korteksie także specyficznej miozyny X oraz zmian w składzie fosfolipidów błony komórkowej [15]. Reorientację wrzeciona, obok procesów ciągnięcia wrzeciona przez mikrotubule astralne, ułatwia także przejściowe skracanie i depolimeryzacja „grzbietowych” włókien astralnych. Położenie bruzdy podziałowej komórki przyczepionej do podłoża pokrytego fibronektyną zostaje wyznaczone przez płaszczyznę równika obróconego wrzeciona, czemu towarzyszy lokalna aktywacja GTPazy RhoA [1,3,15,21,52]. Z zastosowaniem techniki wyciszenia genu *Cdc42* (RNAi) stwierdzono, że proces ten zakłóca prawidłową reorientację wrzecion mitotycznych w komórkach przylegających do podłoża, między innymi przez zahamowanie zmian w składzie fosfolipidów błon oraz aktywności kinaz PAK (ang. *p21 activated kinases*), która jest regulowana przez GTPazę *Cdc42* [53].

W nieobecności fibronektyny, nieaktywne podjednostki receptora integrynowego (GPCR) są związane z nieaktywnym heterotrimerycznym białkiem G (zbudowanym z podjednostek $G\alpha$ i $G\beta\gamma$; podjednostka $G\alpha$ jest związana z GDP). Taki nieaktywny kompleks związany z nieaktywnym receptorem integryny, nie działa na cytoplazmatyczne białko regulatorowe p115 Rho GEF [21]. Dopiero aktywacja receptora GPCR przez fibronektynę powoduje dwójaki efekt: 1) białko p115 Rho GEF podlega aktywacji i działa na $G\alpha$ 12/13, co wywołuje dysocjację kompleksu na aktywną podjednostkę $G\alpha$ GTP i podjednostkę $G\beta\gamma$, 2) cytoplazmatyczne białko p115 Rho GEF jednocześnie aktywuje monomeryczne GTPazy typu Rho (Rac i Cdc42). Aktywowane GTPazy typu Rho są mediatorami regulującymi przestrzenne rozmieszczenie białek EB i APC w korteksie komórki przyczepionej do podłoża.

W ten sposób powstają asymetrycznie siły oddziałujące na włókna astralne i powodujące opisaną wyżej zmianę orientacji wrzeciona mitotycznego [54].

Aktywacja białka p115 Rho GEF powoduje nie tylko przeniesienie sygnału fibronektyny z receptorów GPCR (w tym przypadku jest nim integryna) na monomeryczne GTPazy uczestniczące w regulacji cytoszkieletu, ale jednocześnie aktywuje zmianę strukturalną w podjednostkach białka G, umożliwiając związaną się białka RGS z błoną komórkową w pobliżu receptora GPCR. Białko RGS rozdziela podjednostki $G\alpha$ 12/13 i podjednostki $G\beta\gamma$ białka G. Pełni także funkcje specyficznego białka GAP dla podjednostek $G\alpha$ 12/13, przywracając po zakończeniu mitozy, pierwotny nieaktywny stan GPCR (Ryc. 4) [55].



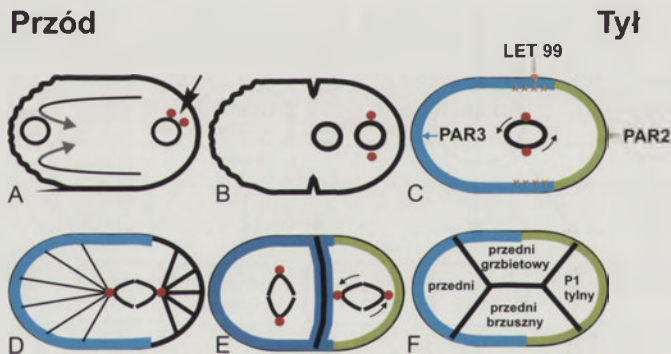
Rycina 4. Schemat receptorowej ścieżki sygnalizacyjnej aktywowanej fibronektyną z udziałem białka p115 Rho GEF. Heterodimeryczny receptor integrynowy sprzężony z nieaktywnym kompleksem heterotrimerycznego białka $G\alpha\beta\gamma$ GDP ulega aktywacji w obecności fibronektyny (nici dotykające receptor integrynowy), co prowadzi do aktywacji specyficznego białka p115 Rho GEF. Strzałki czarne – aktywacja i rekrutacja białka p115 Rho GEF z cytoplazmy do błony plazmatycznej, aktywacja podjednostki $G\alpha$ 12/13 w białku G, przeniesienie sygnału do cytoplazmy oraz (w wyniku aktywacji GTPaz Rac1 i Cdc42) do mediatorów i efektorów powodujących wytworzenie i reorientację funkcjonalnej bruzdy cytokinetycznej. Czerwona strzałka przy białku p115 Rho GEF – zakończenie stymulacji GTPaz monomerycznych przez sygnał RGS (czerwony prostokąt), który przywraca nieaktywny stan białka G sprzężonego z receptorem integrynowym (prawy receptor spoczynkowy staje się zdolny do ponownej aktywacji przez fibronektynę tak jak to pokazuje strzałka). Opracowano na podstawie [3,4,10].

MECHANIZM NIERECEPTOROWYCH ASYMETRYCZNYCH MITOZ - ORIENTACJA WRZECIONA W ZARODKU *C. elegans*

W poprzednich rozdziałach opisana została dynamika przebiegu mitozy i cytokinezy, która powoduje powstanie dwóch identycznych komórek potomnych. Opis asymetrycznej cytokinezy [15,21] w dwóch pierwszych podziałach zygoty nicienia otwiera jednak zupełnie nowe problemy. Proces bruzdkowania zapłodnionego jaja nicienia związany jest z regulacją rozmieszczenia determinantów wyznaczających odmienne losy poszczególnych komórek (blastomerów) zarodka. Ten przestrzenny rozdział determinantów do blastomerów wiąże się z wyznaczaniem pozycji wrzecion mitotycznych i ich zmianami w pierwszym i drugim podziale mitotycznym zygoty nicienia. Mitozy te odbywają się w otocze zarodka; wykluczono oddziaływania z jakimikolwiek ligandami i nie wykryto receptorów, które mogłyby powodować rotację wrzecion w niektórych blastomerach. Jaki jest wobec tego przebieg i molekularny mechanizm niereceptorowej regulacji przebiegu dwóch pierwszych cykli komórkowych w zarodku nicienia?

PRZEBIEG PROCESU BRUZZKOWANIA NICIENIA *C. elegans*

W trakcie embriogenezy wielu typów zarodków pojawiają się mitozy różnicujące, w wyniku których powstają komórki o różnych cechach i o różnych dalszych losach. Przebieg i mechanizmy tego typu rozwoju są dobrze zba-



Rycina 5. Schemat zmian morfologicznych w trakcie dwóch cykli mitotycznych bruzdkowania zarodka *C. elegans*. A) Zapłodnienie zarodka i tylna lokalizacja (strzałka) pronukleusa męskiego i dwóch centrosomów (kolor czerwony) oraz wytworzenie prądów cytoplazmatycznych związanych ze zmianą lokalizacji białek PAR3, PAR6 i aPKC do korteksu bieguna przedniego komórki; efektem zmian jest zwiększona kurczliwość korteksu w tej strefie. Pronukleus żeński znajduje się w części przedniej zarodka. B) Oscylacyjne fale kurczliwego korteksu przedniego, tworzenie przewężenia bruzdy rzekomej na granicy sztywniejszego korteksu bieguna tylnego i przesunięcie pronukleusa żeńskiego ku tyłowi zarodka. C) Etap „centrowania”, zanik fal kurczliwości i ustalenie kortykalnych stref: przedniej (kolor niebieski) i mniejszej tylnej (kolor zielony). Zanik otoczek jądrowych obu pronukleusów i rotacja centrosomów (regulowana przez słabe i zmienne przyczepy włókien mikrotubularnych białkiem LET99, małe czerwone strzałki) w ten sposób, aby jeden centrosom był skierowany ku biegunowi przedniemu, a drugi ku biegunowi tylnemu zarodka. Wejście komórki w profazę pierwszego podziału mitotycznego. D) Anafaza pierwszego podziału mitotycznego; wytworzone wrzeciono mitotyczne jest aktywnie przesuwane ku biegunowi tylnemu komórki dzięki silnemu ciągnięciu wrzeciona przez włókna astralne bieguna tylnego. To przesunięcie powoduje, że bruzda podziałowa rozdziela większy blastomer przedni AB z białkami kortykalnymi przednimi PAR3, PAR6 i aPKC (kolor niebieski) od mniejszego blastomeru tylnego P, charakteryzującego się obecnością białek kortykalnych bieguna tylnego, PAR1 i PAR2 (kolor zielony). E) Drugi podział mitotyczny: prostopadła orientacja wrzeciona mitotycznego w blastomerze przednim AB i rotacja wrzeciona mitotycznego w blastomerze P (strzałki). F) Wytworzenie czterech blastomerów; regulacja przestrzenna determinantów w poszczególnych blastomerach po dwóch mitozach różnicujących zarodka.

dane w przypadku zarodka nicienia *C. elegans*. Wyniki pionierskich badań (rozpoczętych przez laureata nagrody Nobla z 2002 roku, H. Roberta Horvitz) wykazały, że u nicienia występują specyficzne białka subkortykalne oraz ich kinazy; mutacje w genach kodujących wymienione białka powodowały podział symetryczny zarodka nicienia i następnie jego śmierć. Mutanty te nazwano mutantami PAR (ang. *partitioning defective*). Okazało się, że polarność oocyty nicienia wyznaczają kompleks białek PAR-3, PAR-6 i atypowej kinazy aPKC-3, zlokalizowany w korteksie bieguna przedniego komórki. Z korteksem tylnego bieguna związane są białko PAR-1 i kinaza serynowo-treoninowa PAR2. Natomiast kinaza PAR-4 i białko PAR 5 (o charakterystyce białka 14-3-3) są równomiernie rozłożone w korteksie oocyty, biorąc udział w utrzymywaniu polarnego rozkładu innych białek PAR. Wykazano także, że kinaza PAR1 w tylnym biegunie reguluje lokalizację subkortykalnych ziaren P, które są wyznacznikami przyszłej linii komórek płciowych zarodka.

Przebieg dwóch pierwszych podziałów zarodka nicienia został zilustrowany na Ryc. 5 [56]. Po wnikięciu plemnika do acentriolarnego jaja rozpoczyna się pierwszy podział zygoty. Plemnik wnosi do zapłodnionego jaja zarówno pronukleus męski, jak i duplikujący centrosom. Miejsce wnikięcia plemnika wyznacza biegun tylny powstającej zygoty (Ryc. 5A) W ciągu następnych 8 minut odbywa się aktywacja prądów cytoplazmatycznych pod korteksem, które skierowane są ku przodowi komórki, a na biegunie przednim zawracają w głębszych warstwach cytoplazmy do tyłu, powodując przesuwanie matczynego pronukleusa do tylnego końca komórki. Stadium to poprzedza polaryzację korteksu zarodka [57]. W tym okresie zachodzi funkcjonalne i strukturalne zróżnicowanie przedniej i tylnej strefy kortykalnej zarodka, a przez to wyznaczenie przednio-tylnej osi zarodka. Jak już wspomniano, w przedniej części korteksu zlokalizowany jest kompleks białek PAR-3, PAR-6 i aPKC-3, natomiast w mniejszej części tylnej są zlokalizowane białka PAR2, PAR1 i ziarna P (Ryc. 5B). Opisane zmiany w strefach korteksu powodują przestrzenne zróżnicowanie kurczliwości korteksu: przez przednią część korteksu przebiegają oscylacyjne fale skurczów, dzięki obecności miozyny NMY-2 (ang. *non-mitotic myosin 2*) i aktyny; tylko korteks tylnego bieguna zarodka zachowuje sztywność. Na granicy strefy kurczliwej i sztywnej pojawia się przejściowo wyraźne wpuklenie, tak zwana bruzda rzekoma [38]. Stadium to trwa około 30 minut (Ryc. 5B) [57].

Wejście w mitozę charakteryzuje zanik oscylacyjnych fal kurczliwości korteksu. Dochodzi wówczas do biernego powrotu do strefy środkowej zespolonych już pronukleusów matczynego i ojcowskiego wraz z przylegającymi dwoma zduplikowanymi centrosomami tworzącymi tzw. kompleks jądrowo-centrosomalny (ang. *nuclear-centrosomes complex* NCC). Jest to stadium tak zwanego „centrowania” jądra [58]. W trakcie prometafazy następuje rotacja kompleksu NCC, w wyniku której centrosomy przyjmują pozycję zgodną z polarnością zarodka (Ryc. 5C). Położenia centrosomów (które wyznaczają oś wrzeciona mitotycznego) regulowane jest przez wychodzące z nich włókna mikrotubularne, zakotwiczone centrosomy w korteksie. Biegunowe włókna mikrotubularne wychodzące z obu centrosomów są stabil-

ne. Włókna boczne, tworzące okrężny równikowy pas, zawierają specyficzne białko LET 99 (ang. *DEP domain LET99 protein*), którego obecność powoduje, że włókna te są słabiej zakotwiczone. A więc mikrotubule boczne generują słabsze „ciągnięcie” centrosomów do błony komórkowej, uczestnicząc w ten sposób w regulacji przestrzennego rozmieszczenia centrosomów. Doświadczalnie wykazano, że mutanty LET99 wykazują nadmierne oscylacje i zmienne położenia kompleksu NCC, a następnie zmienną lokalizację bruzdy podziałowej w zarodku [59]. Ostatecznie białka kompleksu PAR3, PAR6 i aPKC, które początkowo były zlokalizowane na przednim biegunie komórki, tworzą warstwę subkorytkalną obejmującą dwie trzecie długości zarodka, która graniczy z korteksem bieguna tylnego (Ryc. 5C). W tym stadium profazy otoczka jądrowa obu pronukleusów ulega rozproszeniu i odbywa się kondensacja wszystkich chromosomów. W metafazie odpowiednio rozmieszczone centrosomy tworzą funkcjonalne dwubiegunowe wrzeciono mitotyczne. W anafazie wrzeciono to zostaje przesunięte ku tyłowi komórki co decyduje o jej asymetrycznym podziale. (Ryc. 5D). Doświadczalnie wykazano, że przesunięcie bruzdy ku tyłowi komórki, w czasie pierwszego podziału zygoty, związane jest z aktywnością fosfolipidów błony [15] i spowodowane jest większą siłą ciągnięcia tylnych włókien astralnych wrzeciona mitotycznego niż przednich [60,61]. W ten sposób przesunięta ku tyłowi bruzda podziałowa dzieli zarodek na większy blastomer przedni (nazwany blastomerem AB) i mniejszy tylny blastomer P. A więc jest to asymetryczna mitoz różnicująca. Białka motoryczne: dyneiny oraz białko NuMA/Lin-5, także wpływają na asymetrię podziału [15]. Należy podkreślić, że mutanty z delecją genów *PAR-3*, *PAR-2* i *GTPazy Cdc42* traciły zdolność do przesunięcia wrzeciona ku tyłowi komórki i zarodki dzieliły się symetrycznie. Mutanty te wykazywały także defekty cytokinezy, a potomne blastomery ginęły po paru podziałach [57].

W trakcie drugiego podziału bruzdkowania, zgodnie z regułą Sachsa, oś wrzeciona komórki wyznaczona przez położenie centrosomów w blastomerze AB jest prostopadła w stosunku do pierwszego podziału bruzdkowania, natomiast w blastomerze P odbywa się rotacja wrzeciona mitotycznego i jego oś przebiega tak samo, jak w pierwszym podziale (Ryc. 5E, strzałki). W rezultacie po dwóch podziałach mitotycznych powstają cztery blastomery; tylny blastomer P-2 zawiera ziarna P (Ryc. 5F).

GENETYCZNE UWARUNKOWANIA ROTACJI WRZECIONA MITOTYCZNEGO W PROCESIE BRUZZKOWANIU NICIENIA

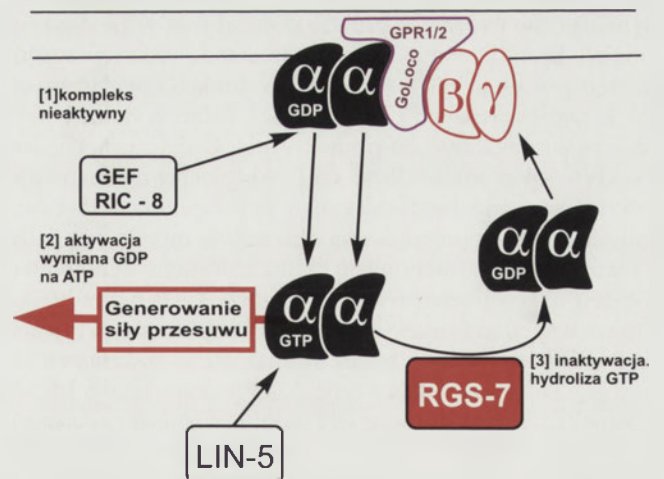
Rotacja wrzeciona w blastomerze P zależy od obecności subkorytkalnego białka PAR3; niefunkcjonalne mutanty genu *PAR3*, lub delecja tego genu charakteryzują się brakiem rotacji wrzeciona w blastomerze P w 70% zarodków w drugim podziale bruzdkowania. Natomiast mutacje genu kodującego białko PAR2 powodowały, że w 20% zarodków zachodziła rotacja wrzecion, zarówno w blastomerze AB, jak i P, po czym wszystkie zarodki ginęły. A więc prawidłowa determinacja dalszych losów czterech blastomerów nicienia wymaga prawidłowej reorientacji wrzeciona w blastomerze P [62].

UDZIAŁ BIAŁEK G W NIERECEPTOROWYM MECHANIZMIE ASYMETRYCZNEGO BRUZZKOWANIA ZYGOTY NICIENIA *C. elegans*

Regulacja położenia i orientacji wrzecion mitotycznych w zarodku nicienia wymagają obecności heterotrimerycznych białek G w korteksie [62]. Natomiast niereceptorowy charakter tego procesu oznacza, że aktywacja podjednostek białka $G\alpha\beta\gamma$ nie wymaga obecności liganda i receptora. Ten system związany jest z białkami polarnymi, regulacją położenia wrzecion mitotycznych w bruzdkującym zarodku nicienia i może być testowany doświadczalnie w badaniach siły motorycznej [60,61] w trakcie mitoz mutantów. W tym celu wiązką lasera wypalano przednie lub tylne włókna astralne w czasie anafazy komórki, generując zahamowanie lub przesuwanie ku tyłowi bruzdy pomiędzy blastomerami AB i P [60,61].

Heterotrimeryczne białko G *C. elegans* występuje początkowo w centrosomach zarodka. Zbudowane jest z dwóch podjednostek $G\alpha_i$ i jednej podjednostki $G\beta\gamma$. Z zastosowaniem RNAi wykazano, że przesunięcie wrzeciona mitotycznego do tyłu w anafazie pierwszego podziału zygoty nicienia wymaga obecności przynajmniej jednego z dwóch specyficznych białek, a mianowicie białka GOA-1 lub GPA-16 w podjednostkach typu $G\alpha_i$ (i oznacza, że dane białko $G\alpha$ hamuje aktywność cykazy adenylanowej). W nieobecności obu genów w genomie nicienia kodujących białka GOA-1 i GPA16 dochodzi wyłącznie do symetrycznego podziału na blastomery AB i P identycznych rozmiarów i obumarcia zarodków.

Wyniki badań heterotrimerycznego białka G w bruzdkującym zarodku nicienia wykazały, że pomiędzy dwie



Rycina 6. Schemat niereceptorowej ścieżki sygnalizacyjnej białek G w regulacji sił motorycznych wpływających na położenie bruzdy w asymetrycznych podziałach komórki w bruzdkującym nicieniu (wg [4] zmodyfikowano). Kompleks heterotrimerycznego białka G w stanie spoczynku z podjednostką GOA-1 jest aktywowany przez cytoplazmatyczne białko Ric-8 GEF. Następnie oddziaływanie z domeną GPR1/2 GoLoco prowadzą do dysocjacji kompleksu $G\beta\gamma$. W anafazie, białko Lin 5 oddziałuje z aktywowanymi przez Ric-8 GEF podjednostkami $G\alpha$. Podjednostki te aktywowane w obecności peptydu RGS-7 (AGS3) generują siłę motoryczną we włóknach mikrotubularnych zakotwiczonech w korteksie bieguna tylnego. Wynikiem tego jest przesunięcie wrzeciona mitotycznego ku biegunowi tylnemu komórki (strzałka), aktywacja hydrolizy GTP przez białko $G\alpha$ i powrót do stanu spoczynku kompleksu heterotrimerycznego białka G.

podjednostki Gai i podjednostki Gβγ, podczas ich dysocjacji, wchodzi domena GoLoco białek regulacyjnych GPR1 lub GPR2 (ang. *G protein regulators*) [63]. Początkowo kompleks białek GOA-1 i GPA16 oraz białek GRP1/2 i Gβγ jest zlokalizowany w strukturach biegunów wrzeciona (w centrosomach); w metafazie kompleksy te przemieszczają się do korteksu. Warunkiem translokacji kompleksu GOA-1 i GPA16 oraz białek GRP1/2 i Gβγ do korteksu jest aktywacja podjednostki GOA-1 przez zlokalizowany w cytoplazmie czynnik Rho Ric-8 GEF [64]. Wykazano bowiem, że mutanty Ric-8 GEF dzielą się symetrycznie, bez przesuwania bruzdy podziałowej w bruzdkującym nicieniu [64]. Ponadto stwierdzono [65], że Ric-8 GEF działa tylko na podjednostkę GOA-1, ale tylko wtedy gdy występuje w kompleksie z GDP i białkami GPR1/2. Nieaktywne Gai GOA-1 oddziałuje z GPR1/2, a w tym stanie podjednostka Gβγ nie kontaktuje się z tym kompleksem. A zatem wstępna dysocjacja podjednostki Gβγ z kompleksu GOA-1 i GPA16 (w wyniku działania białek GRP1/2) jest warunkiem aktywacji Ric-8 GEF. Do aktywacji procesu niezbędne jest związanie GPR1/2 z białkiem LIN-5 (odpowiadającym białku NuMA w innych organizmach) w korteksie. Kompleks białek Gai-GPR1/2-Lin 5 [65] pojawia się w metafazie, zarówno we wrzecionie, jak i w korteksie.

Funkcje i budowa zlokalizowanego w korteksie kompleksu Gai-GPR1/2-Lin 5 [65] zależą od zlokalizowanych w korteksie polarnych białek PAR. W korteksie tylnego bieguna komórki pojawia się większa ilość białek GPR1/2, niż w biegunie przednim zarodka. Asymetria w rozmieszczeniu białek GPR1/2 powoduje, że w anafazie mikrotubularne włókna astralne generują na biegunie tylnym silniejsze siły ciągnące wrzeciono niż te włókna, które są zakotwiczone na biegunie przednim [63,66]. Podsumowując, aktywacja białek G i ich translokacja do korteksu ma wpływ na asymetryczne ciągnięcie do tyłu wrzeciona, a następnie na asymetryczne tworzenie bruzdy podziałowej w pierwszym podziale bruzdkowania [4,63,66]. Jednakże procesy regulujące ten proces to nie tylko przejaw funkcji specyficznych białek regulatorowych GPR1 i GPR2, które wykazują wysokie powinowactwo do podjednostek Gai i są niezbędne do aktywacji czynnika Ric-8 GEF. Aktywacja mechanizmu generującego siły mechanicznego przesuwania wrzeciona w anafazie jest spowodowana obecnością innego regulatora tego procesu, a mianowicie białka z domeną RGS. Białko RGS jest aktywatorem reakcji hydrolizy GTP przez białko G (a więc spełnia funkcje białka GAP) i działa po aktywacji Ric-8 GEF i translokacji białek w anafazie w trakcie cytokinezy [4]. Wszystkie białka typu RGS (w tym białko RGS-7 nicienia) zawierają domenę RH (ang. *Ras-homology domain*), która wiąże działanie białek RGS z cyklem aktywacji GTPaz Ras w komórce [4,67]. Białko RGS-7 nicienia (w niektórych publikacjach określane jako białko AGS3, ang. *activator of G signaling*) spełnia funkcję białka GAP w niereceptorowym cyklu aktywacji białek G. Potwierdzeniem roli RGS-7 jest fakt, że delekcja genu z domeną RGS-7 i nieobecność tego białka w komórce powoduje przesuwanie do przodu wrzeciona w anafazie pierwszego podziału bruzdkowania, co jest spowodowane obniżoną siłą ciągnięcia wrzeciona ku tyłowi komórki [67]. W oparciu o wyniki opisanych badań, stworzono [4] model niereceptorowej sygnalizacji białek G

w regulacji sił motorycznych regulujących położenie bruzdy w asymetrycznych podziałach komórek nicienia (Ryc. 6).

ZNACZENIE BADAŃ NAD MECHANIZMEM BRUZZKOWANIA NICIENIA

W obrębie różnych typów komórek *Eukaryota* istnieją wspólne mechanizmy duplikacji DNA i procesów mitotycznych [1,21,44]. Rodzi się pytanie, czy mechanizmy receptorowych i nie receptorowych podziałów różnicujących zwierząt są wspólne dla innych typów komórek *Eukaryota* (np. brunatnic i orzęsków)? Ostatnio wykazano, że homologi białek PAR i Ric 8 GEF występują w nabłonkach ssaków i w neuroblastach *Drosophila*. W dzielących się neuroblastach *Drosophila* zachodzi mitozą asymetryczną, a tylna komórka w drugim podziale mitotycznym zmienia oś wrzeciona; dochodzi także do rotacji wrzeciona mitotycznego podobnej do tej obserwowanej w trakcie bruzdkowania *C. elegans* [68]. Różnicujące mitozy wyznaczają także przebieg neurogenezy w trakcie rozwoju mózgu ssaków [69]. Co więcej, to prawidłowe pozycjonowanie wrzeciona symetrycznego regulowane przez białko Lis1 jest czynnikiem kluczowym w rozwoju neuroepitelium ssaków; niedorozwój neuroepitelium towarzyszy lissencefalii, genetycznie uwarunkowanemu schorzeniu charakteryzującemu się nieprawidłowym rozwojem mózgu [70]. Zatem badania nad mitozą symetryczną i asymetryczną u nicienia *C. elegans*, w komórkach drożdży i zwierząt otwierają nowe perspektywy dotyczące biologii rozwoju i stają się centrum zainteresowania wielu ośrodków badawczych na świecie.

PIŚMIENNICTWO

1. Wang H, Oliferenko S, Balasubramanian MK (2003) Cytokinesis: relative alignment of the cell division apparatus and the mitotic spindle. *Curr Opin Cell Biol* 15: 82-87
2. Tillement V, Remy M-H, Raynaud-Messina B, Mazzolini L, Haren L, Merdes A (2009) Spindle assembly defects leading to the formation of a monopolar mitotic apparatus. *Biol Cell* 101: 1-11
3. Toyoshima F, Nishida E (2007) Spindle orientation in animal cell mitosis, roles of integrin in the control of spindle axis. *J Cell Physiol* 213: 407-411
4. Siderovski DP, Willard FS (2005) The GAPs, GEFs and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int J Biol Sci* 1: 51-56
5. Grzelakowska-Sztabert B (2002) Proteoliza białek regulujących przebieg cyklu komórkowego - udział ubikwitynacji. *Postępy Biochem* 48: 34-47
6. Grzelakowska-Sztabert B (2002) Punkty kontrolne cyklu komórkowego, czy znamy ich molekularne podłoże? *Postępy Biol Kom* 29: 157-175
7. Szumiel I (2002) Punkty kontrolne w cyklu komórkowym. *Postępy Biol Kom* 29 (suppl 19): 3-4
8. Kaczanowska J, Piwońska D, Kaczanowski A (2006) Rola polo-kinazy w regulacji cyklu komórkowego-mechanizm translokacji i tworzenia kompleksów białkowych przez polokinazy. *Postępy Biochem* 52: 24-34
9. Fabczak H (2001) Rodzina białek Rho a cytoskielet. *Kosmos* 50: 283-293
10. Glotzer M (2005) The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307: 1735-1739
11. Nowak JM, Grzanka A, Żuryń A, Stępień A (2008) Rodzina białek Rho i ich rola w cytoskiecie komórki. *Postępy Hig Med Dośw* 62: 110-117

12. Olson MF, Ashworth A, Hall A (1995) An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell progression through G1. *Science* 269: 1270-1272
13. McCullar JS, Larsen SA, Ryan A, Milimaki RA, Filtz TM (2003) Calmodulin is a phospholipase C- β interacting protein. *J Biol Chem* 278: 33708-33713
14. DerMardirossian C, Bokoch GM (2005) GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* 15: 356-363
15. Kunda P, Baum B (2009) The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning. *Trends Cell Biol* 19: 174-179
16. Pines J, Rieder CL (2001) Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nature Cell Biol* 3: E3-E6
17. Bornens M (2002) Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 14: 25-34.
18. Pan J, Snell W (2007) The primary cilium: keeper of the key to cell division. *Cell* 129: 1255-1257
19. Korzeniewski N, Zheng L, Cuevas R, Parry J, Chatterjee, Anderton B, Duensing A, Muenger K, Duensing S (2009) Cullin 1 functions as a centrosomal suppressor of centriole multiplication by regulating Polo-like kinase 4 protein levels. *Cancer Res* 69: 6668-6675
20. Kallio MJ, Beardmore VA, Weinstein J, Gorbsky GJ (2002) Rapid microtubule-independent dynamics of Cdc20 at kinetochores and centrosomes in mammalian cells. *J Cell Biol* 158: 841-847
21. McCarthy EK, Goldstein B (2006) Asymmetric spindle positioning. *Curr Opin Cell Biol* 18: 79-85
22. Cho H, Kehrl JH (2007) Localization of $G_{i\alpha}$ proteins in the centrosomes and at the midbody: implication for their role in cell division. *J Cell Biol* 178: 245-255
23. Gehmlich K, Haren L, Merdes A (2004) Cyclin B degradation leads to NuMA release from dynein/dynactin and from spindle poles. *EMBO Rep* 5: 97-103
24. Gergely F, Basto R (2008) Multiple centrosomes: together they stand but divided they fall. *Genes Dev* 22: 2291-2296
25. Goshima G, Mayer M, Zhang N, Stuurman N, Vale RD (2008) Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *J Cell Biol* 181: 421-429
26. Uehara R, Nozawa R-S, Tomioka A, Petry S, Vale RD, Obuse C, Goshima G (2009) The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 6998-7003
27. Bastiaens P, Caudron M, Niethammer P, Karsenti E (2006) Gradients in the self organization of the mitotic spindle. *Trends Cell Biol* 16: 125-134
28. Cassimeris L, Skibbens RV (2003) Regulated assembly of the mitotic spindle: a perspective from two ends. *Curr Issues Mol Biol* 5: 99-112
29. Brust-Mascher I, Sommi P, Cheerambathur DK, Scholey JM (2009) Kinesin-5- dependent poleward flux and spindle length control in *Drosophila* embryo mitosis. *Mol Biol Cell* 20: 1749-1762
30. Eckert F, Eyers PA, Lewellyn AL, Prigent C, Maller JL (2008) Spindle pole regulation by a discrete Eg5-interacting domain in TPX2. *Curr Biol* 18: 519-525
31. Kapoor TM, Lampson MA, Hergert P, Cameron L, Cimini D, Salmon ED, McEwen BF, Khodjakov A (2006) Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. *Science* 311: 388-391
32. De Piccoli G, Torres-Rosell J, Aragon L (2009) The unnamed complex: what we know about Smc5-Smc6? *Chromosome Res* 17: 251-263
33. Yasuda S, Oceguera-Yanez F, Kato T, Okamoto M, Yonemura S, Tera-da Y, Ishizaki T, Narumiya S (2004) Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores. *Nature* 428: 767-771
34. Zhao WM, Seki A, Fang G (2006) Cep55, a microtubule-bundling protein, associates with central spindle to control the midbody integrity and cell abscission during cytokinesis. *Mol Biol Cell* 17: 3881-3896
35. Ban R, Irino Y, Fukami K, Tanaka H (2004) Human mitotic spindle-associated protein PRC1 inhibits MgcRacGAP activity toward Cdc42 during the metaphase. *J Biol Chem* 279: 16394-16402
36. Lindon C (2008) Control of mitotic exit and cytokinesis by the APC/C. *Biochem Soc Trans* 36: 405-410
37. Jiang K, Wang J, Liu J, Ward T, Woderman L, Davidson A, Wang F, Yao X (2009) TIP 150 interacts with and targets MCAK at the microtubule +ends. *EMBO Rep* 10: 857-865
38. Werner M, Glotzer M (2008) Control of cortical contractility during cytokinesis. *Biochem Soc Trans* 36: 371-377
39. Joo E, Tsang CW, Trimble WS (2005) Septins: traffic control at the cytokinesis intersection. *Traffic* 6: 626-634
40. Yoshida S, Bartolini S, Pellman D (2009) Mechanisms for concentrating Rho1 during cytokinesis. *Genes Dev* 23: 810-823
41. Minoshima Y, Kawashima T, Hirose K, Tonozuka Y, Kawajiri A, Bao YC, Deng X, Tatsuka M, Narumiya S, May WS, Nosaka T, Semba K, Inoue T, Satoh T, Inagaki M, Kitamura T (2003) Phosphorylation by Aurora B converts MgcRacGAP to RhoGAP during cytokinesis. *Dev Cell* 4: 549-560
42. Bielak-Zmijewska A, Kolano A, Szczepanska K, Maleszewski M, Bor-suk E (2008) Cdc42 protein acts upstream of IQGAP1 and regulates cytokinesis in mouse oocytes and embryos. *Dev Biol* 322: 21-32
43. Simon GC, Schonteich E, Wu CC, Piekny A, Ekiert D, Yu X, Gould GW, Glotzer M, Prekeris R (2008) Sequential Cyk-4 binding to Ect2 and FIP3 regulates cleavage furrow ingression and abscission during cytokinesis. *EMBO J* 27: 1791-1803
44. Barr FA, Grunenberg U (2007) Cytokinesis: Placing and making the final cut. *Cell* 131: 847-858
45. Cao LG, Wang YL (1996) Signals from the spindle midzone are required for the stimulation of cytokinesis in cultured epithelial cells. *Mol Biol Cell* 7: 225-232
46. Hiramoto Y (1956) Cell division without mitotic apparatus in sea urchin eggs. *Exp Cell Res* 11: 630-636
47. Rapaport P (1961) Experiments concerning the cleavage stimulus in sand dollar eggs. *J Exp Zool* 148: 81-89
48. Rapaport R (1985) Repeated furrow formation from a single mitotic apparatus in cylindrical sand dollar eggs. *J Exp Zool* 234: 167-171
49. von Dassow G (2009) Concurrent cues for cytokinetic furrow induction in animal cells. *Trends Cell Biol* 19: 165-173
50. Piekny A, Werner M, Glotzer M. (2005) Cytokinesis:welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol* 15: 651-655
51. Ambrose JC, Cyr R (2008) Mitotic spindle organization by the prepro-phase band. *Mol Plant* 1: 950-960
52. Thery M, Racine V, Pepin A, Piel M, Chen Y, Sibarita JB, Bornens M (2005) The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol* 7: 947-953
53. Mitsushima M, Toyoshima F, Nishida E (2009) Dual role of Cdc42 in spindle orientation control of adherent cells. *Mol Cell Biol* 29: 2816-2827
54. Lee Y-N, Malbon CC, Wang H-Y (2004) G α 13 signals via p115RhoGEF cascades regulating JNK1 and primitive endoderm formation. *J Biol Chem* 279: 54896-54904
55. Dubash AD, Wennerberg K, Garcia-Mata R, Menold MM, Arthur WT, Burridge K (2007) A novel role for Lsc/p115 RhoGEF and LARG in regulating RhoA activity downstream of adhesion to fibronectin. *J Cell Sci* 120: 3989-3998
56. Munro E, Nance J, Priess JR (2004) Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early *C.elegans* embryo. *Dev Cell* 7: 413-424
57. Cowan CR, Hyman AA (2007) Acto-myosin reorganization and PAR polarity in *C. elegans*. *Development* 134: 1035-1043

58. Kimura A, Onami S (2007) Local cortical pulling force repression switches centrosomal centration and posterior displacement in *C. elegans*. *J Cell Biol* 179: 1347-1354
59. Wu JC, Rose LS (2007) PAR-3 and PAR-1 inhibit LET99 localization to generate a cortical band important for spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Mol Biol Cell* 18: 4470-4482
60. Grill SW, Howard J, Schaeffer E, Stelzer EHK, Hyman AA (2003) The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science* 301: 518-521
61. Kozlowski C, Srayko M, Nedelec F (2007) Cortical microtubules contacts position the spindle in *C. elegans* embryos. *Cell* 129: 499-510
62. Bellaiche Y, Gotta M (2005) Heterotrimeric G proteins and regulation of size asymmetry during cell division. *Curr Opin Cell Biol* 17: 658-663
63. Willard FS, Kimple RJ, Siderovski DP (2004) Return of the GDI: the GoLoco motif in cell division. *Annu Rev Biochem* 73: 925-951
64. Miller KG, Rand JB (2000) A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (Goalpha) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 156: 1649-1660
65. Afshar K, Willard FS, Colombo K, Siderovski DP, Gonczy P (2005) Cortical localization of the G α protein GPA-16 requires RIC-8 function during *C. elegans* asymmetric cell division. *Development* 132: 4449-4459
66. Srinivasan DG, Fisk RM, Xu H, van der Heuvel S (2003) A complex of LIN-5 and GPR proteins regulates G protein signaling and spindle function in *C. elegans*. *Genes Dev* 17: 1225-1239
67. Hess HA, Roper J-C, Grill SW, Koelle MR (2004) RGS-7 completes a receptor-independent heterotrimeric G protein cycle to asymmetricaly regulate mitotic spindle positioning in *C. elegans*. *Cell* 119: 209-221
68. Betschinger J, Knoblich JA (2004) Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C.elegans*, and *Vertebrates*. *Curr Biol* 14: R674-R685
69. Kosodo Y, Huttner WB (2009) Basal process and cell divisions of neural progenitors in the developing brain. *Develop Growth Differ* 51: 251-261
70. Schwamborn JC, Knoblich JA (2008) Lis1 and spindle orientation in neuroepithelial cells. *Cell Stem Cell* 2: 193-194

Dynamics of symmetric and asymmetric mitosis and cytokinesis

Janina Kaczanowska[✉], Andrzej Kaczanowski

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

[✉]e-mail: kaczan@biol.uw.edu.pl

ABSTRACT

During cell division the bipolar microtubular mitotic spindle ensures faithful segregation of daughter chromosomes and appearance of the cytokinetic membrane in an equatorial area separating genetically identical daughter cells. This process proceeds in consecutive morphological stages of prophase, metaphase, anaphase and cytokinesis. The progress in embryology and oncology concerns the new data about intervening mechanisms of rotation of a bipolar spindle in prophase and the change of the position of a mitotic spindle in anaphase that result in an asymmetric and differential mitoses. The aim of this review is a discussion of some of molecular and signaling mechanisms which regulate position of mitotic spindles in different types of cells. It turns out that the knowledge of receptor-dependent and receptor-independent molecular mechanisms controlling geometry and localization of cytokinesis in some human cells and in early stages of development of *C. elegans* opens the new important research fields.

STRESZCZENIE

Prawidłowa segregacja chromosomów w mitozie i mejozie wymaga obecności kompleksu kohezyjnego chromatyd siostrzanych. Kompleks ten był początkowo zidentyfikowany u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i na tym organizmie wykonano większość badań dotyczących jego budowy i funkcjonowania. W dalszej kolejności elementy kompleksu zidentyfikowano u innych *Eukaryota* i stwierdzono, że są one zachowane w trakcie ewolucji i niezbędne do życia. Rdzeń kompleksu składa się z czterech podjednostek (kohezyn): Smc1, Smc3, Scc1/Mcd1 i Irr1/Scs3. Poza białkami tworzącymi rdzeń, do kohezji chromatyd niezbędne są elementy biorące udział w przyłączaniu kohezyn do chromatyny oraz uczestniczące w ustanowieniu i regulacji kohezji. Istnieje kilka modeli budowy i funkcjonowania kompleksu. Najstarszy i najpopularniejszy model pierścieniowy – stopniowo zastępowany jest przez tzw. model kajdanek. Regulacja kohezji jest słabo poznana, zaś najważniejszymi białkami w niej uczestniczącymi są Eco1, Irr1 – STAG2, Pds5 oraz Wap1/Rad61. Kohezja w mejozie przebiega nieco inaczej niż w mitozie i wymaga udziału specyficznych białek Rec8 i Sgo1. Poza udziałem w kohezji chromatyd kohezyny uczestniczą w naprawie DNA, morfogenezie chromosomów i regulacji ekspresji genów.

Agata Cena[✉]

Anna Kurlandzka[✉]

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

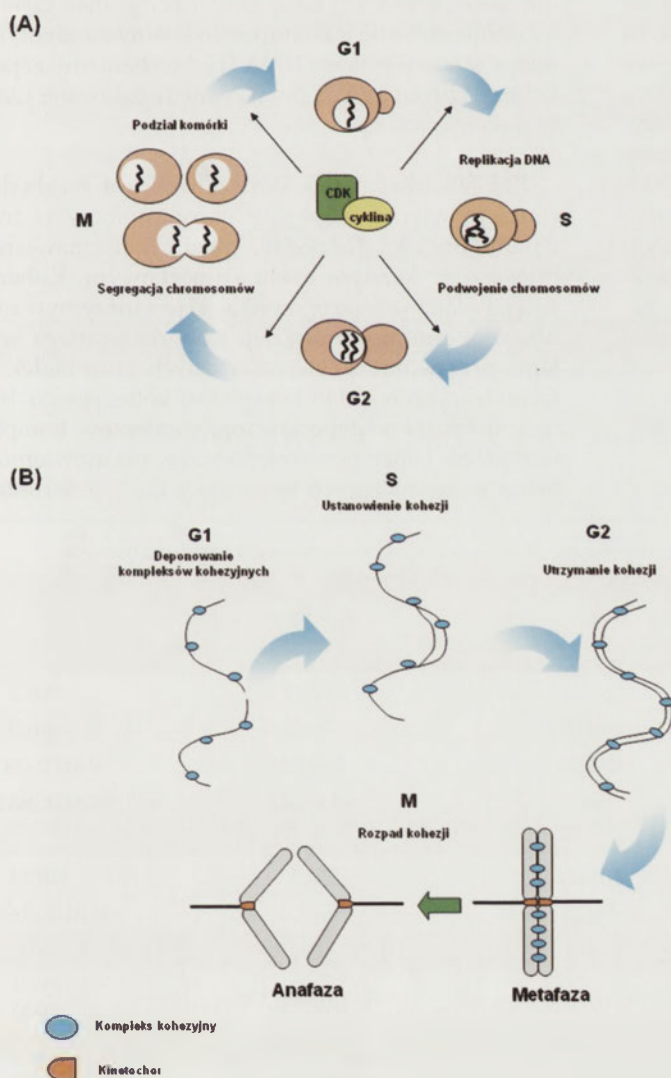
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa; tel.: (22) 592 13 18, e-mail AC: student@ibb.waw.pl, e-mail AK: ania218@ibb.waw.pl

Artykuł otrzymano 27 lipca 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 14 września 2009 r.

Słowa kluczowe: segregacja chromosomów, mitoz, mejoza, kohezyny

Wykaz skrótów: DSB (ang. *Double-Strand Breaks*) – pęknięcia podwójnej nici DNA; SAC (ang. *Spindle Assembly Complex*) – punkt kontrolny wrzeciona podziałowego; SMC (ang. *Structural Maintenance of Chromosome*) – grupa białek regulujących strukturalną i funkcjonalną organizację chromosomów; PCNA – antygen jądrowy komórek proliferujących; APC/C (ang. *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) – kompleks wyzwalający wejście z metafazy w anafazę; ORC (ang. *Origin Recognition Complex*), – kompleks odpowiedzialny za identyfikowanie miejsc startu replikacji DNA; ORF (ang. *Open Reading Frame*) – otwarta ramka odczytu, sekwencja DNA kodująca białko; CAR (ang. *Cohesion Associated Regions*) – obszary chromatynowe związane z kohezynami. Stosowano przyjęty dla danego organizmu zapis genów lub białek. Na przykład: drożdże *SCC1* – gen kodujący białko dzikiego typu, *Scc1p* – białko dzikiego typu, *scc1-1* – forma zmutowana genu *SCC1*; *STAG1* – forma zapisu nazwy białka w komórkach ssaczych, *STAG1* – gen kodujący białko



Rycina 1. (A) Schemat przebiegu cyklu komórkowego na przykładzie drożdży *S. cerevisiae*. Poszczególne etapy cyklu są ściśle regulowane przez kompleksy kinazy zależnej od cyklin (CDK, ang. *cyclin-dependent kinase*) z właściwymi cyklinami. Wewnątrz różowych komórek kolorem białym oznaczono jądro z chromosomami (szare). (B) Pojawianie się i rozpad kohezji chromatyd siostrzanych skoordynowane są z przebiegiem cyklu.

WPROWADZENIE

Cykl komórkowy jest sekwencją zdarzeń, których efektem jest wzrost komórki i jej podział na dwie komórki potomne. Zasadniczym celem każdego podziału komórkowego jest przekazanie komórkom potomnym identycznej kopii informacji genetycznej. U *Eukaryota* cykl komórkowy jest podzielony na cztery etapy: fazę G1, w której następują ważne decyzje dla dalszego przebiegu cyklu. Cykl może być zatrzymany w przypadku warunków niesprzyjających dla dalszego wzrostu albo pojawienia się inhibitorów lub też w fazie tej następuje synteza białek (lub aktywacja białek już obecnych w komórce) potrzebnych do replikacji DNA. W fazie S najważniejszym elementem jest replikacja DNA, zaś w fazie G2 następuje przygotowanie komórki do podziału w fazie M, czyli mitozy, podczas której następuje segregacja chromosomów zakończona cytokinezą. Na rycinie 1A pokazano przebieg cyklu komórkowego na przykładzie *Saccharomyces cerevisiae*, zaś na rycinie 1B jak pojawiają się kohezji skoordynowane jest z przebiegiem cyklu.

Prawidłowy przebieg cyklu komórkowego zapewniają punkty kontrolne. Pojęcie punktu kontrolnego obejmuje zarówno elementy strukturalne – białka odpowiedzialne za jego funkcjonowanie, jak i przekaz informacji o stanie komórki. Nośniki tej informacji nie są znane. Punkty kontrolne rejestrują nieprawidłowości i w miarę potrzeby zatrzymują cykl komórkowy, co pozwala na naprawę uszkodzeń. Prawidłowo działające punkty kontrolne gwarantują przekazanie potomnej komórce w pełni zreplikowanego i nieuszkodzonego materiału genetycznego. Najważniejszym punktem kontrolnym segregacji chromosomów jest punkt kontrolny wrzeciona podziałowego (SAC, ang. *Spindle Assembly Complex*). Poniżej omówiono zagadnienia związane z mitotyczną i mejotyczną segregacją chromosomów.

MITOZA

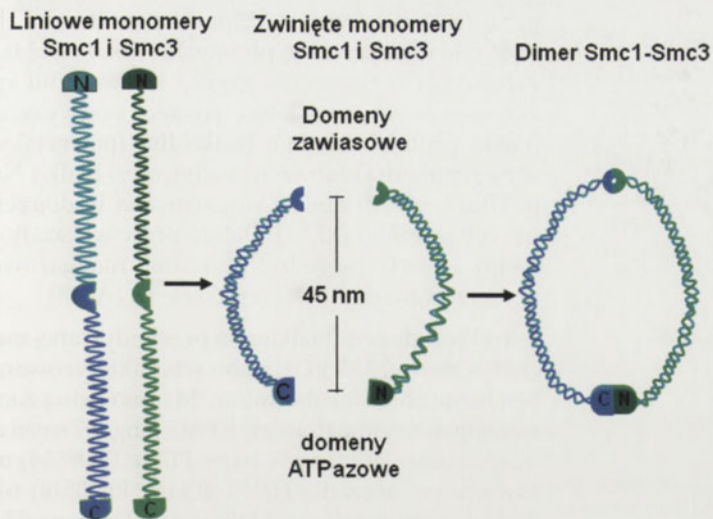
Mitoza jest złożonym procesem zachodzącym w komórkach eukariotycznych. W wyniku tego procesu dochodzi do rozdzielenia zestawu zreplikowanych chromosomów do dwóch jąder potomnych, identycznych pod względem zestawu chromosomów. Po mitozie zazwyczaj dochodzi do szybkiej cytokinezy. Mitoza i cytokineza stanowią fazę M cyklu komórkowego. Mitoza może przebiegać całkowicie wewnątrz jądra, bez rozpadu otoczki jądrowej, tak jak ma to miejsce u drożdży *S. cerevisiae*, otoczka może być częściowo zachowana, jak u *Aspergillus nidulans*, lub dochodzi do całkowitego rozpadu otoczki w fazie G2/M cyklu komórkowego, tak jak ma to miejsce u większości *Eukaryota*. Mitozę można podzielić na cztery główne etapy: profazę, metafazę, anafazę i telofazę. Mitoza poprzedzona jest replikacją genomu, w wyniku czego każdy chromosom posiada dwie identyczne cząsteczki dwuniciowego DNA, które wraz z towarzyszącymi im białkami tworzą siostrzane chromatydy. Fizyczne połączenie chromatyd, zwane kohezją, zapewnione jest głównie przez kompleks kohezyjny chromatyd siostrzanych i uzupełniane poprzez katenację DNA oraz kompleks ORC (ang. *Origin Recognition Complex*), znany dotąd głównie jako odpowiedzialny za identyfikowanie miejsc startu replikacji DNA [1]. Mechanizmy zapewniające kohezję chromatyd są precyzyjnie regulowane i zachowane w trakcie ewolucji.

Kohezja chromatyd siostrzanych jest niezbędnym warunkiem wiernej segregacji chromosomów w trakcie podziału komórki, dlatego też musi być ustanawiana i utrzymywana w każdym cyklu komórkowym. Kohezja ta jest ustanawiana w trakcie replikacji i jest utrzymywana na całej długości chromosomu [2,3]. Kohezja wymaga współdziałania przynajmniej czterech różnych grup białek: kohezyjnych wchodzących w skład kompleksu kohezyjnego, białek biorących udział w deponowaniu elementów kompleksu kohezyjnego, białek uczestniczących w ustanowieniu kohezji i białek uczestniczących w regulacji kohezji. Struktura więk-

Tabela 1. Podjednostki mitotycznego kompleksu kohezyjnego oraz ważniejsze białka regulatorowe występujące w wyszczególnionych organizmach.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Homo sapiens</i>
1. BIAŁKA STRUKTURALNE KOMPLEKSU (KOHEZYJNY)				
Smc1	Psm1	SMC1	SMC1	SMC1
Smc3	Psm3	SMC3	SMC3	SMC3
Sccl/Mcd1/Rad21	Rad21	RAD21	RAD21	RAD21/SCC1
Irr1/ Sccl	Psc3	SA	SA1, SA2	SA1/STAG1, SA2/ STAG2
2. BIAŁKA UCZESTNICZĄCE W DEPONOWANIU KOHEZYJNY NA CHROMATYDACH				
Sccl	Mis4	NIPBL	SCC2	NIPBL
Sccl	Ssl3	nie zidentyfikowano	xSCC4	MAU2 /hSCC4
3. BIAŁKA POŚREDNICZĄCE W USTANOWIENIU KOHEZYJ				
Eco1	Eso1	San, Deco	XECO1, XECO2	EFO1 EFO2
4. BIAŁKA POŚREDNICZĄCE W REGULACJI KOHEZYJ				
Pds5	Pds5	PDS5	PDS5A PDS5B	PDS5A PDS5B
Rad61*	Wpl1*	WAPL	nie zidentyfikowano	WAPL

*homologia na podstawie podobieństwa sekwencji, scharakteryzowana niewystarczająco lub funkcje nie są całkowicie zbieżne.



Rycina 2. Schemat budowy białek z rodziny SMC. Zwinięty monomer ma domenę ATPazową oraz domenę zawiasową, połączone długą przeciwnie zwiniętą domeną coiled-coil. Domena „head” składa się z N- i C-końcowego fragmentu białka. Dimer Smc1p-Smc3p powstaje przez asocjację domen zawiasowych oraz zależne od ATP oddziaływanie domen „head” obu białek.

szości z tych białek została zachowana w trakcie ewolucji, a nazwy odpowiednich homologów u różnych organizmów podano w Tabeli 1. Oprócz białek uczestniczących w kohezji chromatyd siostrzanych wymienionych w tej tabeli można wyróżnić kilka innych, które są niezbędne w prawidłowym procesie segregacji chromosomów. Ważniejsze z nich: Sgo1p, Cdc20p i Pds1p będą omówione w dalszej części artykułu.

KOMPLEKS KOHEZYJNY CHROMATYD SIOSTRZANYCH

Główną funkcją kompleksu kohezijnego jest udział w segregacji chromosomów, jednakże w trakcie kilkunastu lat badań nad tym zagadnieniem dowiedziono, że kompleks ten pełni również funkcje w regulacji transkrypcji, bierze udział w naprawie DNA i morfogenezie chromosomów. Kompleks kohezijny składa się z co najmniej czterech podjednostek, zwanych kohezynami. Nomenklatura tych białek nie jest do końca ustalona (Tabela 1), ponieważ jednak pierwotnie ich funkcje były opisane w *S. cerevisiae*, więc przeważnie do tej nomenklatury nawiązuje nazewnictwo u innych organizmów. Jednakże również w przypadku *S. cerevisiae* niekiedy spotykamy się z kilkoma różnymi nazwami tych samych białek.

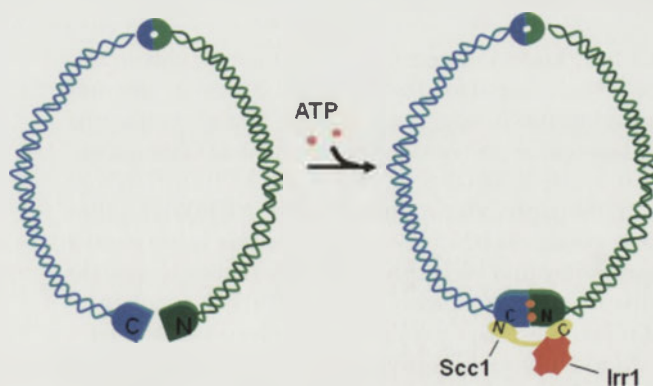
Wiele informacji zawartych w niniejszym artykule pochodzi z badań przeprowadzonych na drożdżach *S. cerevisiae*. W organizmie tym podjednostki kompleksu to białka Smc1 i Smc3, Scc1/Mcd1/Rad21 oraz Irr1/Scs3. Wszystkie te podjednostki są niezbędne dla życia, zaś mutacje w genach je kodujących powodują śmierć komórki lub wiele poważnych nieprawidłowości, w tym zaburzoną segregację chromosomów. Wszystkie kohezyny drożdży zlokalizowane są w jądrze komórkowym i wiążą się z chromatyną począwszy od późnej fazy G1 do metafazy [3]. Z kolei kohezyny ssaków potrzebne w danym cyklu komórkowym wiążą się z chromaty-

na już w telofazie cyklu poprzedniego. Większość kohezyn ssaków oddysocjowuje od chromatyny w profazie [4,5].

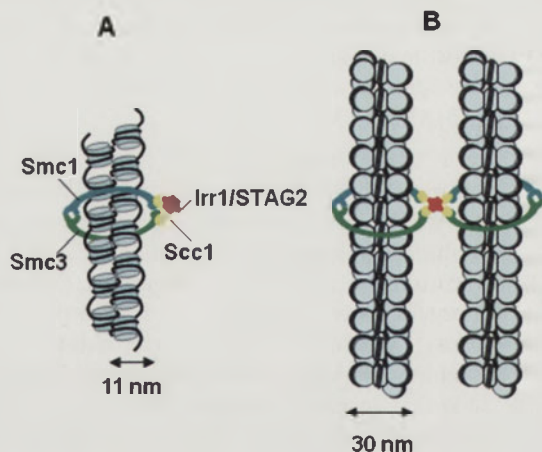
BIAŁKA SMC1 I SMC3

Rdzeń kompleksu kohezijnego stanowi dimer Smc1-Smc3. Obie te podjednostki należą do rodziny SMC (ang. *Structural Maintenance of Chromosome*), stanowiącej ważną grupę białek regulujących strukturalną i funkcjonalną organizację chromosomów zarówno w *Prokaryota*, jak i *Eukaryota* [6,7]. Białka należące do rodziny SMC charakteryzują się szczególną strukturą. Mają globularne domeny N- i C-końcowe, część centralną zaś stanowią dwa odcinki o strukturze helisy α , które rozdziela globularna domena „zawiasowa”. Domena zawiasowa, zginając cząsteczkę białka, zbliża do siebie dwie helisy α , w wyniku czego powstaje przeciwstawnie zwinięta domena podwójnej helisy (ang. *coiled-coil*). Zgięcie cząsteczki umożliwia zbliżenie dwóch końcowych domen globularnych, które tworzą domenę typu głowy (ang. *head*) (Ryc. 2). Głowa wykazuje podobieństwo do domen ATPazowych transporterów ABC (wchodzą w skład kanałów wewnątrz błonowych) oraz białka Rad50, biorącego udział w naprawie DNA [2]. Domena głowy ma trzy ściśle zachowane w ewolucji motywy: Walker A i Walker B znajdujące się odpowiednio w N- i C-końcowej części białka oraz motyw sygnałowy (motyw C) – niezbędny do hydrolizy ATP [8]. Zwinięte cząsteczki białek SMC tworzą strukturę, w której część zawiasowa występuje w odległości około 45 nm od domeny głowy.

Białka Smc1 i Smc3 oddziałują najprawdopodobniej poprzez hydrofobowe oddziaływania domen zawiasowych, w wyniku czego powstaje dimer o strukturze podobnej do litery V [9,10]. Oddziaływanie dwóch domen głowy dimeru Smc1p-Smc3p zamyka pierścień, zbliżając dwie połowki domen ATPazowych, w wyniku czego powstaje funkcjonalna ATPaza. Asocjacja dwóch domen głowy zależy od wiązania ATP, które zachodzi pomiędzy motywami Walker A i B jednej z domen ATPazowych a sekwencją sygnałową drugiej [6].



Rycina 3. Schemat kompleksu kohezijnego nieuwzględniający obecności chromatyny. Przyłączenie dwóch cząsteczek ATP zbliża dwie globularne domeny ATPazowe Smc1p i Smc3p (oznaczone kolorem niebieskim i zielonym), kleizyna Scc1p (kolor złoty) zamyka pierścień, wiążąc się C-końcem z Smc1p i N-końcem z Smc3p. Wiązanie C-końcowej domeny kleizyny z Smc1p jest zależne od ATP. Kolorem czerwonym oznaczono podjednostkę Irr1p.



Rycina 4. Schemat wybranych modeli kompleksu kohezyjnego. A - popularny model pierścienia otaczającego dwie siostrzane chromatydy w postaci włókien o średnicy około 11 nm. B - model dwupierscieniowy („kajdanki”) postulowany dla ssaków wg. Zhang i wsp. [26]. Zgodnie z tym modelem w obrębie jednego pierścienia kohezyjnego zawarte jest jedno włókno chromatynowe o średnicy ok. 30 nm. Połączenie obu pierścieni zachodzi w wyniku oddziaływania klejzyn SCC1 obu pierścieni z białkiem STAG2 (odpowiednik Irr1).

KLEIZYNA SCC1/MCD1

Białko Scc1, najczęściej badany element kompleksu kohezyjnego, jest niezbędne do utrzymania kohezji, począwszy od fazy S aż do anafazy [3]. Białko to należy do rodziny zachowanych w ewolucji klejzyn. Ich nazwa pochodzi z języka greckiego i oznacza zamknięcie. Kleizyna Scc1 łączy dwie domeny typu głowy dimeru Smc1p/Smc3p, w wyniku czego powstaje trójkatno - pierścieniowa struktura białkowa. Części N- i C-końcowe Scc1p wiążą się odpowiednio z domenami głowy białek Smc1 i Smc3. Wiązanie C-końcowej części Scc1p z domeną głowy białka Smc1 jest zależne od ATP (Ryc. 3) [10]. Poziom białka Scc1 ściśle zależy od fazy cyklu komórkowego: ekspresja genu *SCC1* rozpoczyna się we wczesnej fazie S i jest kontynuowana poprzez mitozę aż do fazy G1 [3]. Wiązanie innych białek kompleksu kohezyjnego zachodzi tylko w obecności białka Scc1, które szybko asocjuje z pozostałymi elementami [10]. Białko Scc1 ma dwa miejsca cięcia dla specyficznej proteazy, separazy Esp1p. Przecięcie Scc1p przez Esp1p następuje w anafazie mitozy i jest niezbędne do rozejścia się siostrzanych chromatyd [6].

KOHEZYNA IRR1

Białko Irr1, kodowane przez gen o numerze chromosomowym w genomie drożdży YIL026C, zwanym otwartą ramką odczytu (ORF, ang. *Open Reading Frame*), występuje często w literaturze pod nazwą Scc3. Ponieważ ta druga nazwa jest u *S. cerevisiae* także symbolem cyklofiliny (izomery cis-trans peptydyloprolinowej, ORF YCR069W), dlatego też w niniejszej pracy stosowana będzie tylko nazwa Irr1, zaproponowana wcześniej niż Scc3. Białko to zostało zidentyfikowane jako element kompleksu kohezyjnego w 1999 roku [11] i jest najsłabiej poznanym jego składnikiem. Należy do rodziny zachowanych w ewolucji stromalin, zaś homologi podano w Tabeli 1. Irr1p oddziałuje bezpośrednio z C-końcowym fragmentem Scc1p (Ryc. 3) [10]. Poza uczestnictwem w kohezji siostrzanych chromatyd, białko Irr1 prawdopodobnie ma też inne funkcje. O jego wielofunkcyjności świadczyły już pierwsze badania. Charakte-

ryzowany wówczas szczep o obniżonej ekspresji genu *IRR1* nie tworzył kolonii na podłożu stałym choć rósł w pożywkach płynnych, wykazywał także zaburzenia w tworzeniu zygot i kiełkowaniu spor. Zaburzenia te częściowo znosiło podwyższenie dawki genu kodującego białko Its2 (potencjalnego osmoregulatora) lub genu kodującego białko Nog2 (GTPaza, potencjalnie zaangażowana w dojrzewanie rybosomów) [12,13]. Dalsze prace wskazały ponadto, że Irr1p może być pośrednio zaangażowane w dojrzewanie mRNA i replikację DNA [13].

Irr1 jest dużym białkiem o przewidywanej masie cząsteczkowej 133 kDa, słabo scharakteryzowanym biochemicznie i strukturalnie. Ma ono jedną zachowaną ewolucyjnie domenę STAG (ang. *STromal AntiGen*, numer domeny w bazie Pfam: PF08514) oraz zawiera powtórzenia HEAT (Pfam: PF00514) o nie do końca sprecyzowanej lokalizacji. Domena STAG prawdopodobnie obejmuje obszar pomiędzy K211 i G350 w sekwencji aminokwasowej Irr1p. Domena HEAT (skrót od ang. nazwy białek, w których po raz pierwszy zidentyfikowano tę domenę: *Huntingtin*, *Elongation factor*, *A protein phosphatase*, *TOR lipid kinase*) występuje w wielu białkach. Składa się ona z około 37-47 reszt aminokwasowych, które tworzą od trzech do 36 powtórzeń, formując pałeczkowate struktury, powstałe z dwóch przeciwnych helis i dwóch zagięć ułożonych wzdłuż wspólnej osi. Powtórzenia HEAT występują w licznych białkach, głównie cytoplazmatycznych, ale również w niektórych białkach chromosomowych. Uważa się, że ułatwiają one oddziaływanie białko - białko [14]. Do grupy białek z powtórzeniami HEAT należy też białko Scc2, opisane dokładniej poniżej. Struktury wyższego rzędu Irr1p nie są znane, brak jest danych krystalograficznych lub uzyskanych za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego.

Białko Irr1 ma dwa odpowiedniki w komórkach dzielących się mitotycznie u ludzi: STAG1 oraz STAG2. Wiedza na temat funkcjonowania kompleksu kohezyjnego człowieka jest dość ograniczona, a o podjednostkach STAG1 i STAG2 wiadomo szczególnie mało. Dotychczas zgromadzone skąpe dane sugerują, że białka te w interfazie są obecne wyłącznie na terenie jądra komórkowego, a kompleksy kohezyjne mogą zawierać tylko jedno z nich. Nie wiadomo co decyduje o obecności danego typu białka STAG w kompleksie, nie wiadomo także czy skład danego kompleksu jest stały czy też się zmienia. Wprawdzie cDNA kodujący białka STAG1 i STAG2 człowieka sklonowano i scharakteryzowano już w roku 1997, nie znano jednak wówczas funkcji produktów tych genów [15]. Trzy lata później Sumara i wsp. [4] wyizolowali dwa kompleksy kohezyjne 14S i 12.5S z komórek somatycznych człowieka. Kompleksy te zawierają odpowiednio podjednostkę STAG1 lub STAT2 i wydaje się, że białka STAG1 i STAG2 nie współwystępują w jednej komórce [4,16]. Zauważono, że u człowieka jest trzykrotnie więcej kompleksów zawierających STAG2 niż tych zawierających STAG1, lecz nie są znane powody tych różnic [17]. Przypuszcza się, że skład kompleksu może się zmieniać w zależności od stadium różnicowania tkanek lub fazy cyklu komórkowego, lecz nie są znane mechanizmy tych zmian.

Ostatnio wykazano, że białko Irr1 ma znaczący udział w regulacji kohezji w komórkach drożdży [18,19]. Wykazano, że kohezyna ta, oprócz oddziaływania z Scc1p, tworzy także kompleks z regulatorami kohezji - białkami Pds5 i Wap1 (Rad61). Sugeruje to, że Irr1p nie tylko jest elementem strukturalnym kompleksu kohezyjnego, ale bierze też udział w regulacji kohezji.

MODELE KOMPLEKSU KOHEZYJNEGO

Badania biochemiczne oraz obserwacje za pośrednictwem mikroskopii elektronowej wskazują, że kohezyny mogą tworzyć strukturę przypominającą pierścień. Najczęściej cytowany w literaturze model zakłada, że kompleksy kohezyjne w formie pojedynczych pierścieni otaczają dwie chromatydy powstałe w wyniku zreplikowania cząsteczki DNA (Ryc. 4A) [10,20,21]. Jednopierścieniowy model dominuje w literaturze głównie ze względu na to, że w prosty sposób wyjaśnia zarówno mechanizm ustanowienia kohezji, jak i jej rozpad. Według tego modelu kohezja chromatyd siostrzanych ustanawiana jest pasywnie w trakcie replikacji DNA. Przechodząc przez pierścień, widełki replikacyjne miałyby zapewniać kohezję chromatyd siostrzanych. Kohezja taka u *S. cerevisiae* byłaby utrzymywana aż do momentu przecięcia kleizyny Scc1 przez separazę na początku anafazy, co powoduje rozpad kompleksu [6]. Wiele wczesnych doświadczeń, zwłaszcza z użyciem drożdży, potwierdza ten model. Jednak coraz częściej w literaturze pojawiają się obserwacje, które model jednopierścieniowy podają w wątpliwość. Najwięcej zastrzeżeń wobec modelu jednopierścieniowego dotyczy ograniczonej przestrzeni wewnątrz pierścienia, która miałyby pomieścić dwie chromatydy. Zastrzeżenia budzi też statyczna konfiguracja kompleksu, która nie jest wystarczająco elastyczna w takich procesach, jak replikacja, transkrypcja i naprawa DNA.

Maksymalna średnica kompleksu kohezyjnego, jeśli przyjąłby on kształt pierścienia, jest szacowana na 38–50 nm. Podstawową jednostkę strukturalną chromatyny stanowi nukleosom o średnicy 11–13 nm. Uważa się, że u wyższych *Eukaryota* strukturą wyższego rzędu jest włókno chromatynowe o średnicy ok. 30 nm, a w późnej profazie i metafazie stopień kondensacji chromatyny, a co za tym idzie – grubość włókna – są znacznie większe [22,23]. Dlatego też można przypuszczać, że pojedynczy kompleks kohezyjny mógłby pomieścić co najwyżej dwie cząsteczki DNA wraz z histonami o stopniu zwinięcia odpowiadającym włóknu 11–13 nm, ale jego średnica nie jest wystarczająca, aby pomieścić dwa 30 nanometrowe włókna chromatynowe. Struktury chromatynowe wyższego rzędu u drożdży są słabo poznane. Wiadomo, że łącznikowy DNA pomiędzy nukleosomami jest znacznie krótszy (o około 30–40 pz) niż u wyższych *Eukaryota* i ma długość średnio około 15 pz, brak jest typowego histonu łącznikowego H1 oraz obserwuje się niewielki stopień kondensacji. Niemniej jednak włókno chromatynowe *S. cerevisiae* jest zdolne do tworzenia *in vitro* struktur przypominających włókno 30 nm wyższych *Eukaryota* [24]. Dlatego też można przypuszczać, że model jednopierścieniowy jest nie do końca poprawny również w odniesieniu do drożdży. Statyczny model zakłada ponadto ustanowienie kohezji w trakcie replikacji. Nie tłumaczy

jednak, jak w takim pierścieniu, oprócz cząsteczki DNA, miałby się pomieścić cały replisom, na który składa się szereg białek, m.in. polimerazy α , β , ϵ , δ , helikaza, PCNA oraz białka związane z regulacją topologii DNA.

Statyczny jednopierścieniowy model kompleksu omawia krytycznie w pracy przeglądowej Guacci [25] i proponuje alternatywny, dynamiczny model jedno- lub dwupierścieniowy. Uwzględnia on to, że po zdeponowaniu kohezyn na DNA kohezja jest ustanawiana wieloetapowo, zaś oddysocjowanie kompleksów od DNA nie jest niezbędne do rozpadu kohezji. Ponadto uwzględnia też fakt, że u kręgowców kompleksy kohezyjne są usuwane w profazie bez proteolitycznej degradacji Scc1, a także że możliwy jest rozpad kohezji w anafazie, bez konieczności proteolitycznej degradacji Scc1.

Model dwupierścieniowy (Ryc. 4B), proponowany jako jedna z alternatyw, porównywany jest do „kajdanek”, w których każdy heterodimer Smc1/Smc3 otacza pojedynczą chromatydę, a kohezja jest ustanawiana dzięki połączeniu obu heterodimerów kleizynami Scc1 przez białko Irr1, przy czym położenie Irr1p nie jest jasno określone. Ostatnio Zhang i wsp. [26] dostarczyli kolejnych dowodów wspierających ten model. Na podstawie zakrojonych na dużą skalę badań przeprowadzonych w komórkach ludzi wskazali na centralną rolę w tym modelu białek STAG - homologów podjednostki drożdżowej Irr1p. Zgodnie z ich propozycją kompleks składa się z dwóch jednopierścieniowych podkompleksów, z których każdy otacza pojedynczą chromatydę (Ryc. 4B). Połączenie obu pierścieni, a tym samym kohezję chromatyd, zapewnia kohezyna STAG1-2/Irr1, która antyrównolegle łączy kleizyny Scc1 z obu kompleksów. Niektóre badania w drożdżach wspierają ten model [27]. Także Chang i wsp. [28] dowodzą, że w rejonach wyciszonej transkrypcji kohezja jest utrzymana przez kompleks, na który składają się dwa pierścienie kohezyjne, z których każdy otacza pojedynczą cząsteczkę DNA. Co więcej, Yeh i wsp. [29] uważają, że w rejonie pericentromerowym występuje specjalna forma kohezji. Polega ona na tworzeniu pętli w obrębie pojedynczych chromatyd, a nie jak dotychczas opisywano - kohezji pomiędzy chromatydami siostrzanymi. W tworzeniu pętli uczestniczy prawdopodobnie kompleks CBF3 (ang. *Core centromere-DNA Binding Factor*), który zgina centromer o ok. 60°. Pętle w obrębie jednej cząsteczki DNA są spięte przez dwupierścieniowe kompleksy kohezyjne. Zagadnienie to szerzej opisano w dalszej części artykułu.

PRZYŁĄCZANIE DO CHROMATYNY I ROZMIESZCZENIE KOMPLEKSÓW KOHEZYJNYCH

Przyłączanie kohezyn do chromatyny jest regulowane zarówno przebiegiem cyklu komórkowego, jak też poprzez specyfikę miejsca przyłączenia. U drożdży *S. cerevisiae* kohezyny wiążą się z DNA w fazie G1/S, G2 i w trakcie mitozy [3], a u kręgowców - w późnej telofazie [30]. U większości organizmów deponowanie kohezyn na DNA wymaga uprzedniej obecności na chromatynie kompleksu dwóch białek: Scc2 i Scc4 oraz aktywności domen ATPazowych kompleksu Smc1p/Smc3p. Kompleksy kohezyjne nie są rozmieszczane na chromatynie ani równomiernie, ani w

sposób przypadkowy. Na centromerach i w rejonach pericentromerowych są one rozmieszczone znacznie gęściej niż w miejscach CAR (ang. *Cohesion Associated Regions*) w obrębie ramion chromosomu i w obszarach transkrypcyjnie nieaktywnej chromatyny [31, 32].

Rola białek Scc2 i Scc4 w deponowaniu kohezyn jest zachowana ewolucyjnie, ale ich mechanizm działania nie jest do końca poznany. Przypuszcza się, że tworzą one dwuskładnikowy kompleks, który pełni funkcję aktywatora ATPaz heterodimeru Smc1/Smc3 lub ułatwia dimeryzację domen zawiasowych. Inna interpretacja funkcji kompleksu Scc2/Scc4 zakłada, że pierwotnie lokuje się on na chromatynie, przyłączając do niej najpierw Smc1p w fazie G1, a następnie - w fazie S - kleizynę Scc1, której obecność na DNA rozpoczyna finalne składanie kompleksu [13].

REGION PERICENTROMEROWY

W regionie pericentromerowym liczba kompleksów kohezynowych związanych z DNA jest znacznie większa niż w pozostałych obszarach chromosomowych. U drożdży *S. cerevisiae* jest to region o wielkości 20-50 kpz otaczający niewielki (125 pz) centromer [33,34]. Region ten jest szczególnie istotny dla chromosomów ze względu na bezpośrednie działanie w nim rozciągających sił wrzeciona podziałowego. Na centromerze zlokalizowany jest kinetochor, duża struktura białkowa zawierająca elementy strukturalne punktu kontrolnego mitozy, a także stanowiąca miejsce przyłączenia mikrotubul wrzeciona. Centromery siostrzanych chromatyd muszą oprzeć się siłom rozciągającym wrzeciona aż do końca metafazy. Kohezyny zarówno utrzymują spójność/kohezję w regionie centromerowym i pericentromerowym, jak też uczestniczą w biorientacji siostrzanych kinetochorów względem biegunów wrzeciona

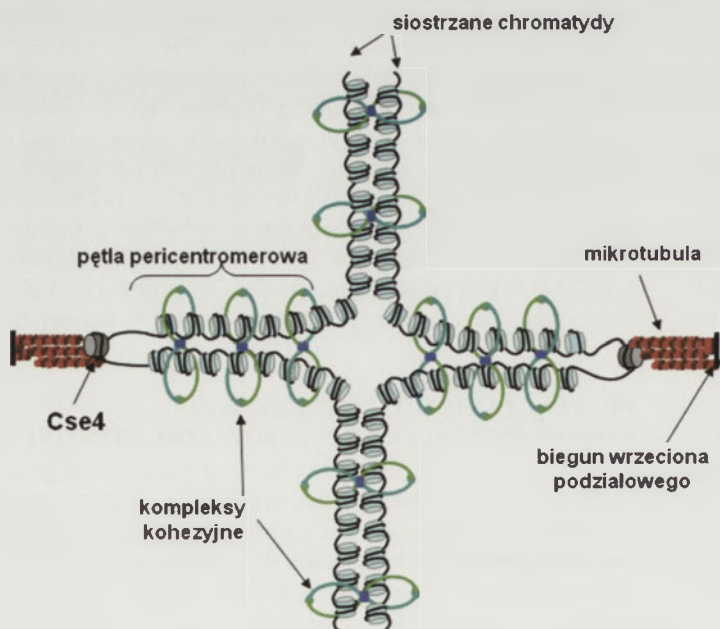
[35]. Wzbogacenie kohezyn w tym regionie zależy od białek kinetochorowych Mif2 i Cse4 (ortologi CENP-C, CENP-A ssaków) [13]. Pomimo tak dużego zagęszczenia kohezyn, centromery w metafazie mogą chwilowo oddzielić się na odległość ok. 700 nm. Zjawisko to nazwano „oddychaniem chromosomów” lub „paradoksem kohezji”, ponieważ region o największej koncentracji kohezyn jest również regionem, w którym dochodzi do największej chwilowej separacji chromatyd [33,36]. Próbuąc wyjaśnić to zjawisko, Yeh i wsp. [29] zaproponowali model, według którego w rejonie pericentromerowym każda z siostrzanych chromatyd tworzy pętlę na długości ok. 25 kpz oskrzydłującą sekwencję centromerową (Ryc. 5). Jak już wspomniano, koniec pętli stanowi centromer, którego kinetochor przyłącza się do końca plus mikrotubuli. Autorzy uważają, że pętle te (wraz z kompleksami kohezynowymi) mogą zapewnić mechaniczne połączenie o dużej elastyczności pomiędzy rozdzielonymi kinetochorami siostrzanych chromatyd powodujący efekt pozornego rozdzielenia chromatyd. Nie tłumaczą jednak, w jaki sposób mogłoby dojść do tej nietypowej dodatkowej, stabilnej lokalizacji kompleksów na wewnętrznej pętli pochodzącej z pojedynczej chromatyd.

REGIONY CAR

CAR to miejsca lokalizacji kohezyn na ramionach chromosomów. Obejmują one obszary o długości około 800 pz, oddalone od siebie o około 10-15 kpz [32]. Miejsca CAR nie mają szczególnej sekwencji nukleotydowej, ale charakteryzują się dużą zawartością zasad A i T. Ponad 80% regionów CAR leży w obszarach międzygenowych w miejscach zbieżnej transkrypcji, tzn. w obszarach między końcami 3' sąsiednich genów. Zarówno obserwacje mikroskopowe, jak i doświadczenia z wykorzystaniem immunoprecypitacji chromatyny wskazują, że kompleksy kohezynowe znajdują się w innych miejscach chromosomu niż kompleksy je deponujące [13,48]. Możliwe więc, że po zdeponowaniu kompleksy kohezynowe lub kompleksy Scc2-Scc4 są przesuwane w inne regiony DNA. Zasugerowano, że prawdopodobnie to polimeraza RNA przesuwa kompleksy kohezynowe po ich zdeponowaniu na DNA - w miejsca zbieżnej transkrypcji [13,48].

OBZARY WYCISZONEJ TRANSKRYPCJI

Przyłączanie kohezyn do chromatyny ma miejsce również na obszarach wyciszonych transkrypcyjnie [32]. W DNA *S. cerevisiae* miejsca te stanowią nieczynne kasyety związane z określeniem typu koniugacyjnego: *HML* i *HMR* i powtórzenia subtelomero-we. Kohezja w regionie kasyety *HMR* zależy zarówno od kompleksów kohezynowych, jak i od kompleksu Sir2p/4p (ang. *silent information regulator*) wyciszającego transkrypcję. Białko Sir2 jest niezbędną do życia deacetylazą histonową o szerokim spektrum działania. Jest konieczne do wyciszenia zarówno obu kaset, jak i wyciszenia transkrypcji w regionie subtelomero-wym oraz w regionie powtórzeń rDNA. Wraz z białkami Sir3 i Sir4, białko Sir2 oddziałuje m. in. z histonami H3 i H4 [37], powodując ich deacetylację i lokalne zmiany struktury chroma-



Rycina 5. Model kohezji chromatyny pericentromerowej w metafazie mitozy *S. cerevisiae*. Każda z siostrzanych chromatyd tworzy pętlę rozciągającą się po obu stronach centromeru na długość około 11,5 kpz. Pętle są spięte kompleksami kohezynowymi tworzącymi wewnętrzne mostki. DNA centromerowe o długości 125 pz nawinięte jest na białko Cse4 (kolor szary) przypominające histon H3. Kolorem bładniebieskim oznaczono histonowe rdzenie nukleosomów, czarnym-DNA. Wg. Yeh i wsp. [29]

ty. Prawdopodobnie poprzez to oddziaływanie dochodzi również do oddziaływań z kompleksem kohezyjnym. Również u *S. pombe* oraz u wyższych *Eukaryota* deponowanie kohezyn w specjalnych regionach jest wynikiem modyfikacji histonów (metylacja, acetylacja) i zmian w strukturze chromatyny [28,38,39]. Ostatnie prace dotyczące regionów wyciszonej transkrypcji wskazały, że do ustanowienia kohezji w tych regionach wymagana jest obecność genu kodującego tRNA oraz białek związanych z polimerazą RNA III [40].

REJONY PĘKNIĘĆ PODWÓJNEJ NICI DNA (DSB)

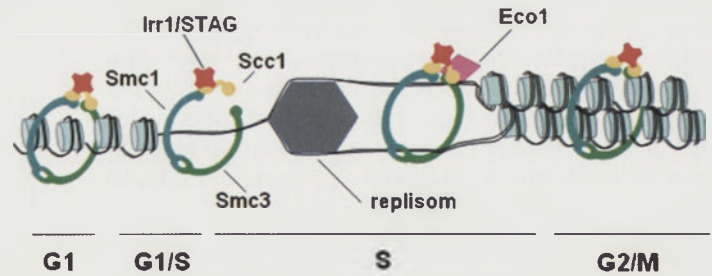
W wyniku uszkodzenia DNA, prowadzącego do powstania pęknięć w obu niciach, dochodzi do dodatkowego nagromadzenia kompleksów kohezyjnych. Udział kohezyn w naprawie DNA opisany jest w dalszej części artykułu. W niniejszym podrozdziale chcemy jednak nadmienić, że w przypadku takiego uszkodzenia - w fazie G2/M cyklu komórkowego dochodzi do ustanowienia dodatkowej kohezji. Kompleksy kohezyjne lokują się w obszarze ok. 50-100 kpz otaczającym pęknięcie DNA oraz pojawiają się w całym genomie, niezależnie od regionów CAR. Proces ten wymaga fosforylacji histonu H2AX oraz wspomnianego wyżej kompleksu deponującego Scc2p/Scc4p [41,42].

USTANOWIENIE KOHEZJI

Zdeponowanie kompleksów kohezyjnych na chromatynie nie wystarcza do zajęcia kohezji chromatyd siostrzanych. Ustanowienie kohezji jest bowiem zjawiskiem złożonym, nie do końca poznanym, zachodzącym tylko raz w trakcie cyklu komórkowego - podczas replikacji DNA [6,43]. Drugim, szczególnym przypadkiem ustanowienia kohezji w fazie G2/M, jest, wspomniana powyżej, odpowiedź komórki na pojawienie się DSB.

Ustanowienie kohezji wymaga aktywności acetylotransferazy Eco1. Białko to (zwane też Ctf7) jest niezbędne do życia i zawiera motyw palca cynkowego C2H2 [13,44]. Substratami Eco1p *in vitro* są podjednostki kompleksu kohezyjnego Scc1p i Irr1p oraz regulator kohezji Pds5p, natomiast *in vivo* Eco1p acetyluje preferencyjnie dwie reszty K112 i K113 w domenie ATPazowej podjednostki Smc3p. Zamiana obu reszt lizyn (K) na reszty argininy w Smc3 nie zmienia zdolności kohezyny do wiązania się z chromatyną natomiast uniemożliwia ustanowienie kohezji, co w konsekwencji prowadzi do zaburzeń w segregacji chromosomów oraz do śmierci komórek. O niezbędności acetylacji Smc3 w procesie ustanowienia kohezji świadczy wynik doświadczenia, w którym wprowadzenie formy Smc3p naśladującej stan zacetylowania (reszty lizyn zmienione na reszty glutamin K112G i K113G) do komórek pozbawionych acetylotransferazy Eco1 przywróciło ich żywotność [45].

Powszechnie uważa się, że ustanowienie kohezji zachodzi w trakcie replikacji DNA. Udział niektórych białek związanych z replikacją DNA w kohezji chromatyd postuluje się odkąd zauważono, że ich

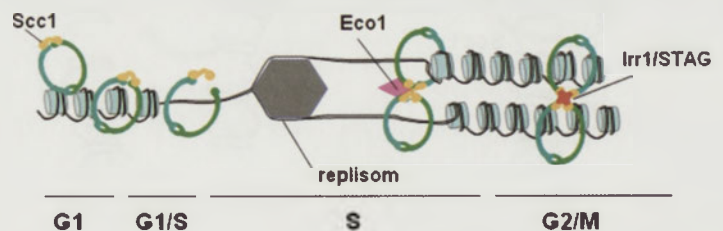


Rycina 6. Model ustanowienia kohezji w trakcie replikacji. Replisom (szary) przechodzi przez zdeponowany w G1 pierścień kohezyjny (Smc1p – morski, Smc3p – zielony, Scc1p – żółty, Irr1p – czerwony). Model ten nie precyzuje roli Eco1p w ustanowieniu kohezji.

brak lub mutacje w genach je kodujących powodują częściowe zaburzenia kohezji. Białkami tymi są: Ctf4 - prawdopodobnie odpowiedzialne za powiązanie kohezji z replikacją DNA, Ctf18 - zaangażowane w replikację, kohezję, jak też naprawę pęknięć dwuniciowych, Chl1 - helikaza DNA, Tof1 - biorące udział w funkcjonowaniu punktu kontrolnego replikacji, Csm3 - białko o podobnej funkcji, niezbędne też w mejozie, polimerazy DNA kappa, sigma i epsilon, Rfc4 - podjednostka kompleksu RFC (ang. *Replication Factor C*) oraz Orc5 - podjednostka kompleksu rozpoznającego ori [13, 30].

Wydaje się, że odmienną rolę pełni Eco1p, wiążące się bezpośrednio z kompleksem RFC i z PCNA (antygen jądrowy komórek proliferujących). W obszarze odpowiedzialnym za wiązanie z PCNA, występuje zachowana w ewolucji domena PIP (ang. *PCNA-Interacting Protein*). Punktowa mutacja w obrębie tej sekwencji prowadzi do śmierci komórki [46,47]. Zauważono, że w mutantach wykazujących defekty replikacji DNA proces kohezji jest zaburzony w stopniu nieznanym, a Eco1p nie znika z chromatyny. Wskazywałoby to, że niektóre czynniki zaangażowane w replikację DNA są w kohezji zbędne lub uczestniczą w niej jedynie pośrednio. Przypuszczenie to stało się tym silniejsze odkąd wiadomo, że Eco1p zaangażowane jest w powstawanie kohezji indukowanej pęknięciami dwuniciowymi DNA na obszarze całego genomu.

Zaproponowano dwa modele ustanowienia kohezji w trakcie replikacji. Modele te są ściśle związane z modelami kompleksów kohezyjnych. Pierwszy i historycznie najstarszy model jednopierścieniowego kompleksu kohezyjnego zakłada, że kompleks replikacyjny (replisom) przechodzi przez pojedynczy pierścień utworzony przez kohezynę otaczającą dwie siostrzane chromatydy (Ryc. 6). Model



Rycina 7. Alternatywny model ustanowienia kohezji w trakcie replikacji. Kompleksy kohezyjne są deponowane w fazie G1/S, a następnie przesuwane w miejsca CAR pasywnie lub przez otwarcie pierścienia pomiędzy Smc3p i Scc1p. Acetylacja Smc3p prawdopodobnie ułatwia zamknięcie pierścienia. Pierścienie otaczające obie chromatydy połączone są kohezyną Irr1-SA1/2. Kolory jak na Ryc. 6.

ten jest mało prawdopodobny ze względu na ograniczoną przestrzeń wewnątrz pierścienia kohezynowego, prawdopodobnie niewystarczającą do pomieszczenia replisomu. Jeżeli jednak uwzględnimy udział Eco1p w funkcjonowaniu pierścienia kohezynowego i założymy, że kompleks ten jest dynamiczny, to regulator kohezji Eco1p lub Pds5p mogłyby inicjować otwarcie pierścienia, który po przejściu widełek replikacyjnych natychmiast byłby zamykany [43].

Z kolei drugi model, zakładający budowę kompleksu typu „kajdanki”, uwzględnia od początku aktywności acetylazy Eco1p w ustanowieniu kohezji (Ryc. 7). Białko Eco1, prawdopodobnie wraz z białkiem Pds5, miałooby wpływ na zmianę konformacji kompleksów. Uważa się, że acetylacja/deacetylacja podjednostki Smc3p odsłania powierzchnie kontaktu pomiędzy podjednostkami kompleksów kohezynowych (szerzej opisane dalej), umożliwiając połączenia pomiędzy częścią pierścienia deponowanych w fazie G1 a pierścieniami deponowanymi w fazie S.

REGULACJA KOHEZJI

Raz ustanowiona kohezja pomiędzy chromatydami musi być utrzymana do rozpoczęcia anafazy. Za utrzymanie kohezji do tego momentu odpowiedzialne są co najmniej trzy białka: ssaczy homolog Irr1 – STAG2, Pds5 i Wap1/Rad61. Rola drożdżowego białka Irr1 w tym procesie nie jest ustalona, choć homolog Irr1 są trwale związane z pozostałymi elementami kompleksu kohezynowego. Wiązanie Pds5p jest mniej stabilne i mało poznane. Białko Wap1 u drożdży jest niezbędne do utrzymania kohezji, zaś jego odpowiednik Wap1 u zwierząt ułatwia dysocjację kohezyny z ramion chromatydów w profazie i prometafazie oraz zwiększa dynamikę oddziaływań tego kompleksu z chromatyną w interfazie [30].

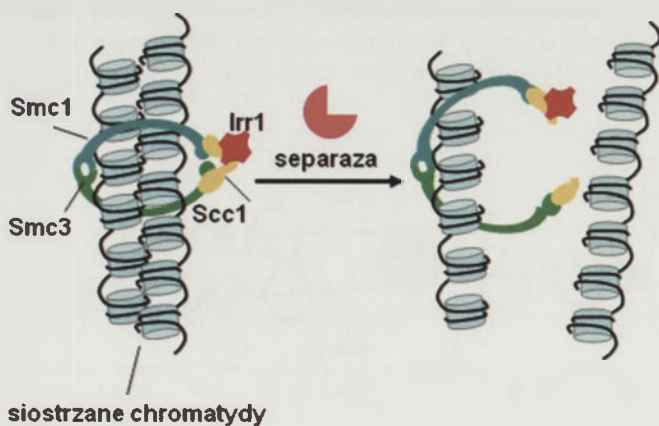
Białko Pds5, zachowane ewolucyjnie wśród *Eukaryota*, jest niezbędne do życia komórek [48]. Jest duże (m. cz. 147 kDa) i zawiera powtórzenia HEAT, podobnie jak Irr1p i Scc2p. Pds5p nie jest stałym elementem kompleksu kohezynowego, ale lokalizuje się na chromosomach, tak jak kohezyny. Wiadomo, że oddziałuje ono bezpośrednio z acetylazą Eco1p, białkiem Wap1 oraz z podjednostką kompleksu

kohezynowego Irr1p, co również sugeruje potencjalną funkcję tej podjednostki w regulacji kohezji [18].

W literaturze dotyczącej regulacji kohezji pojawił się niedawno termin „*antiestablishment activity*” na oznaczenie procesu, który zapobiega ustanowieniu kohezji w fazie S. W mechanizmie tym uczestniczą białka Pds5 i Wap1, które przypuszczalnie tworzą kompleks, wiążący się z kohezynami i uniemożliwiający ustanowienie kohezji poprzez stabilizację pierścienia kohezynowego. Zaproponowano zatem inny model ustanowienia i utrzymania kohezji siostrzanych chromatyd. Według tego modelu Eco1p, acetylując kohezynę Smc3p, chwilowo osłabia oddziaływanie kompleksu Wap1p-Pds5p z pierścieniem kohezynowym i ułatwia ustanowienie kohezji. Przypuszczalnie acetylacja Smc3p zmienia konfigurację kohezyn, osłabiając ich powinowactwo do Wap1-Pds5p. Miejsca acetylacji Smc3p znajdują się blisko domeny ATPazowej niezbędnej do wiązania z DNA [18,45,49].

SEGREGACJA SIOSTRZANYCH CHROMATYD

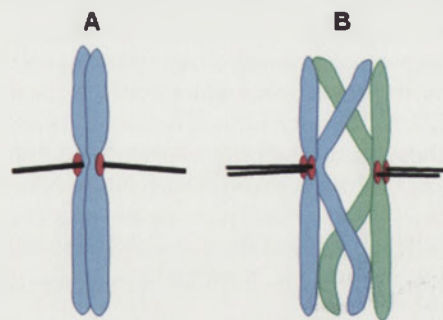
Prawidłowe przyłączenie mikrotubul wrzeciona podziałowego do kinetochorów zlokalizowanych w obszarach centromerowych chromosomów, osiągające kulminację w metafazie, inicjuje wyłączenie punkt kontrolnego wrzeciona podziałowego (SAC, ang. *Spindle Assembly Complex*) i aktywuje kompleks APC/C (ang. *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*). Kompleks APC/C, zwany inaczej kompleksem anafazowym lub cyklosomem, jest ligazą ubikwitynową składającą się z kilkunastu podjednostek. Aktywność cyklosomu jest niezbędna do segregacji chromosomów, wyjścia komórki z mitozy oraz w etapie przygotowującym komórkę do syntezy DNA [50]. Specyficzność substratowa APC/C w cyklu komórkowym regulowana jest przez dodatkowe elementy (kofaktory) Cdc20p i Cdh1p, przyłączane do podstawowego kompleksu. Białko Cdc20, wiążąc się z cyklosomem, ukierunkowuje jego specyficzność na cyklinę B i sekurynę Pds1. Przyłączenie tego kofaktora zachodzi w profazie i sprzyja mu dodatkowa regulacja - fosforylacja podjednostek cyklosomu. Kompleks APC/C-Cdc20 mimo to nie jest aktywny aż do momentu prawidłowego (dwubiegowego) ustawienia kinetochorów siostrzanych chromatyd względem wrzeciona. Do tego momentu punkt kontrolny wrzeciona podziałowego SAC utrzymuje cyklosom w stanie nieaktywnym. Jest to mechanizm, który opóźnia postęp cyklu komórkowego wtedy, gdy wrzeciono podziałowe nie zostało prawidłowo złożone, a kinetochory są nieprawidłowo przyłączone i źle zorientowane. SAC prawdopodobnie przekazuje na drodze dyfuzji sygnał, który hamuje kompleks APC/C-Cdc20. Elementami SAC jest wiele białek wewnętrznych kinetochoru, które wiążąc się z APC/C-Cdc20 hamują specyficznie jego aktywność wobec sekuryny i cyklina B [50]. W wyniku aktywacji APC/C następuje ubikwitynacja i degradacja wielu substratów tego kompleksu, m.in. Pds1p (sekuryny) oraz cyklina B (CibB). Wobec separazy Esp1p sekuryna pełni podwójną funkcję: jest jej białkiem opiekuńczym (ang. *chaperone*) i inhibitorem. Oba białka, Pds1 i Esp1, są zachowane w ewolucji wśród *Eukaryota*.



Rycina 8. Rozpad kompleksu kohezynowego podczas przejścia z metafazy do anafazy. W anafazie aktywna separaza przecina podjednostkę Scc1p (kolor żółty), w wyniku czego następuje rozpad kompleksu (utrata kohezji), a chromatydy, rozciągane przez mikrotubule (nieuwzględnione na rysunku), rozchodzą się do biegunów komórkowych.

Separaza Esp1p jest podobną do kaspaz proteazą cysteinową, której aktywność jest sygnałem do wyjścia komórki z mitozy [51,52]. W interfazie i wczesnej mitozie sekuryrna Pds1p wiąże się z separazą, uniemożliwiając jej rozpoznanie substratu - podjednostki Scc1p kompleksu kohezyjnego. Aktywność separazy reguluje również cyklinozależna kinaza Cdk1 (ClbB-Cdk1). Degradacja sekuryrny i cyklin B umożliwia aktywację separazy [50]. Aktywna separaza przecina kleizynę Scc1p w dwóch miejscach, co prowadzi do rozpadu kompleksu kohezyjnego, oddysocjowania kohezyn od chromosomów i rozdzielenia siostrzanych chromatyd (Ryc. 8). Proteolityczną degradację Scc1p ułatwia jej dodatkowa fosforylacja przez kinazę Cdc5. Powstałe po przecięciu fragmenty Scc1p są ubikwitynowane i degradowane od N-końca. W kolejnym cyklu komórkowym poziom kleizyny Scc1 wzrasta w fazie G1, prawdopodobnie w wyniku inaktywacji APC/C i akumulacji sekuryrny [3].

U wyższych *Eukaryota*, w przeciwieństwie do drożdży *S. cerevisiae*, utrata kohezji chromatyd siostrzanych jest dwustopniowa. Pierwszy etap zachodzi w profazie, a następny - w anafazie mitozy. Zanik kohezji w profazie dotyczy ramion chromosomów, jest niezależny od degradacji Scc1p i indukowany aktywnością kinaz Plk1 i Aurora B. Kinaza Plk1 destabilizuje kompleks kohezyjny w wyniku fosforylacji jednej z jego podjednostek – STAG2, homologa Irr1p [5,53]. Kinaza Aurora B prawdopodobnie reguluje inne czynniki biorące udział w tym procesie. Utrata kohezji w profazie, oprócz fosforylacji STAG2, wymaga obecności białka Wap1 [30]. Jak już wspomniano, białko Wap1 kontroluje dynamikę oddziaływań pomiędzy chromatyną i kohezynami. Możliwe, że fosforylacja STAG2 ułatwia wiązanie Wap1p, wspomagając oddysocjowanie kohezyn od chromatyny [17]. Utrata kohezji w rejonie peri- i centromerowym zachodzi dopiero w anafazie. Kohezja w okolicy centromeru jest niezbędna do biorientacji i prawidłowego przyczepu kinetochorów, dlatego musi być utrzymana w trakcie profazy. Ochronę kohezji w tym regionie zapewniają shugoshina (Sgo1) (opisana także poniżej) oraz fosfataza PP2A, która defosforyluje STAG2 [54,55]. Shugoshina ochraniająca fizycznie kohezję centromerową jest substratem APC/C i znika w anafazie, odsłaniając Scc1p. Kinaza Polo z kolei fosforyluje Scc1p, ułatwiając jego proteolityczną degradację przez separazę [30]. Utrata kohezji w anafazie zachodzi podobnie jak u drożdży, z tą różnicą, że u innych *Eukaryota* centromer jest znacznie większy niż u drożdży, dlatego kinetochory przyłączają większą liczbę mikrotubul.



Rycina 9. Sposób przyłączania kinetochorów do włókien mikrotubul w mitozie i mejozie. A - w mitozie oraz w mejozie II kinetochory (czerwone) są przyłączone do mikrotubul (czarne kreski) wychodzących z przeciwległych biegunów wrzeciona podziałowego (bipolarne). B - w pierwszym podziale mejotycznym kinetochory chromatyd siostrzanych są przyłączone do mikrotubul wychodzących z tego samego bieguna (monopolarne).

KOHEZJA W MEJOZIE

Mejoza jest wyspecjalizowanym podziałem komórkowym, w wyniku którego z komórki diploidalnej powstają cztery haploidalne o zredukowanej o połowę liczbie chromosomów. U *S. cerevisiae* mejoza prowadzi do powstania worka zawierającego cztery haploidalne spory. W trakcie mejozy, po replikacji DNA, zachodzą dwie rundy segregacji chromosomów (mejoza I i mejoza II), z których pierwsza jest podziałem redukcyjnym, a druga przypomina mitozę [56]. W trakcie mejozy I zachodzą trzy unikatowe zdarzenia: i) crossing-over pomiędzy sparowanymi chromosomami homologicznymi, w trakcie którego powstają chiazmy i zachodzi wymiana fragmentów DNA; ii) jednobiegunowe (monopolarne) przyłączenia obydwu siostrzanych kinetochorów chromosomów homologicznych do mikrotubul; iii) stopniowa utrata kohezji siostrzanych chromatyd. W trakcie anafazy I kompleksy kohezyjne oddalone od chiazm są usuwane z ramion chromosomów, podczas gdy kohezja ustanowiona w rejonie pericentromerowym musi być utrzymana aż do anafazy mejozy II.

Utarta kohezja ramion chromosomów umożliwia rozdzielenie całych chromosomów homologicznych. Segregacja siostrzanych chromatyd zachodzi dopiero podczas drugiego podziału mejotycznego wyniku proteolitycznej degradacji mejotycznego odpowiednika kleizyny Scc1 – białka Rec8. W wyniku zainicjowania mejozy dochodzi do wymiany kleizyny Scc1 na Rec8p. Nie jest to wymiana całkowita, bowiem na chromatynie pozostaje niewielka pula

Tabela 2. Białka tworzące kompleks kohezyjny w mejozie z uwzględnieniem nazewnictwa specyficznego dla różnych organizmów.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Homo sapiens</i>
Smc1	Psm1	SMC1	SMC1	SMC1β
Smc3	Psm3	SMC3	SMC3	SMC3
Scc1 Rec8*	Rad21 Rec8*	RAD21	RAD21 REC8	RAD21/SCC1
Irr1/ Scc3	Irr1 Rec11*	DSA1 DSA2*	SA1, SA2	SA1/STAG1 SA2/STAG2 SA3/STAG3*

*oznaczono podjednostki specyficzne dla mejozy.

Scclp. Kleizyna Rec8, podobnie jak Scclp, ma odpowiedniki u innych organizmów (Tabela 2) i uczestniczy w kohezji centromerów siostrzanych oraz - u roślin i *S. pombe* - w monopolarnym przyłączeniu kinetochorów chromatyd siostrzanych [32,57]. Oprócz funkcji w kohezji, Rec8p jest niezbędne w innych procesach niezależnych od kohezji, m.in. w tworzeniu chiazmy i w rekombinacji DNA. Niewielkie ilości mitotycznej kleizyny Scclp nie pełnią specyficznych dla mejozy funkcji, ich rola jest nieznana. Zwiększenie ekspresji genu *SCC1* w mejozie nie znosi efektów braku genu *REC8* [58].

Podczas mejozy kohezja siostrzanych chromatyd ustanowiona jest w premejozycznej fazie *S.* Utrata kohezji w trakcie mejozy zachodzi stopniowo, najpierw z ramion, a następnie z centromerów. Rejony pericentromerowe zachowują kohezję najdłużej. Białko Sgo1 (wspomniane już powyżej) odpowiedzialne za ochronę tej kohezji zidentyfikowano po raz pierwszy w drożdżach [60]. Shugoshina (po japońsku „strażnik duszy”) jest zachowana w ewolucji u *Eukaryota*. U *S. pombe* i wyższych organizmów występują dwa homologi: Sgo1p i Sgo2p. Jeden z nich jest obecny w mitozie, a drugi w mejozie. W komórkach pozbawionych Sgo1, w anafazie I Rec8p znika z ramion i z centromerów, co prowadzi do przedwczesnej separacji siostrzanych chromatyd i przypadkowej segregacji chromosomów w dalszych etapach mejozy [60].

Centromerowa lokalizacja Sgo1p zależy od zachowanej w ewolucji kinazy Bub1p, elementu punktu kontrolnego wrzeciona podziałowego [55]. Ostatnio dowiedziono, że zarówno u *S. pombe*, jak i w komórkach człowieka za rekrutację Sgo1p do regionu pericentromerowego odpowiedzialne jest białko heterochromatynowe Swi6 [61]. Sgo1p tworzy ponadto kompleks z ważną dla życia komórki fosfatazą PP2A. Inaktywacja tej fosfatazy daje takie same fenotypy jak mutacje w genie *SGO1* - powoduje zaburzenia w ochronie kohezji rejonów pericentromerowych i losową segregację chromosomów w mejozie II [55]. Z kolei efektywna degradacja Rec8p przez separazę wymaga obecności innej specyficznej kinazy - Plk1p. Fosforylacja przez tę kinazę ułatwia przecięcie Rec8. W rejonie centromerowym fosforylacji Rec8p zapobiega kompleks Sgo1-PP2A [62].

ORIENTACJA KINETOCHORÓW PODCZAS MEJOZY

W komórkach dzielących się mitotycznie bipolarna orientacja kinetochorów chromatyd siostrzanych (Ryc. 9A) zapewnia prawidłową segregację chromosomów, a właściwie pojedynczych chromatyd, do przeciwnych biegunów dzielącej się komórki. W trakcie mejozy w pierwszym podziale mejozycznym (redukcyjnym) segregacji poddane są całe chromosomy homologiczne. Napięcie pomiędzy homologami, przeciwstawiające się siłom wrzeciona, zapewnia kohezja w rejonie centromerowym chromatyd siostrzanych, obecność chiazmy pomiędzy homologami oraz monoorientacja kinetochorów chromatyd siostrzanych. Kinetochory siostrzanych chromatyd zmieniają swoją geometrię, zapewniając ich monopolarny przyczep do włókien wrzeciona podziałowego wychodzącego z jednego bieguna (Ryc. 9B).

Trójwymiarowa ultrastruktura mejozycznego wrzeciona podziałowego *S. cerevisiae* wskazuje, że para siostrzanych kinetochorów przyczepiona jest do jedynej mikrotubuli [63]. Przypuszcza się zatem, że monopolarny przyczep może wynikać z fuzji siostrzanych centromerów (kinetochory zachowują się jak pojedynczy) lub spowodowany jest inaktywacją jednego kinetochoru z pary. W przeciwieństwie do drożdży *S. cerevisiae*, u wyższych organizmów eukariotycznych w mejozie obydwa kinetochory siostrzane wiążą się z mikrotulami [64]. U *S. cerevisiae* monoorientacja kinetochorów chromatyd siostrzanych w mejozie I wymaga kompleksu monopolicy, na który składają się białka Mam1, Csm1 i Lrs4. Kompleks ten w metafazie I lokalizuje się na kinetochorze [58,65]. Mam1 jest białkiem specyficznym dla mejozy, podczas gdy Lrs4 i Csm1 są stale obecne w komórkach mitotycznych i mejozycznych. W komórkach wegetatywnych Lrs4 i Csm1 tworzą kompleks zlokalizowany na terenie jądra, a w komórkach podejmujących podział redukcyjny przesuwały się wraz z Mam1p na kinetochor tuż przed metafazą I. Brak którejkolwiek podjednostki kompleksu monopolicy powoduje biorientację kinetochorów chromatyd siostrzanych w mejozie I [58,65]. Krytycznym elementem w ustanowieniu monoorientacji jest rekrutacja zachowanej w ewolucji kinazy kazeinowej 1 (Hrr25) do centromerów [66]. Asocjacja podjednostek kompleksu monopolicy regulowana jest również przez kinazę Cdc5 oraz przez specyficzne dla mejozy białko Spo13, niezbędne do utrzymania kompleksu monopolarnego na kinetochorze w trakcie metafazy I [67].

Kompleks monopolarny prawdopodobnie nie był zachowany w trakcie ewolucji. Drożdże *S. pombe* mają podobne do Csm1 białko Pcs1, jednakże jest ono niezbędne tylko w trakcie mitozy i mejozy II [65]. Zarówno w *S. pombe*, jak i u *Arabidopsis thaliana*, w monoorientacji kinetochorów w mejozie I niezbędna jest mejozyczna kleizyna Rec8p lokalizująca się specyficznie na centromerze [57,68]. Ponadto, u *S. pombe* czynnikiem regulującym monopolarną orientację kinetochorów jest białko kinetochorowe Moa1. W profazie/ metafazie I znajduje się ono w centralnym rdzeniu centromeru i zanika w anafazie I [59].

INNE FUNKCJE KOHEZYN

Wiadomo od pewnego czasu, że do prawidłowej segregacji chromosomów niezbędna jest jedynie kohezja rejonów centromerowych. Kohezja w obrębie ramion nie jest konieczna i przypuszczalnie ma inne znaczenie biologiczne. Kohezyny, zależnie lub też niezależnie od ich funkcji kohezyjnych, mogą uczestniczyć w różnych procesach w komórce: naprawie DNA, morfogenezie chromosomów, regulacji ekspresji genów [69]. Poniższe przykłady potwierdzają wielorakość funkcji kohezyn.

Mutacje w genach kodujących kohezyny u *S. pombe* i *Xenopus laevis* powodują nadwrażliwość na substancje uszkadzające DNA, w tym na promieniowanie UV, kamptotecynę, hydroksymocznik [13]. Wrażliwość mutantów na te substancje wspiera pogląd, według którego kohezja chromatyd siostrzanych poprawia efektywność rekombinacyjnej naprawy DNA poprzez zapewnienie bliskiego kontaktu

z matrycą [70]. Początkowo sądzono, że bliskość chromatyd jest utrzymywana przez niezależną od naprawy DNA kohezję ustanowioną w fazie S, niezbędną do prawidłowej segregacji chromosomów. Obecnie wiadomo, że do efektywnej poreplikacyjnej naprawy DNA niezbędne jest dodatkowe ustanowienie kohezji.

Jak już kilkakrotnie wspomniano, specyficzna i kompleksowa odpowiedź komórki na pęknięcia dwuniciowe DNA (DSB) indukuje kohezję w fazie G2/M [41,42]. Wiadomo, że w pobliżu pęknięcia DNA następuje szybka fosforylacja histonu H2AX, należącego do podrodziny histonów H2A [71]. Fosforylacji tej dokonują główne regulatory naprawy DNA: Mec1p i Tel1p. Wiadomo też, że w odpowiedzi na uszkodzenie DNA następuje aktywacja acetylotransferazy Eco1p regulującej ustanawianie kohezji. W niedawno opublikowanym artykule dowiedziono, że w kohezji indukowanej przez pęknięcia dwuniciowe szczególną rolę odgrywa podjednostka Scc1p [72]. Powstanie pęknięcia aktywuje kinazę Chk1p, efektor punktu kontrolnego rejestrującego uszkodzenia DNA, która fosforyluje zachowaną w ewolucji resztę seryny w pozycji 83 w Scc1p. Ta reszta seryny jest zlokalizowana w domenie oddziałującej z drugą podjednostką rdzenia kohezynowego - Smc3p. Ponieważ Smc3p jest ponadto substratem Eco1p, także aktywowanego przez DSB, jest więc możliwe, że modyfikacje w Scc1p i Smc3p w obrębie kontaktujących się domen obu białek są istotne dla ustanowienia dodatkowej kohezji w fazie G2/M.

Fenotypy mutantów w genach kodujących kohezyny w *S. pombe* i wyższych *Eukaryota* sugerują udział tych białek także w morfogenezie chromosomów, zarówno w mitozie, jak i w mejozie. Zaobserwowano, że w mejozie kompleksy kohezynowe są głównym składnikiem osi chromosomów [73]. Obecność tych kompleksów jest niezbędna do utworzenia kompleksu synaptonemalnego, białkowej struktury, która tworzy się pomiędzy chromosomami homologicznymi i jest niezbędna w mejotycznym parowaniu chromosomów, tworzeniu chiasm i rekombinacji. Chociaż molekularne mechanizmy tych zjawisk nie są znane, uważa się, że kompleksy kohezynowe mogą pełnić funkcję platformy, na której organizują się inne kompleksy organizujące chromosomy. Zaobserwowano również, że zmiana poziomu kohezyn w komórkach *S. cerevisiae* i *S. pombe* powoduje hipo- lub hiperkondensację chromosomów [74,75]. Powyższe obserwacje sugerują istotny udział kohezyn w utrzymywaniu struktury chromosomów.

Kohezyny jako potencjalne elementy ograniczające specyficzne obszary chromatynowe oraz jako platformy do składania dużych kompleksów białkowych prawdopodobnie mają znaczenie w regulacji transkrypcji. Pierwsze badania łączące kohezyny z ekspresją genów przeprowadzono w *D. melanogaster* i drożdżach. Wykazano, że białko Nipped-B, ortolog drożdżowego Scc2p, jest niezbędne do regulowania na daleki dystans (ang. *long-range activation*) aktywności genu homeotycznego *cut* w *D. melanogaster* [76]. Stwierdzono również, że w *S. cerevisiae* kohezyny pełnią funkcje elementów limitujących wyciszenie transkrypcji w regionach sąsiadujących z kasetą koniugacyjną *HMR* [77]. Z kolei STAG2, ludzki homolog kohezyny Irr1, posiada motyw LXXL zachowany w ewolucji w rodzinach białek pełniących funkcje

koaktywatorów transkrypcji. Wykazano, że STAG2 wzmacnia aktywność promotora czynnika matrycy nowotworu TNF α , a także CD69 oraz HIV-LTR zależnych od czynnika transkrypcyjnego NF-kappa B. STAG2 przyłącza się do transaktywacyjnej domeny p65/RelA czynnika NF-kappa B i wzmacnia jego aktywność [78].

Przeprowadzone ostatnio na dużą skalę doświadczenia immunoprecypitacji chromatyny wykazały kolokalizację kohezyn z białkiem CTCF [79,80]. CTCF jest białkiem zachowanym w ewolucji wśród kręgowców. Pełni ono funkcje ograniczające oddziaływania pomiędzy enhancerem (wzmacniaczem) a promotorem, wiążąc się z izolatorami (sekwencjami DNA, które wraz z przyłączonymi białkami mają zdolność ochrony genu lub większego obszaru genomu przed wpływami enhancerów). STAG1 wiąże się preferencyjnie z DNA sekwencji wiążącej CTCF izolatora *c-Myc*. U myszy wykazano, że kohezyny w fazie G2 i G1, wraz z CTCF, kontrolują *imprinting locus* H19/IGF2 [81]. Rozregulowana ekspresja genu kodującego CTCF związana jest z syndromem Beckwith-Wiedemann. Pacjenci z tym syndromem narażeni są na wysokie ryzyko rozwoju nowotworów. Jedynym do tej pory przykładem pozytywnej regulacji transkrypcji z udziałem kohezyn jest morfogeneza neuronów, w której niezbędne są białka STAG2 i Smc1p [82].

KOHEZYNOPATIE

Choroby wynikające z zaburzenia kohezji u ludzi nazywane są kohezynopatiami. Najczęstszą chorobą jest zespół Downa (trisomia 21 chromosomu), którego przyczyną jest nondysjunkcja chromosomu 21 w trakcie mejozy oocytów [83]. Mimo stosunkowo dużej częstości występowania (1 na 800-1000 urodzeń), molekularne mechanizmy powstawania zespołu Downa nie są znane. Inne trisomie zachodzą z różną częstością, ale niektóre, np. trisomia chromosomu 13 lub 18, są trudne do śledzenia, gdyż powodują letalność embrionów. Częstość nondysjunkcji jest większa w mejozie oocytów starszych kobiet, bowiem dodatnio współzależny od wyższej częstości niesparowanych chromosomów oraz od ich przedwczesnej segregacji [84].

Mutacje w genach kodujących niektóre kohezyny lub białka regulujące kohezję są związane z zespołami Cornelia de Lange i Roberts, czyli fokomelią, zaburzeniami rozwojowymi [85]. Połowa przypadków pierwszego zespołu jest związana z mutacją w genie *NIPBL* kodującym ludzki ortolog białka Scc2 niezbędnego do deponowania kompleksów kohezynowych, a kilka - z mutacją w genach *SMC1* lub *SMC3* - ATPaz, pełniących funkcję rdzenia kompleksu kohezynowego. Mutacje te są semi-dominujące, ale w komórkach pacjentów z tymi zespołami nie ma wyraźnie zaburzonej segregacji chromosomów. Przypuszcza się więc, że defekty te mogą dotyczyć zaburzonej funkcji kohezyn w regulacji transkrypcji. Zespół Roberts różni się klinicznie od zespołu Cornelia de Lange i spowodowany jest mutacją w genie *ESCO2*, który koduje ludzki ortolog acetylotransferazy Eco1p, niezbędnej w ustanowieniu kohezji chromatyd siostrzanych. Mutacje w *ESCO2* powodują zaburzenia w kohezji centromerów chromosomów oraz ramion chromosomu Y.

PODSUMOWANIE

Pierwsze obserwacje segregacji chromosomów miały miejsce około 150 lat temu, zaś prace nad poznaniem mechanizmów molekularnych tego zjawiska trwają od około 30 lat. Pomimo tego że nagromadzono szereg obserwacji i wniosków, nie stworzono dotąd spójnego i kompletnego opisu tego procesu. Wydawało się, że kompleks kohezyjny, zidentyfikowany pod koniec lat 90-tych XX wieku, będzie najważniejszym czynnikiem odpowiedzialnym za wierność segregacji. Na podstawie badania głównego organizmu modelowego - drożdży *S. cerevisiae* stworzono jednopierścieniowy model budowy kompleksu i zaproponowano sposób funkcjonowania. Jednakże systematyczne badania elementów kompleksu zamiast przyczyniać się do doprecyzowania sposobu jego funkcjonowania - dostarczają coraz więcej pytań. Obecnie kwestionuje się uniwersalność jednopierścieniowego modelu dla wszystkich *Eukaryota*, u organizmów wyższych bardziej niż jednopierścieniowy – staje się popularny model kajdanek. Ponieważ pojawiają się coraz liczniejsze prace dotyczące dodatkowych (nie w kohezji) ról odgrywanych przez kohezyny i białka regulujące kohezję, zaczyna się przypuszczać, że utrzymywanie przylegania chromatyd to tylko jedno z zadań kompleksu. Proponuje się, że zasadniczą funkcją kohezyn mogłoby być usuwanie białek, RNA i zmian topologicznych DNA, które były niezbędne w trakcie funkcjonowania chromatyny w interfazie mitozy [86]. W ten sposób kohezyjny przygotowowałyby chromosomy do kondensacji i późniejszej segregacji. Kolejne lata zapewne pozwolą na weryfikację tych przypuszczeń.

PIŚMIENICTWO

1. Diaz-Martinez LA, Gimenez-Abian JF, Clarke DJ (2008) Chromosome cohesion - rings, knots, orcs and fellowship. *J Cell Sci* 121: 2107-2114
2. Haering CH, Schoffnegger D, Nishino T, Helmhart W, Nasmyth K, Löwe J (2004) Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction. *Mol Cell* 15: 951-964
3. Nasmyth K (2005) How might cohesin hold sister chromatids together? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 483-496
4. Sumara I, Vorlaufer E, Geffers C, Peters BH, Peters JM (2000) Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol* 151: 749-762
5. Losada A, Hirano M, Hirano T (2002) Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes Dev* 16: 3004-3016
6. Nasmyth K, Haering CH (2005) The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem* 74: 595-648
7. Hirano T (2006) At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 311-322
8. Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, Taner JA (2000) Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* 101: 789-800
9. Hirano M, Anderson DE, Erickson HP, Hirano T (2001) Bimodal activation of SMC ATPase by intra- and inter-molecular interactions. *EMBO J* 20: 3238-3250
10. Haering CH, Lowe J, Hochwagen A, Nasmyth K (2002) Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell* 9: 773-788
11. Toth A, Ciosk R, Uhlmann F, Galova M, Schleiffer A, Nasmyth K (1999) Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev* 13: 320-333
12. Kurlandzka A, Rytka J, Różalska B, Wysocka M (1999). *Saccharomyces cerevisiae* IRR1 protein is indirectly involved in colony formation. *Yeast* 15: 23-33
13. Skibbens RV (2008) Mechanisms of sister chromatid pairing. *Int Rev Cell Mol Biol* 269: 283-339
14. Neuwald AF, Hirano T (2000) HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome Res* 10: 1445-1452
15. Carramolino L, Lee BC, Zaballos A, Peled A, Barthelemy I, Shav-Tal Y, Prieto I, Carmi P, Gothelf Y, González de Buitrago G, Aracil M, Márquez G, Barbero JL, Zipori D (1997) SA-1, a nuclear protein encoded by one member of a novel gene family: molecular cloning and detection in hemopoietic organs. *Gene* 195: 151-159
16. Losada A, Yokochi T, Kobayashi R, Hirano T (2000) Identification and characterization of SA/Scp3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes. *J Cell Biol* 150: 405-4016
17. Peters JM, Tedeschi A, Schmitz J (2008) The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev* 22: 3089-3114
18. Rowland BD, Roig MB, Nishino T, Kurze A, Uluocak P, Mishra A, Beckouët F, Underwood P, Metson J, Imre R, Mechtler K, Katis VL, Nasmyth K (2009) Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Mol Cell* 33: 763-774
19. Peters JM, Bhaskara V (2009) Cohesin acetylation: from antiestablishment to establishment. *Mol Cell* 34: 1-2
20. Anderson DE, Losada A, Erickson HP, Hirano T (2002) Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J Cell Biol* 156: 419-424
21. Gruber S, Haering CH, Nasmyth K (2003) Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* 112: 765-777
22. Schalch T, Duda S, Sargent DF, Richmond TJ (2005) X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* 436: 138-141
23. Robinson PJ, Fairall L, Huynh VA, Rhodes D (2006) EM measurements define the dimensions of the 30-nm chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 6506-6511
24. Bash R, Lohr D (2000) Yeast chromatin structure and regulation of GAL gene expression. W: Moldave K (red) *Progr Nucl Acid Res Mol Biol*, t 65. Academic Press, London, str. 197- 259
25. Guacci V (2007) Sister chromatid cohesion: the cohesin cleavage model does not ring true. *Genes Cells* 12: 693-708
26. Zhang N, Kuznetsov SG, Sharan SK, Li K, Rao PH, Pati D (2008) A handcuff model for the cohesin complex. *J Cell Biol* 183: 1019-1031
27. Huang CE, Milutinovich M, Koshland D (2005) Rings, bracelet or snaps: fashionable alternatives for SMC complexes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 537-542
28. Chang CR, Wu CS, Hom Y, Gartenberg MR (2005) Targeting of cohesin by transcriptionally silent chromatin. *Genes Dev* 19: 3031-3042
29. Yeh E, Haase J, Paliulis LV, Joglekar A, Bond L, Bouck D, Salmon ED, Bloom KS (2008) Pericentric chromatin is organized into an intramolecular loop in mitosis. *Curr Biol* 18: 81-90
30. Losada A (2008) The regulation of sister chromatid cohesion. *Biochim Biophys Acta* 1786: 41-48
31. Blat Y, Kleckner N (1999) Cohesins bind to preferential sites along yeast chromosome III, with differential regulation along arms versus the centric region. *Cell* 98: 249-259
32. Laloraya S, Guacci V, Koshland D (2000) Chromosomal addresses of the cohesin component Mcd1p. *J Cell Biol* 151: 1047-1056
33. Weber SA, Gerton JL, Polancic JE, DeRisi JL, Koshland D, Megee PC (2004) The kinetochore is an enhancer of pericentric cohesin binding. *PLoS Biol* 2: E260
34. Kiburz BM, Reynolds DB, Megee PC, Marston AL, Lee BH, Lee TI, Levine SS, Young RA, Amon A (2005) The core centromere and Sgo1 establish a 50-kb cohesin-protected domain around centromeres during meiosis I. *Genes Dev* 19: 3017-3030

35. Tanaka TU (2002) Bi-orienting chromosomes on the mitotic spindle. *Curr Opin Cell Biol* 14: 365-371
36. Pearson CG, Maddox PS, Salmon ED, Bloom K (2001) Budding yeast chromosome structure and dynamics during mitosis. *J Cell Biol* 152: 1255-1266
37. Ghidelli S, Donze D, Dhillon N, Rohinton T, Kamakaka RT (2001) Sir2p exists in two nucleosome-binding complexes with distinct deacetylase activities. *EMBO J* 20: 4522-4535
38. Bernard P, Maure JF, Partridge JF, Genier S, Javerzat JP, Allshire RC (2001) Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* 294: 2539-2542
39. Yang XM, Mehta S, Uzri D, Jayaram M, Velmurugan S (2004) Mutations in a partitioning protein and altered chromatin structure at the partitioning locus prevent cohesin recruitment by the *Saccharomyces cerevisiae* plasmid and cause plasmid missegregation. *Mol Cell Biol* 24: 5290-5303
40. Dubey RN, Gartenberg MR (2007) A tDNA establishes cohesion of a neighboring silent chromatin domain. *Genes Dev* 21: 2150-2160
41. Strom L, Lindroos HB, Shirahige K, Sjögren C (2004) Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair. *Mol Cell* 16: 1003-1015
42. Unal E, Arbel-Eden A, Sattler U, Shroff R, Lichten M, Haber JE, Koshland D (2004) DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. *Mol Cell* 16: 991-1002
43. Lengronne A, McIntyre J, Katou Y, Kanoh Y, Hopfner KP, Shirahige K, Uhlmann F (2006) Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork. *Mol Cell* 23: 787-799
44. Ivanov D, Schleiffer A, Eisenhaber F, Mechtler K, Haering CH, Nasmyth K (2002) Eco1 is a novel acetyltransferase that can acetylate proteins involved in cohesion. *Curr Biol* 12: 323-328
45. Unal E, Heidinger-Pauli JM, Kim W, Guacci V, Onn I, Gygi SP, Koshland DE (2008) A molecular determinant for the establishment of sister chromatid cohesion. *Science* 321: 566-569
46. Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S (2006) PCNA controls establishment of sister chromatid cohesion during S phase. *Mol Cell* 23: 723-732
47. Noble D, Kenna MA, Dix M, Skibbens RV, Unal E, Guacci V (2006) Intersection between the regulators of sister chromatid cohesion establishment and maintenance in budding yeast indicates a multi-step mechanism. *Cell Cycle* 5: 2528-2536
48. Onn I, Heidinger-Pauli JM, Guacci V, Unal E, Koshland DE (2008) Sister chromatid cohesion: a simple concept with a complex reality. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24: 105-129
49. Ben-Shahar TR, Heeger S, Lehane C, East P, Flynn H, Skehel M, Uhlmann F (2008) Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science* 321: 563-566
50. Peters JM (2006) The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 644-656
51. Sullivan M, Uhlmann F (2003) A non-proteolytic function of separase links the onset of anaphase to mitotic exit. *Nat Cell Biol* 5: 249-254
52. Queralt E, Lehane C, Novak B, Uhlmann F (2006) Downregulation of PP2A(Cdc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast. *Cell* 125: 719-732
53. Hauf S, Roitinger E, Koch B, Dittrich CM, Mechtler K, Peters JM (2005) Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol* 3: e69
54. Kitajima TS, Sakuno T, Ishiguro K, Iemura S, Natsume T, Kawashima SA, Watanabe Y (2006) Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* 441: 46-52
55. Riedel CG, Katis VL, Katou Y, Mori S, Itoh T, Helmhart W, Gálová M, Petronczki M, Gregan J, Cetin B, Mudrak I, Ogris E, Mechtler K, Pelletier L, Buchholz F, Shirahige K, Nasmyth K (2006) Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* 441: 53-61
56. Marston AL, Amon A (2004) Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 983-997
57. Yu HG, Dawe RK (2000) Functional redundancy in the maize meiotic kinetochore. *J Cell Biol* 151: 131-142
58. Toth A, Rabitsch KP, Gálová M, Schleiffer A, Buonomo SB, Nasmyth K (2000) Functional genomics identifies monopolin: a kinetochore protein required for segregation of homologs during meiosis. *Cell* 103: 1155-1168
59. Yokobayashi S, Watanabe Y (2005) The kinetochore protein Moa1 enables cohesion-mediated monopolar attachment at meiosis I. *Cell* 123: 803-817
60. Kitajima TS, Kawashima SA, Watanabe Y (2004) The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* 427: 510-517
61. Yamagishi Y, Sakuno T, Shimura M, Watanabe Y (2008) Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* 455: 251-255
62. Brar GA, Kiburz, BM, Zhang Y, Kim JE, White F, Amon A (2006) Rec8 phosphorylation and recombination promote the step-wise loss of cohesins in meiosis. *Nature* 441: 532-536
63. Winey M, Morgan GP, Straight PD, Giddings TH Jr, Mastronarde DN (2005) Three-dimensional ultrastructure of *Saccharomyces cerevisiae* meiotic spindles. *Mol Biol Cell* 16: 1178-1188
64. Sakuno T, Watanabe Y (2009) Studies of meiosis disclose distinct roles of cohesion in the core centromere and pericentromeric regions. *Chromosome Res* 17: 239-249
65. Rabitsch KP, Petronczki M, Javerzat JP, Genier S, Chwalla B, Schleiffer A, Tanaka TU, Nasmyth K (2003) Kinetochore recruitment of two nucleolar proteins is required for homolog segregation in meiosis I. *Dev Cell* 4: 535-548
66. Petronczki M, Matos J, Mori S, Gregan J, Bogdanova A, Schwickart M, Mechtler K, Shirahige K, Zachariae W, Nasmyth K (2006) Monopolar attachment of sister kinetochores at meiosis I requires casein kinase 1. *Cell* 126: 1049-1064
67. Katis VL, Matos J, Mori S, Shirahige K, Zachariae W, Nasmyth K (2004) Spo13 facilitates monopolin recruitment to kinetochores and regulates maintenance of centromeric cohesion during yeast meiosis. *Curr Biol* 14: 2183-2196
68. Chelysheva L, Diallo S, Vezon D, Gendrot G, Vrielynck N, Belcram K, Rocques N, Márquez-Lema A, Bhatt AM, Horlow C, Mercier R, Mézard C, Grelon M (2005) AtREC8 and AtSCC3 are essential to the monopolar orientation of the kinetochores during meiosis. *J Cell Sci* 118: 4621-4632
69. Koshland DE, Guacci V (2000) Sister chromatid cohesion: the beginning of a long and beautiful relationship. *Curr Opin Cell Biol* 12: 297-301
70. Sjogren C, Nasmyth K (2001) Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* 11: 991-995
71. Lewandowska H, Szumieli I (2002) Histone H2AX in DNA repair. *Nukleonika* 47: 127-131
72. Heidinger-Pauli JM, Unal E, Guacci V, Koshland D (2008) The kleisin subunit of cohesin dictates damage-induced cohesion. *Mol Cell* 31: 47-56
73. Revenkova E, Jessberger R (2006) Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins. *Chromosoma* 115: 235-240
74. Hartman T, Stead K, Koshland D, Guacci V (2000) Pds5p is an essential chromosomal protein required for both sister chromatid cohesion and condensation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 151: 613-626
75. Ding DQ, Sakurai N, Katou Y, Itoh T, Shirahige K, Haraguchi T, Hiraoaka Y (2006) Meiotic cohesins modulate chromosome compaction during meiotic prophase in fission yeast. *J Cell Biol* 174: 499-508
76. Rollins RA, Korom M, Aulner N, Martens A, Dorsett D (2004) *Drosophila* nipped-B protein supports sister chromatid cohesion and opposes the stromalin/Sc3 cohesion factor to facilitate long-range activation of the cut gene. *Mol Cell Biol* 24: 3100-3111

77. Donze D, Adams CR, Rine J, Kamakaka RT (1999) The boundaries of the silenced HMR domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 13: 698-708
78. Lara-Pezzi E, Pezzi N, Prieto I, Barthelemy I, Carreiro C, Martínez A, Maldonado-Rodríguez A, López-Cabrera M, Barbero JL (2004) Evidence of a transcriptional co-activator function of cohesin STAG/SA/Scs3. *J Biol Chem* 279: 6553-6559
79. Stedman W, Kang H, Lin S, Kissil JL, Bartolomei MS, Lieberman PM (2008) Cohesins localize with CTCF at the KSHV latency control region and at cellular c-myc and H19/Igf2 insulators. *EMBO J* 27: 654-666
80. Parelho V, Hadjur S, Spivakov M, Leleu M, Sauer S, Gregson HC, Jarmuz A, Canzonetta C, Webster Z, Nesterova T, Cobb BS, Yokomori K, Dillon N, Aragon L, Fisher AG, Merkschlagler M (2008) Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell* 132: 422-433
81. Rubio ED, Reiss DJ, Welch PL, Disteché CM, Filippova GN, Baliga NS, Aebersold R, Ranish JA, Krumm A (2008) CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 8309-8314
82. Schuldiner O, Berdnik D, Levy JM, Wu JS, Luginbuhl D, Gontang AC, Luo L (2008) PiggyBac-based mosaic screen identifies a postmitotic function for cohesin in regulating developmental axon pruning. *Dev Cell* 14: 227-238
83. Gilliland WD, Hawley RS (2005) Cohesin and the maternal age effect. *Cell* 123: 371-373
84. Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J (2003) Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet* 112: 195-203
85. Dorsett D, Krantz ID (2009) On the molecular etiology of Cornelia de Lange syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1151: 22-37
86. Yanagida M (2009) Clearing the way for mitosis: is cohesin a target? *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 489-496

Sister chromatid cohesion complex in *Eukaryota*

Agata Cena[✉], Anna Kurlandzka[✉]

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

✉e-mail AC: student@ibb.waw.pl; ✉e-mail AK: ania218@ibb.waw.pl

Key words: chromosome segregation, mitosis, meiosis, cohesins

ABSTRACT

Faithful chromosome segregation in mitosis and meiosis requires the presence of the sister chromatid cohesion complex. The complex, which was initially identified and characterized in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and subsequently detected in other *Eukaryota*, is composed of four evolutionarily conserved core subunits (cohesins) Smc1, Smc3, Sccl/Mcd1 and Irr1/Scs3. Apart from the core proteins, accurate segregation requires also elements necessary for the deposition of cohesins and for the establishment and the regulation of cohesion. There are several models of cohesin structure and functioning. The oldest and the most popular ring model is currently replaced by the handcuff model. Regulation of cohesion is not very well established but the regulatory role of the Eco1, Irr1 – STAG2, Pds5 and Wap1/Rad61 proteins seems undoubted. Meiotic cohesion differs from cohesion in mitosis and requires the specific Rec8 and Sgo1 proteins. Apart from the main function – the participation in chromosome segregation – cohesins are also involved in the regulation of transcription, DNA double-strand break repair and chromosome morphogenesis. Here we characterize elements of the complex, and describe models of the complex functioning. Moreover, we discuss the regulation of sister chromatid cohesion in mitosis and meiosis and, additionally, we describe atypical functions of cohesins.

STRESZCZENIE

HINT1 (ang. *histidine triad nucleotide-binding protein*) należy do najstarszej ewolucyjnie gałęzi rodziny białek HIT (ang. *histidine triad proteins*). Enzym ten jest fosforoamidaza i katalizuje hydrolizę wiązania P-N w następujących substratach: AMP-NH₂, AMP-lizynie, AMP-alaninie. Fizjologiczna i komórkowa rola HINT1 pozostaje niewyjaśniona. Coraz więcej badań wskazuje na to, że HINT1 może być obok FHIT (ang. *fragile histidine triad protein*) nowym białkiem supresji nowotworów w rodzinie białek HIT. Ostatnie doniesienia sugerują rolę HINT1 w hamowaniu aktywności czynników transkrypcyjnych, takich jak AP1 (ang. *activator protein*), MITF (ang. *microphthalmia-associated transcription factor*) i USF2 (ang. *upstream transcription factor 2*), a także wpływ na transkrypcję genów szlaku Wnt/ β -kateniny. Wydaje się, że zadaniem HINT1 w komórce jest regulacja procesów transkrypcji i z tym związana jest jego potencjalna rola jako supresora nowotworów. W dalszym ciągu niewiele wiadomo na temat klinicznego znaczenia zmiany ekspresji HINT1 w odniesieniu do powstawania nowotworów. Istnieją jednak doniesienia literaturowe wskazujące, iż po indukcji czynnikami kancerogennymi komórki z obniżoną ekspresją HINT1 wykazują statystycznie znamienne wzrost podatności na wystąpienie nowotworów.

WPROWADZENIE

HINT1 należy do białek triady histydynowej HIT, a jego homologi występują we wszystkich organizmach [1]. Charakterystycznym elementem struktury rodziny tych białek jest, znajdujący się na C-końcu, motyw His ϕ His ϕ His $\phi\phi$ (ϕ - reszta aminokwasu hydrofobowego), stanowiący enzymatyczne centrum katalityczne [2]. Białka HIT są enzymami należącymi do grupy hydrolaz lub transferaz nukleotydylowych. Ze względu na strukturę, specyficzność substratową oraz mechanizm działania, enzymy te można podzielić na pięć podklas, przy czym HINT1 należy do pierwszej i najstarszej ewolucyjnie gałęzi. Do tej grupy należy również HINT2, białko mitochondrialne charakterystyczne tylko dla ssaków, którego nadekspresja indukuje apoptozę [3]. Przedstawicielem drugiej podklasy jest białko FHIT o aktywności hydrolazy dinukleozydopolifosforanów (Ap₃A i Ap₄A). FHIT jest białkiem supresorowym (pro-apoptocycznym), biorącym udział w kontroli cyklu komórkowego i indukcji apoptozy [4,5]. Trzecią podgrupę reprezentuje enzym GalT (urydylylotransferaza galaktozo-1-fosforanowa), który przekształca galaktozę w glukozę. Defekty tego białka objawiają się galaktozemią - ciężką chorobą o podłożu genetycznym [6]. Dcps (ang. *scavenger decapping enzyme*) jest przedstawicielem czwartej podklasy i wykazuje zdolność usuwania m⁷GMP z m⁷GpppN pozostałych po zdegradowaniu mRNA [7]. Ostatnią piątą grupę reprezentuje białko o nazwie aprataksyna, które, jak ostatnio wykazano, odgrywa ważną rolę w procesie naprawy DNA. Enzym ten usuwa AMP z 5'-końca pękniętej lub rozciętej jednej nici DNA, a następnie katalizuje ligację obu końców tej nici [8]. Mutacje aprataksyny prowadzą do ataksji, autosomalnej recesywnej choroby neurodegeneracyjnej AOA1.

Obecność genów rodziny HIT stwierdzono w ok. 30 gatunkach, od mykoplazm po rośliny, zwierzęta i człowieka [9]. Pierwsze wzmianki o białku HINT1 pojawiły się w połowie lat 80-tych w trakcie badań nad inhibitorami kinazy białkowej C. Nazywane wówczas PKC-I (ang. *protein kinase C inhibitor*) białko Hint1 o masie 17 000 Da zostało wyizolowane z komórek mózgow bydlę i sklasyfikowane jako inhibitor kinazy białkowej C, zależny od jonów Ca²⁺ [10]. Ponieważ inhibitory PKC były ważnym narzędziem do badań nad funkcją tego enzymu w regulacji, wzroście i różnicowaniu się komórek, prowadzono liczne badania, mające na celu określenie właściwości i rozmieszczenia nowo odkrytego białka. U zwierząt zaobserwowano jego wysoką syntezę, m.in. w wątrobie, nerkach, mózgu i sercu, natomiast w żołądku, aorcie, jelicie i tchawicy poziom tego białka był niższy [11]. Na przykładzie analizy składu aminokwasowego białka Hint1 bydlę, wykazano obecność sześciu reszt histydynowych w C-końcowym fragmencie łańcucha polipeptydowego [12]. Badania struktury drugorzędowej za

Magdalena Ozga[✉]

Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, Łódź

[✉]Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź; (42) 680 32 49; e-mail: mozga@bio.cbmm.lodz.pl

Artykuł otrzymano 11 maja 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 18 sierpnia 2009 r.

Słowa kluczowe: białko Hint 1, białka HIT, czynniki transkrypcyjne, apoptoza

Wykaz skrótów: AMPS – 5'-O-tiofosforan adenozy; CDK 7 (ang. *cyclin dependent kinase 7*) – zależna od cyklin kinaza 7; DNMT (ang. *DNA methyltransferase*) – metylotransferaza DNA; Fhit (ang. *fragile histidine triad protein*) – hydrolaza diadenozynopolifosforanów, należąca do rodziny białek HIT; Hint (ang. *histidine triad nucleotide-binding protein*) – białka triady histydynowej HIT; HIT (ang. *histidine triad proteins*) – enzymy należące do grupy hydrolaz lub transferaz nukleotydylowych; PKC (ang. *protein kinase C*) – kinaza białkowa C; PKC-I (ang. *protein kinase C inhibitor* lub *interactor*) – inhibitor kinazy białkowej C; PKG (ang. *protein kinase G*) – kinaza białkowa G

Podziękowania: Praca powstała w trakcie realizacji projektu „BIO-MAT - Nowoczesne Materiały i Biomateriały, Doktorancki Fundusz Stypendialny dla regionu łódzkiego” w latach 2006-2008 oraz grantu promotorskiego finansowanego przez MNiSW, pt. „Badanie mechanizmu desulfuracji 5'-O-tiofosforanów nukleozydów katalizowanej przez hydrolazę Hint1”, w latach 2009-2010. Promotorowi mojej rozprawy doktorskiej, Panu Prof. Wojciechowi J. Stecowi, składam serdeczne podziękowania za inspirację naukową i korektę niniejszej pracy.

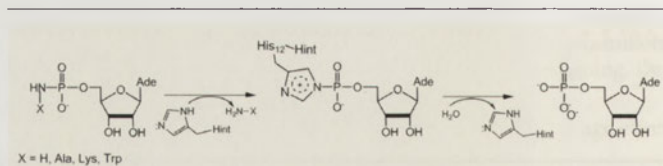
pomocą ^1H NMR i analiza procesu wymiany wodoru-deuter w widmie zarejestrowanym w D_2O udowodniły, że spośród czterech widocznych reszt histydynowych jedynie jedna jest dostępna na powierzchni cząsteczki w roztworze, a trzy pozostałe, oddzielone od siebie tylko przez reszty hydrofobowe w kolejności H ϕ H ϕ H ϕ H ϕ , znajdują się wewnątrz sfałdowanego białka. W ten sposób odkryto obecność motywu trzech reszt histydyny na C-końcu białka. Późniejsze doniesienia zakwestionowały fizjologiczną rolę HINT jako inhibitora kinazy białkowej C. Ostatecznie potwierdzono wyniki tych badań, gdy zidentyfikowano geny kodujące białka Hint1 u *Mycoplasma genitalium*, które to organizmy nie posiadały genów kodujących kinazę białkową C (PKC) ani żadną inną kinazę podobną do eukariotycznych [9].

BADANIA KRystalograficzne I CHARAKTERYSTYKA SUBSTRATÓW

Badania krystalograficzne HINT1 były prowadzone równoległe w dwóch zespołach. W roku 1996 przeprowadzono analizę strukturalną białka HINT1 człowieka [13]. Aczkolwiek nie zaobserwowano obecności jonów cynku w badanych kryształach, sugerowano że dwie z trzech reszt histydyny motywu H ϕ H ϕ H ϕ H ϕ (His112 i His114) oraz His51 są prawdopodobnie zaangażowane w wiązanie jonu cynku. W roku 1997 opublikowano badania, które ostatecznie zaprzeczyły hamującej aktywności enzymu HINT1 wobec kinazy białkowej C, a także wykluczyły postulowaną dotychczas zdolność enzymu do wiązania jonów Zn^{2+} przez motyw histydynowy [9]. Ponadto, porównano sekwencję HINT1 z jego homologiem FHIT, który sklasyfikowano jako asymetryczną hydrolazę Ap_4A , co pomogło zidentyfikować grupę potencjalnych substratów dla enzymu HINT1. Badania krystalograficzne Hint1 królika (*rHint1*), także w kompleksie z adenozyną, GMP i 8-Br-AMP, dostarczyły informacji, iż enzym ten posiada domeny (także między innymi triadę histydynową) zaangażowane w wiązanie 5'-monofosforanów rybonukleozydów purynowych [9]. Zauważono, że brak jest oddziaływania enzymu z kinazą białkową C i dlatego od tej pory nowo powstała gałąź rodziny HIT nazywa się HINT od ang. *histidine triad nucleotide-binding protein*. Porównanie sekwencji aminokwasowej oraz badania krystalograficzne dowiodły również, że Hint1 królika nie różni się od białka pochodzącego z człowieka (powyżej 93% homologii), poza małymi odstępstwami dopuszczalnymi wśród homologów gatunkowych, a także, że białko to ewolucyjnie jest przodkiem pozostałych białek rodziny HIT [9].

MECHANIZM DZIAŁANIA HINT1 JAKO FOSFOROAMIDAZY

Formą aktywną enzymu jest homodimer o masie ~30 kDa, z dwoma miejscami wiązania substratu, wykazujący właściwości fosforoamidazy, tj. zdolność hydrolizy wiązania P-N w substratach, takich jak AMP- NH_2 , AMP-Lys czy też AMP-Ala z szybkością powyżej 1 nmol min $^{-1}$ μg^{-1} (*rHint1*) [14] zgodnie ze schematem (Ryc. 1). Ponadto zaobserwowano, iż enzym ten może się wiązać również z Ap_4A i Ap_3A , ale w przeciwieństwie do Fhit nie katalizuje ich hydrolizy. Hint1 może również wiązać się z ATP, ADP oraz AMPS i hydrolizować te związki, jednakże szybkość reakcji jest kilka rzędów wielkości niższa niż dla amidofosforanów



Rycina 1. Reakcja hydrolizy amidofosforanów adenozyzny katalizowana za pomocą białka Hint1.

nukleozydów. Ponadto, ostatnie doniesienia literaturowe wskazują, że AMPS (5'-O-tiofosforan adenozyzny) może ulegać reakcji desulfuracji pod wpływem działania *rHint1* [15]. Stwierdzono także, iż zachowanie aktywności katalizycznej jest związane z obecnością środkowej reszty histydyny motywu HIT (dla *rHint1* jest to His112), podobnie jak w przypadku Fhit, przedstawiciela drugiej gałęzi białek HIT. Ostatnie badania sugerują, że naturalnym substratem Hint1 może być adenylo-lizyna, generowana przez syntetazę lizylo-tRNA (LysRS). W tym kontekście enzym Hint1 o aktywności hydrolazy aminoacylo-adenylanowej, może odgrywać ważną rolę w regulacji procesu translacji [16].

W celu zbadania mechanizmu i specyficzności działania Hint1 wykorzystano związki adenozyno-sulfamioilowe jako inhibitory tego białka zarówno w badaniach krystalograficznych, jak i biochemicznych (oznaczanie K_i) [17]. Analiza struktury krystalicznej kompleksów *rHint1*/inhibitor sugerowała, iż w katalizie kwasowo-zasadowej funkcję zasady może spełniać atom tlenu grupy karbonylowej Gly105, a proton grupy hydroksylowej Ser107 spełnia funkcję kwasu. Biochemiczna charakterystyka zmutowanego białka Hint1 S107A potwierdziła taką możliwość.

Niedawno określono stereochemię katalizowanego przez *rHint1* procesu rozszczepienia wiązania P-N w substratach nukleotydo-aminokwasowych (Ryc. 1) [17]. Stwierdzono, że reakcja przebiega dwuetapowo z wypadkową retencją konfiguracji na atomie fosforu. W pierwszym etapie, (zachodzącym z inwersją konfiguracji) pod wpływem reszty histydyny 112, następuje zerwanie wiązania P-N z utworzeniem kowalencyjnego kompleksu pośredniego enzym-substrat (*Hint1*-NMP). W drugim etapie produkt ten, pod wpływem cząsteczki wody, ulega hydrolizie (reakcja nukleofilowego podstawienia zachodząca z inwersją konfiguracji) z wydzieleniem NMP i cząsteczki wolnego enzymu.

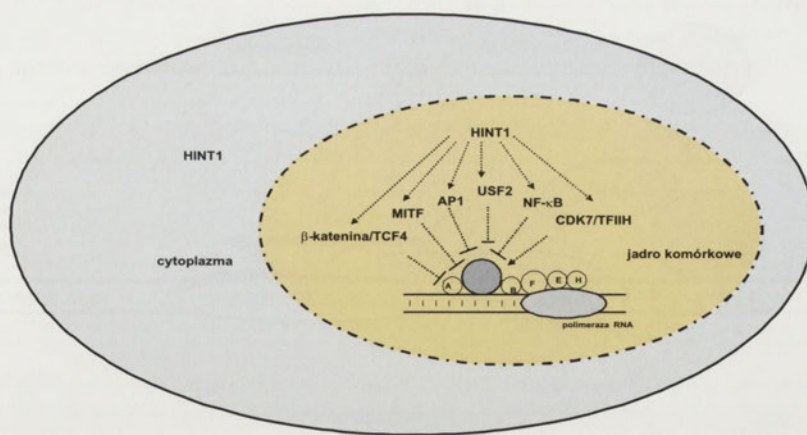
HAMOWANIE AKTYWNOŚCI CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH - ROLA HINT1 JAKO SUPRESORA NOWOTWOROWEGO

Badania ostatnich lat rzuciły nieco światła na fizjologiczną i biologiczną rolę HINT1. Identyfikacja partnerów oddziałujących z tym białkiem za pomocą m.in. systemu dwuhybrydowego wskazuje, że HINT1 może być zaangażowany w regulację procesów transkrypcyjnych. Dowiedziono, między innymi, funkcji HINT1 jako represora czynnika transkrypcyjnego MITF, który reguluje ekspresję genów odgrywających istotną rolę w pigmentacji i proliferacji komórek tucznych [18]. W dalszych badaniach wykazano, że syntetaza lizylo-tRNA jest kolejnym składnikiem kompleksu HINT1- MITF [19]. Co więcej, Ap_4A - endogenna cząsteczka syntetyzowana przez LysRS, również oddziałuje z tym

kompleksem i, wiążąc się z HINT1, uwalnia MITF, co prowadzi do aktywacji genów zależnych od tego czynnika transkrypcyjnego. Podobny mechanizm regulacji stwierdzono w przypadku innego czynnika transkrypcyjnego USF2, który jest powszechnie spotykany w komórkach eukariotycznych i bierze udział w transkrypcji genów odpowiedzialnych za proliferację i metabolizm komórek [20]. Ponieważ USF2 ma kluczowe znaczenie dla wielu funkcji komórki, ten sposób regulacji transkrypcji z udziałem HINT1, LysRS oraz Ap₄A może być ogólnym mechanizmem regulacji ekspresji genów w komórkach.

Ostatnie doniesienia wyraźnie podkreślają, że hamowanie aktywności czynników transkrypcyjnych jest ściśle związane z rolą HINT1 jako supresora nowotworów [21]. Autorzy cytowanej pracy dowodzą, że wiązanie się HINT1 z kompleksem POSH-JNK2 w komórkach nowotworu jelita grubego hamuje aktywność transkrypcyjną czynnika AP1, który pełni istotną funkcję w transkrypcji genów odpowiedzialnych za proliferację komórek, angiogenezę i inwazję nowotworu. Aktywność AP1, co istotne, jest zawsze podwyższona w komórkach nowotworowych, zatem zahamowanie aktywności AP1 tłumaczy supresorową funkcję HINT1. Autorzy podkreślają, że zwiększona ekspresja HINT1 w komórkach nowotworowych (raka jelita grubego, piersi, płuc, wątroby) hamuje ich wzrost, co wyraźnie identyfikuje HINT1 jako nowe białko supresji nowotworów.

Zauważono też oddziaływanie pomiędzy białkiem HINT1 człowieka a CDK7 (ang. *cyclin dependent kinase 7*), co wskazuje na jego rolę w kontroli wzrostu komórek i regulacji transkrypcji [22]. CDK7 jest cyklino-zależną kinazą tworzącą, razem z cyklina H i MAT-1 (fr. *ménage à trois 1*), kompleks CAK (ang. *CDK-activating kinase*), który jest częścią czynnika transkrypcyjnego TFIIF. Pomimo początkowej sugestii, iż to fizyczne oddziaływanie HINT1 wpływa na regulację procesu transkrypcji, istnieją przesłanki do stwierdzenia, że to aktywność enzymatyczna HINT1 jest niezbędna dla pozytywnej regulacji tego procesu [23]. Dowiedziano także bezpośrednich oddziaływań HINT1 z pontyną i reptyną, białkami antagonistycznie regulującymi aktywność transkrypcyjną jądrowej β -kateniny [24]. W wyniku oddziaływania tych białek z HINT1 następuje hamowanie transkrypcji genów szlaku Wnt/ β -katenina. Zaburzenia w regulacji tego szlaku indukują proces nowotworzenia wywołany akumulacją β -kateniny w jądrze komórkowym. HINT1 okazał się dodatkowym czynnikiem w szlaku Wnt, który powoduje rozbięcie homodimerycznego lub heterodimerycznego kompleksu pontyna/reptyna, co prowadzi do supresji aktywności transkrypcyjnej kompleksu TCF/ β -katenina. Wyniki doświadczeń zaprezentowanych w pracy [24] wskazują, że molekularny mechanizm działania HINT1 jako supresora nowotworowego nie jest jednakowy dla wszystkich czynników transkrypcyjnych, z którymi HINT1 oddziałuje. Istnieją również przesłanki, że HINT1 może być zaangażowany w regulację transkrypcji p53, jednakże potrzebne są dalsze



Rycina 2. Schemat oddziaływania białka HINT1 z czynnikami transkrypcyjnymi. (A, B, E, F, H- czynniki transkrypcyjne) w oparciu o badania prowadzone na komórkach człowieka.

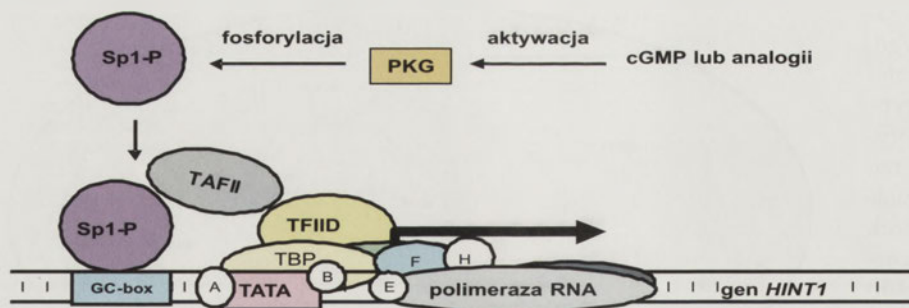
badania dla wyjaśnienia czy jest to mechanizm bezpośredniej regulacji transkrypcji, czy może HINT1 działa poprzez innych partnerów białkowych [25] (Ryc. 2).

HINT1 A PROMIENIOWANIE JONIZUJĄCE

W literaturze opisano obserwacje na temat roli białka Hint1 w zwiększaniu wrażliwości komórek na promieniowanie jonizujące poprzez hamowanie transkrypcji genu *c-fos* w fibroblastach myszy [26]. Fibroblasty pozbawione genu HINT1, w odpowiedzi na uszkodzenia DNA wywołane przez promieniowanie jonizujące, wykazują zmniejszoną zdolność naprawczą DNA i upośledzoną kontrolę szlaku ATM (ang. *ataxia telangiectasia mutated*) [27]. Szlak ten jest odpowiedzialny za kontrolę cyklu komórkowego. W wyniku aktywacji szlaku ATM przez czynniki powodujące uszkodzenia DNA, takie jak promieniowanie jonizujące, czynniki chemiczne, itd., następuje stymulacja procesów odpowiedzialnych za naprawę DNA oraz zatrzymanie cyklu komórkowego. Szlak ten jest również współodpowiedzialny za indukcję apoptozy w następstwie uszkodzeń DNA (fosforylacja białka p53 zależna od ATM). Ponieważ HINT1 odgrywa istotną rolę w procesie odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA, jego obniżona ekspresja może zwiększać prawdopodobieństwo niestabilności genomu, co w konsekwencji sprzyja rozwojowi nowotworów i potwierdza rolę HINT1 jako supresora nowotworowego.

REGULACJA EKSPRESJI HINT1

Jak przedstawiono powyżej, liczne badania prowadzone zarówno na modelu komórkowym, jak i zwierzęcym (myszy), wykazały, że ekspresja HINT1 może być znacznie obniżona wskutek procesów epigenetycznych. Jednakże, regulacja ekspresji HINT1 nie zachodzi jedynie poprzez metylację regionu promotorowego. Wykazano także, że ekspresja HINT1 zależy również od aktywności kinazy białkowej G (PKG) [28]. Poziom tego białka jest często obniżony w komórkach nowotworowych. Aktywacja PKG w komórkach raka jelita grubego spowodowała wzrost ekspresji kilku supresorów nowotworowych, w tym również HINT1. Znane są aktywatory kinazy białkowej G, analogi cGMP,



Rycina 3. Schemat regulacji ekspresji genu *HINT1* za pomocą kinazy białkowej G.

które zwiększają aktywność fosforylującą PKG w stosunku do czynnika transkrypcyjnego Sp1 (ang. *Specific protein 1*). Ufosforylowana forma czynnika Sp1 posiada podwyższoną aktywność transkrypcyjną i poprzez związanie się z promotorem genu *HINT1*, zwiększa poziom ekspresji tego genu (Ryc. 3).

HINT1 A APOPTOZA KOMÓREK

Supresorowa rola *HINT1* została poparta również jego zdolnością do indukcji apoptozy [25]. Nadekspresja *HINT1* w komórkach nowotworów piersi i jelita grubego indukuje apoptozę poprzez uwolnienie cytochromu c do cytoplazmy, aktywację kaspazy 3 oraz fragmentację DNA. Podwyższenie poziomu *HINT1* indukuje także wzrost poziomu pro-apoptycznego białka Bax i spadek poziomu anty-apoptycznego białka Bcl-2. *HINT1* może mieć również wpływ na regulację transkrypcji p53, jednego z podstawowych regulatorów apoptozy, jednakże dokładny mechanizm działania *HINT1* nie został jeszcze zaproponowany. Udowodniono także, że wyciszenie *HINT1* w komórkach powoduje spadek syntezy pro-apoptycznych białek Bax i p53. Natomiast utrata aktywności enzymatycznej *HINT1*, spowodowana przez mutację centralnej reszty histydyny motywu histydynowego, nie ma wpływu na indukcję apoptozy [25]. W konsekwencji można wysnuć wniosek, że aktywność hydrolazowa *HINT1* nie ma wpływu na rolę tego białka jako supresora nowotworowego.

ROLA HINT1 W KOMÓRKACH NEURONALNYCH

W 2001 roku pojawiły się informacje o znacznie zmniejszonej ekspresji *HINT1* w mózгах płodów z zespołem Downa [29], a ostatnio stwierdzono oddziaływanie kompleksu *HINT1*-RGS17 z receptorem opioidowym μ [30]. Oddziaływanie to polega na kontroli aktywności receptora morfiny i zapobieganiu osłabieniu odpowiedzi receptora na kolejne dawki narkotyku. *Hint1* tworzy kompleks z RGS17/Z2 (ang. *regulator of G-protein signalling*) oddziałuje z γ PKC, jedną z izoform PKC, co prowadzi do fosforylacji reszt treoniny/seryny w białku receptora morfiny i powoduje jego zwiększoną wrażliwość na kolejne dawki morfiny.

Ciekawostką może być fakt, że *HINT1*, enzym działający zazwyczaj jako homodimer (postać białka wymagana do uzyskania aktywności enzymatycznej) w kompleksie *HINT1*-RGS17, jest najprawdopodobniej monomerem i działa jako adaptor białka RGS17, a działanie to jest niezależne

od jego aktywności enzymatycznej. Ponadto, w doświadczeniach wykorzystujących mikromacierze, potwierdzonych metodą *real time* RT-PCR, zauważono znacznie niższą ekspresję *HINT1* na poziomie mRNA u pacjentów ze schizofrenią [31]. Inni autorzy w swoich badaniach wskazują *HINT1* jako jeden z wielu genów, które mogą być powiązane ze schizofrenią, dodatkowo uzależnioną od płci pacjentów [32]. Te badania wyraźnie podkreślają istotną rolę ekspresji *HINT1* w chorobach neurorozwojowych.

EKSPRESJA HINT1 A POWSTAWANIE NOWOTWORÓW

Doświadczenia przeprowadzone na myszach *HINT1*^{-/-} wykazały, że brak ekspresji tego białka nie ma wpływu na rozwój i wzrost badanych zwierząt [33]. Jednakże, jak się okazało, w odpowiedzi na czynnik kancerogeny NBCA (N-nitrozometylobenzyloamina) pojawiła się u takich myszy statystycznie znamienne zwiększona liczba przypadków raka żołądka w porównaniu z grupą kontrolną myszy *wt* [34]. Ponadto, myszy całkowicie pozbawione genu *HINT1*, jak również zwierzęta o genotypie *HINT1*^{+/-} wykazywały podobnie zwiększoną podatność na indukowane przez DMBA (7,12-dimetylobenzantracen) nowotwory jajnika i piersi [23].

Stwierdzono także, że po dodaniu 5-aza-dC, inhibitora aktywności enzymatycznej DNMT, hamującego metylację DNA i wykazującego właściwości przeciwnowotworowe, następuje spadek inwazyjności nowotworowej komórek NCI-H522, spowodowany demetylacją sekwencji promotorowych kilkunastu różnych genów supresorowych, w tym także genu *HINT1* [35].

Podobny epigenetyczny efekt obniżenia ekspresji genu białka *HINT1*, spowodowany metylacją reszt cytozyny, zauważono w komórkach nowotworu jelita grubego i płuc człowieka. Efekt ten mógł być odwrócony po podaniu komórkom 5-aza-dC. Wyniki te po raz kolejny potwierdziły działanie *HINT1* jako supresora procesu nowotworzenia. Ostatnie doniesienia wskazują, że wyciszenie ekspresji *HINT1* w komórkach raka wątroby jest także spowodowane hipermetylacją regionów promotorowych. Badania te przeprowadzono wśród pacjentów z USA i Tajwanu zarażonych również wirusem wątroby typu B i C [36]. Ostatnio wykazano, że przywrócenie ekspresji *HINT1* w komórkach złośliwego raka wątroby powoduje zahamowanie wzrostu komórek guza [37].

Istnieje również hipoteza, że defekty spowodowane delecją *HINT1* mogą być bardziej wyraźne w komórkach z jednoczesną delecją genu *FHIT*, białka tej samej rodziny, które posiada również powinowactwo do substratów dla *HINT1* [38].

PODSUMOWANIE

HINT 1 jest hydrolazą należącą do rodziny białek triady histydynowej, której biologiczna i fizjologiczna rola polega

na regulacji procesów transkrypcji. Ostatnie badania jednoznacznie wskazują, że HINT1, obok białka FHIT, może być kolejnym supresorem nowotworowym w rodzinie białek HIT. Wydaje się, że działanie HINT1 jako nowego supresora nowotworowego polega na hamowaniu licznych czynników transkrypcyjnych. Chociaż dotychczas nie zaproponowano jednego wspólnego mechanizmu działania białka HINT1 w regulacji procesów transkrypcji różnych genów, udokumentowano, że w każdym przypadku aktywność HINT1 prowadzi do zahamowania transkrypcji genów odpowiedzialnych za proces nowotworzenia.

Ponadto, HINT1 jest zaangażowany w indukcję apoptozy w odpowiedzi komórki na promieniowanie jonizujące i procesy naprawy DNA. Obniżenie poziomu ekspresji HINT1 może prowadzić do powstawania chorób neurodegeneracyjnych. Ciągłe jednak niewiele wiadomo o klinicznej istotności roli obniżenia ekspresji HINT1 w odniesieniu do powstawania nowotworów człowieka. Dlatego studia nad fizjologiczną rolą białka HINT1 w supresji procesu nowotworzenia są przedmiotem zainteresowania i studiów wielu zespołów badawczych [39].

PIŚMIENNICTWO

1. Mozier NM, Walsh MP, Pearson JD (1991) Characterization of a novel zinc binding site of protein kinase C inhibitor-1. *FEBS Lett* 279: 14-18
2. Brenner C (2002) Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. *Biochemistry* 41: 9003-9014
3. Martin J, Magnino F, Schmidt K, Piguet AC, Lee JS, Semela D, St-Pierre MV, Ziemiecki A, Cassio D, Brenner C, Thorgeirsson SS, Dufour JF (2006) Hint2, a mitochondrial apoptotic sensitizer down-regulated in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 130: 2179-2188
4. Campiglio M, Bianchi F, Andriani F, Sozzi G, Tagliabue E, Ménard S, Roz L (2006) Diadenosines as FHIT-ness instructors. *J Cell Physiol* 208: 274-281
5. Pecherzewska R, Nawrot B (2009) FHIT - tumor suppressor protein involved in induction of apoptosis and cell cycle regulation *Postępy Biochem* 55: 66-75
6. Elsas LJ 2nd, Lai K (1998) The molecular biology of galactosemia. *Genet. Med* 1: 40-48
7. Liu H, Rodgers ND, Jiao X, Kiledjian M (2002) The scavenger mRNA decapping enzyme Dcp5 is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J* 21: 4699-4708
8. Ahel I, Rass U, El-Khamisy SF, Katyal S, Clements PM, McKinnon PJ, Caldecott KW, West SC (2006) The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature* 443: 713-716
9. Brenner C, Garrison P, Gilmour J, Peisach D, Ringe D, Petsko GA, Lowenstein JM (1997) Crystal structures of HINT demonstrate that histidine triad proteins are GalT-related nucleotide-binding proteins. *Nat Struct Biol* 4: 231-238
10. McDonald JR, Walsh MP (1985) Inhibition of the Ca²⁺- and phospholipid-dependent protein kinase by a novel Mr 17,000 Ca²⁺-binding protein. *Biochem J* 232: 559-567
11. McDonald JR, Gröschel-Stewart U, Walsh MP (1987) Properties and distribution of the protein inhibitor (Mr 17,000) of protein kinase C. *Biochem J* 242: 695-705
12. Pearson JD, De Wald DB, Mathews WR, Mozier NM, Zürcher-Nelly HA, Heinrichson RL, Morris MA, McCubbin WD, McDonald JR, Fraser ED, Vogel HJ, Kay CM, Walsh MP (1990) Amino acid sequence and characterization of a protein inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 265: 4583-4591
13. Lima CD, Klein MG, Weinstein B, Hendrickson WA (1996) Three-dimensional structure of human protein kinase C interacting protein

- 1, a member of the HIT family of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5357-5362
14. Bieganowski P, Garrison PN, Hodawadekar SC, Faye G, Barnes LD, Brenner C (2002) Adenosine monophosphoramidase activity of Hint and Hnt1 supports function of Kin28, Ccl1, and Tfb3. *J Biol Chem* 277: 10852-10860
15. Krakowiak A, Kaczmarek R, Baraniak J, Wieczorek M, Stec WJ (2007) Stereochemistry of rHint1 hydrolase assisted cleavage of P-N bond in nucleoside 5'-O-phosphoramidothioates. *Chem Commun* 21: 2163-2165
16. Chou TF, Wagner CR (2007) Lysyl-tRNA synthetase-generated lysyl-adenylate is a substrate for histidine triad nucleotide binding proteins. *J Biol Chem* 282: 4719-4727
17. Krakowiak A, Pace HC, Blackburn GM, Adams M, Mekhalia A, Kaczmarek R, Baraniak J, Stec WJ, Brenner C (2004) Biochemical, crystallographic, and mutagenic characterization of hint, the AMP-lysine hydrolase, with novel substrates and inhibitors. *J Biol Chem* 279: 18711-18716
18. Razin E, Zhang ZC, Nechushtan H, Frenkel S, Lee YN, Arudchandran R, Rivera J (1999) Suppression of microphthalmia transcriptional activity by its association with protein kinase C-interacting protein 1 in mast cells. *J Biol Chem* 274: 34272-34276
19. Lee YN, Nechushtan H, Figov N, Razin E (2004) The function of lysyl-tRNA synthetase and Ap4A as signaling regulators of MITF activity in FcepsilonRI-activated mast cells. *Immunity* 20: 145-151
20. Lee YN, Razin E (2005) Nonconventional involvement of LysRS in the molecular mechanism of USF2 transcriptional activity in FcepsilonRI-activated mast cells. *Mol Cell Biol* 25: 8904-8912
21. Wang L, Zhang Y, Li H, Xu Y, Santella RM, Weinstein IB (2007) Hint1 inhibits growth and activator protein-1 activity in human colon cancer cells. *Cancer Res* 67: 4700-4708
22. Korsisaari N, Mäkelä TP (2000) Interactions of Cdk7 and Kin28 with Hint/PKCI-1 and Hnt1 histidine triad proteins. *J Biol Chem* 275: 34837-34840
23. Li H, Zhang Y, Su T, Santella RM, Weinstein IB (2006) Hint1 is a haploinsufficient tumor suppressor in mice. *Oncogene* 25: 713-721
24. Weiske J, Huber O (2005) The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF-beta-catenin-mediated transcription. *J Cell Sci* 118: 3117-3129
25. Weiske J, Huber O (2006) The histidine triad protein Hint1 triggers apoptosis independent of its enzymatic activity. *J Biol Chem* 281: 27356-27366
26. Choi EK, Rhee YH, Park H, Ahn SD, Shin KH, Park KK (2001) Effect of protein kinase C inhibitor (PKCI) on radiation sensitivity and c-fos transcription. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49: 397-405
27. Haiyang L, Balajee AS, Su T, Cen B, Hei TH, Weinstein B (2008) The HINT1 tumor suppressor regulates both γ -H2AX and ATM in response to DNA damage. *J Cell Biol* 183: 253-265
28. Cen B, Deguchi A, Weinstein IB (2008) Activation of protein kinase G increases the expression of p21CIP1, p27KIP1, and histidine triad protein 1 through Sp1. *Cancer Res* 68: 5355-5362
29. Weitzdoerfer R, Stolzlechner D, Dierssen M, Ferrers J, Fountoulakis M, Lubec G (2001) Reduction of nucleoside diphosphate kinase B, Rab GDP-dissociation inhibitor beta and histidine triad nucleotide-binding protein in fetal Down syndrome brain. *J Neural Transm Suppl* 61: 347-359
30. Rodriguez-Munoz M, de la Torre-Madrid E, Sanchez-Blazquez P, Bei Wang JB, Garzon J (2008) NMDAR-nNOS generated zinc recruits PKC-gamma to the HINT1-RGS17 complex bound to the C terminus of Mu-opioid receptors. *Cell Signal* 20: 1855-1864
31. Wawter MP, Crook JM, Hyde TM, Kleinman JE, Weinberg DR, Becker KG, Freed W J (2002) Microarray analysis of gene expression in the prefrontal cortex in schizophrenia: a preliminary study. *Schizophr Res* 58: 11-20
32. Chen Q, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Kendrel KS, Chen X (2008) Is the histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) gene a candidate for schizophrenia? *Schizophr Res* 106: 200-207


33. Korsisaari N, Rossi DJ, Luukko K, Huebner K, Henkemeyer M, Mäkelä TP (2003) The histidine triad protein Hint is not required for murine development or Cdk7 function. *Mol Cell Biol* 23: 3929-3935
34. Su T, Suzui M, Wang L, Lin CS, Xing WQ, Weinstein B (2003) Deletion of histidine triad nucleotide-binding protein 1/PKC-interacting protein in mice enhances cell growth and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7824-7829
35. Yuan BZ, Jefferson AM, Popescu NC, Reynolds SH (2004) Aberrant gene expression in human non small cell lung carcinoma cells exposed to demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Neoplasia* 6: 412-419
36. Zhang YJ, Li H, Wu HC, Shen J, Wang L, Yu MW, Lee PH, Bernard Weinstein I, Santella RM (2008) Silencing of Hint1, a novel tumor suppressor gene, by promoter hypermethylation in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 275: 277-284
37. Wang L, Li H, Zhang YJ, Santella RM, Weinstein IB (2008) HINT1 inhibits beta-catenin/TCF4, USF2 and NFkappaB activity in human hepatoma cells. *Int J Cancer* 124: 1536-1534
38. Guranowski A, Wojdyla AM, Pietrowska-Borek M, Bieganski P, Khurs EN, Cliff MJ, Blackburn GM, Błaziak D, Stec WJ (2008) Fhit proteins can also recognize substrates other than dinucleoside polyphosphates. *FEBS Lett* 582: 3152-3158
39. Huber O, Weiske J (2008) Beta-catenin takes a HIT. *Cell Cycle* 7: 1326-1331

KO REKTA

HINT1 - a novel tumor suppressor protein of the HIT superfamily

Magdalena Ozga 

Department of Bioorganic Chemistry, Centre of Molecular and Macromolecular Studies of the Polish Academy of Sciences, 112 Sienkiewicza St., 90-363 Lodz, Poland

 e-mail: mozga@bio.cbmm.lodz.pl

Key words: Hint, HIT, transcription factors, tumor suppressor

ABSTRACT

The histidine triad nucleotide binding protein1 (Hint1) belongs to the first branch of the HIT superfamily. Hint1 catalyses the process of hydrolysis of the P-N bond in AMP-lysine, AMP-alanine, AMP-NH₂. The physiological role of this enzyme is still unclear. There is accumulating evidence that HINT1 is a novel tumor suppressor protein, albeit the mechanism of action of HINT1 in respect to tumor suppression is not fully understood. Recent findings have shown that Hint1 inhibits the activity of the transcription factors AP1, MITF and USF2, as well as influences the transcription process of some genes of Wnt/ β -catenin pathway. Thereby, it seems that Hint1 exerts its major cellular function as gene transcription regulator, and thus, this function provides its potential role as a tumor suppressor protein. The clinical relevance of impairments in the Hint1 expression with the respect to specific human cancers is still a matter of extensive studies.

Wpływ fosforylasy tymidynowej (plytkopochodnego czynnika wzrostu komórek śródbłónka) na angiogenezę guzów. Inhibitory aktywności katalitycznej enzymu

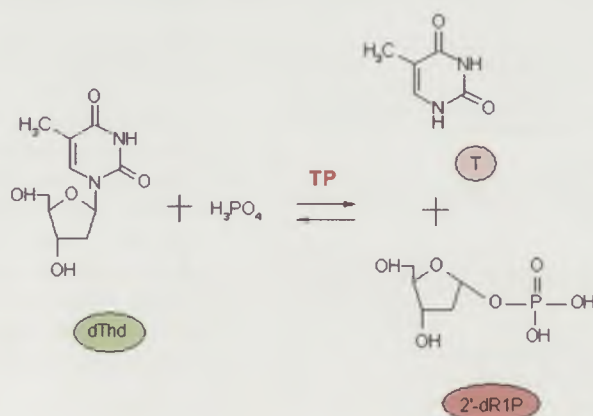
STRESZCZENIE

Fosforylaza tymidynowa utożsamiana jest z płytkopochodnym czynnikiem wzrostu komórek śródbłónka. W pracy przedstawiono pośredni wpływ produktu jej katalizy – 2'-deoksurybozylo-1-fosforanu – na angiogenezę guzów i najnowsze informacje dotyczące związków, które hamują jej aktywność. Inhibitorem fosforylasy jest chlorowodorek 5-chloro-6-[1-(2-iminopirolidyno) metylo] uracylu (TPI), który hamuje aktywność enzymu 1000 razy silniej niż 5-chloro-6-aminouracyl – najsilniejszy znany do roku 1999 inhibitor. Aktywność enzymu hamują istotnie zsyntetyzowane związki podstawione w pozycji 5,6 pierścienia pirymidynowego, 5'-0-propyloinozyna (KIN59) i jej pochodne, 2-deoksy-L-ryboza oraz związki glikozydowe wyizolowane z roślin.

WPROWADZENIE

Aktywność fosforylasy tymidynowej wykryto po raz pierwszy w roku 1930 w tkankach zwierząt (szpiku kostnym, leukocytach, śledzionie i nerce) [1]. W następnych latach białko enzymatyczne wyizolowano, oczyszczono z wielu gatunków roślin, zwierząt oraz bakterii, a także zbadano jego strukturę i właściwości [2-4]. Fosforylaza tymidynowa (ang. *thymidine phosphorylase* –TP) katalizuje odwracalną fosforolizę tymidyny (dThd) do tyminy (T) i 2-deoksurybozylo-1-fosforanu (2-dR1P) (Ryc. 1). Główną metaboliczną funkcją enzymu w komórkach prawidłowych jest katabolizm [5,6]. W latach dziewięćdziesiątych stwierdzono, że płytkopochodny czynnik wzrostu komórek śródbłónka (PD-ECGF, ang. *platelet-derived endothelial cell growth factor*) i fosforylaza tymidynowa są produktami tego samego genu oraz tą samą jednostką transkrypcyjną [7]. Od tego momentu wzrosło zainteresowanie enzymem. W naszym laboratorium stwierdziliśmy ostatnio, że aktywność fosforylasy tymidynowej w cytosolu raka endometrium jest wyższa aniżeli w prawidłowym endometrium i dodatnio związana z syntezą białka PD-ECGF oraz z gęstością mikronaczyń [8] i jest hamowana przez pewne pochodne pirymidynowe [9].

Z danych literaturowych wynika, że wysoka aktywność fosforylasy tymidynowej promuje proliferację komórek śródbłónkowych przez redukcję stężenia tymidyny [10], natomiast produkt jej katalizy, 2'-deoksuryboza, posiada angiogenną i chemotaktyczną aktywność [11]. Nowsze badania wskazują, że w tkance nowotworowej fosforylaza tymidynowa jest aktywowana przez chemiczny i fizyczny stres [12]. Indukcja ta chroni komórki guza przed apoptozą, pomagając przetrwać niekorzystne warunki poprzez zwiększenie metabolizmu nukleozydowego oraz angiogenezy [13]. Biorąc pod uwagę powyższe, obecnie poszukiwane są intensywnie związki, które zmniejszają aktywność fosforylasy tymidynowej.



Rycina 1. Enzymatyczna aktywność fosforylasy tymidynowej. dThd – tymidyna, T – Tymina, 2'-dR1P – 2'-deoksurybozylo-1-fosforan.

Elżbieta Miszczak-Zaborska[✉]

Monika Smolarek

Jacek Bartkowiak

Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Biochemii Medycznej w Łodzi, Łódź

[✉]Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Biochemii Medycznej w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; tel.: (42) 678 24 65, e-mail: zaborska@zdn.umed.lodz.pl

Artykuł otrzymano 2 lipca 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 30 października 2009 r.

Słowa kluczowe: fosforylaza tymidynowa, płytkopochodny czynnik wzrostu komórek śródbłónka, inhibitory, angiogeneza

Wykaz skrótów: EGF (ang. *epithelial growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu; FGF (ang. *fibroblast growth factor*) – czynnik wzrostu fibroblastów; IL-8 (ang. *interleukin-8*) – interleukina-8; MMP-1 (ang. *matrix metalloproteinase-1*) – kolagenaza śródmiąższowa-1; OH-1 (ang. *heme oxygenase-1*) – oksigenaza hemo-wa-1; PD-ECGF (ang. *platelet-derived endothelial cell growth factor*) –płytkopochodny czynnik wzrostu komórek śródbłónka; TGF (ang. *transforming growth factor*) – transformujący czynnik wzrostu; TNF-α (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu α; TP (ang. *thymidine phosphorylase*) – fosforylaza tymidynowa; VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłónka naczyń

Podziękowanie: Praca została wykonana w ramach grantu KBN 4 T09B 038 22.

FOSFORYLAZA TYMIDYNOWA A ANGIOGENEZA W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

PLYTKOPOCHODNY CZYNNIK WZROSTU KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA NA TLE CZYNNIKÓW WZROSTOWYCH WPŁYWAJĄCYCH NA ANGIOGENEZĘ W GUZACH

Powstawanie nowych naczyń krwionośnych jest przełomowym etapem w rozwoju guzów i zostało już wielokrotnie opisane. Nadmienimy jedynie, że płytkopochodny czynnik wzrostu komórek śródbłonka należy do czynników stymulujących angiogenezę, wśród których wymienia się czynnik wzrostu fibroblastów, czynnik wzrostu śródbłonka naczyń, naskórkowy czynnik wzrostu czy transformujący czynnik wzrostu obok czynników hamujących angiogenezę, takich jak trombospondyna czy angiostatyna [14].

PD-ECGF wydzielany przez komórki nowotworowe wykazuje aktywność fosforylasy tymidynowej, którą udało się zahamować zsyntetyzowanym inhibitorem (tzw. TPI). Zasugerowano w ten sposób, że można ograniczyć angiogenezę i wzrost guza, hamując aktywność fosforylasy tymidynowej [15,16]. Następne badania potwierdziły tę sugestię, gdyż wykazały, że u myszy komórki nowotworowe z nadekspresją białka PD-ECGF (TP+) rosą szybciej i mają lepiej wykształconą sieć naczyń włosowatych niż komórki TP-. Aktywność angiogenna PD-ECGF, według autorów, jest głównym powodem tego, iż w guzach TP+ komórki nowotworowe ulegają apoptozie w znikomym stopniu [17].

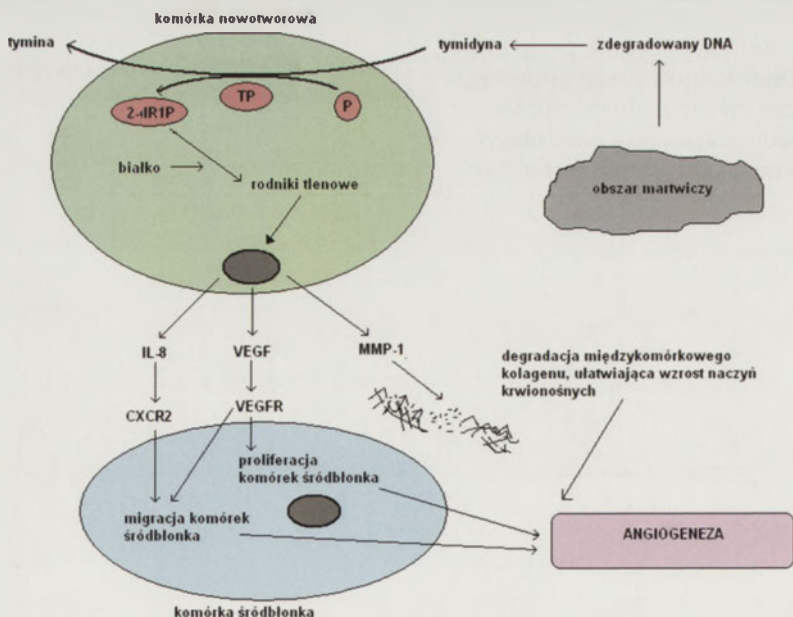
Kluczowym regulatorem angiogenezy wydaje się być VEGF. Czynnik ten jest indukowany przez hipoksję oraz niedobór glukozy. Badania wykazały, że ekspresja mRNA VEGF w endometrium wzrasta podczas fazy wydzielniczej cyklu miesięczkowego, natomiast maleje pod koniec fazy proliferacyjnej oraz w fazie wydzielniczej. Świadczyć to może o wpływie hormonów jajnikowych na poziom VEGF. Zaobserwowany został dodatkowo związek między VEGF

a PD-ECGF i dlatego naukowcy zasugerowali synergistyczne oddziaływanie między tymi czynnikami [18]. W komórkach prawidłowych PD-ECGF indukuje magazynowanie VEGF. Funkcjonalne połączenie między czynnikami zaobserwowano również w komórkach nowotworowych, gdzie PD-ECGF jako TP indukuje stres oksydacyjny i powoduje wydzielanie VEGF [10,19]. Istnieją prace świadczące o tym, że VEGF oraz PD-ECGF są jednymi z najsilniej działających czynników angiogennych [17,20-22]. Manipulowanie tymi czynnikami może okazać się skuteczną metodą w anty-angiogennej terapii przeciwnowotworowej. Terapia ta może być efektywna dla większego spektrum guzów, wywołując mniej skutków ubocznych oraz w znacznie mniejszym stopniu powodować pojawienie się komórek nowotworowych odpornych na leki przeciwnowotworowe [17]. Dokładniej, sposób w który PD-ECGF poprzez swoją aktywność katalityczną skierowaną w kierunku rozkładu tymidyny promuje angiogenezę poprzez pobudzanie komórek nowotworowych do wydzielania innych czynników wpływających bezpośrednio na wzrost naczyń krwionośnych przedstawiono na rycinie 2.

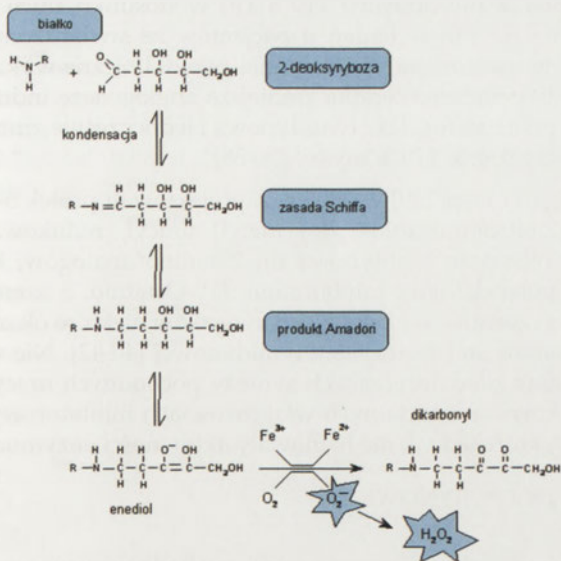
UDZIAŁ 2'-DEOKSYRYBOZYLO-1-FOSFORANU, BEZPOŚREDNIEGO PRODUKTU KATALIZY FOSFORYLASY TYMIDYNOWEJ W PROCESIE ANGIOGENEZY

Brown i wsp. [10] zasugerowali, że fosforylaza tymidynowa obecna w komórkach nowotworowych indukuje w nich stres oksydacyjny, pod wpływem którego komórki te wydzielają, czułe na obecność rodników tlenowych, czynniki angiogenne. (Ryc. 2.) Stwierdzili oni, że dodatek tymidyny do linii komórkowej z nadekspresją TP wywołuje komórkowy stres oksydacyjny. Stres ten prawdopodobnie wywołany jest przez jeden z produktów katabolizmu tymidyny, którym jest 2'-deoksyrybozylo-1-fosforan (2-dR1P). Jak dotychczas nie ma na to bezpośrednich dowodów, jednak cukry redukujące mają zdolność generowania wolnych

rodników tlenowych. Na przykład, produkcja wolnych rodników w wyniku oksydacji glukozy, mająca miejsce podczas hiperglikemii, powoduje szereg powikłań. Jest przyczyną wielu zaburzeń metabolizmu i powoduje uszkodzenie małych naczyń krwionośnych (mikroangiopatię) oraz dużych tętnic (makroangiopatię). Prowadzi również do uszkodzenia struktury DNA komórek śródbłonka, powodując zaburzenia w replikacji i dojrzewaniu tych komórek. Spowodowane to jest faktem, iż zredukowane monosacharydy występują jako zamknięte pierścienie hemiacetalowe w równowadze z otwartym łańcuchem aldehydowym. Przyłączenie białka do formy aldehydowej następuje w wyniku serii reakcji, w których nie biorą udziału enzymy. 2-dDDR i 2-dR1P mają największy odsetek cząsteczek w formie łańcuchowej, dzięki czemu klasyfikuje się je jako jedne z najsilniejszych generatorów wolnych rodników [10] (Ryc. 3).



Rycina 2. Schemat działania angiogenego fosforylasy tymidynowej zaproponowany przez Brown i wsp. [10], zmodyfikowany. VEGFR - receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyń; CXCR2 - receptor IL-8; 2'-dR1P - 2-deoksyrybozylo-1-fosforan.



Rycina 3. Schemat generowania wolnych rodników przez cukry redukujące wg. Browna i wsp. [10], zmodyfikowany.

Katabolizm tymidyny pod wpływem fosforylasy tymidynowej zwiększa wydzielanie IL-8, VEGF oraz MMP-1, trzech czynników, których wydzielanie następuje pod wpływem stresu oksydacyjnego. IL-8 oraz VEGF są bezpośrednimi i silnie działającymi czynnikami angiogennymi. Wydzielanie MMP-1 przez komórki śródbłonnka towarzyszy angiogenezie *in vivo*, z czego wynika, że również wydzielanie MMP-1 przez komórki nowotworowe ułatwia wzrost naczyń krwionośnych w guzach. Zarówno tymina, jak i inhibitory fosforylasy tymidynowej zapobiegają indukcji tych trzech czynników. Dlatego też autorzy pracy sądzą, że 2-dR1P jest niezbędny do wywołania tej odpowiedzi. Wyniki przez nich otrzymane pozwalają zasugerować, że IL-8, VEGF oraz MMP-1 są odpowiedzialne za aktywność angiogenną fosforylasy tymidynowej *in vivo* [10].

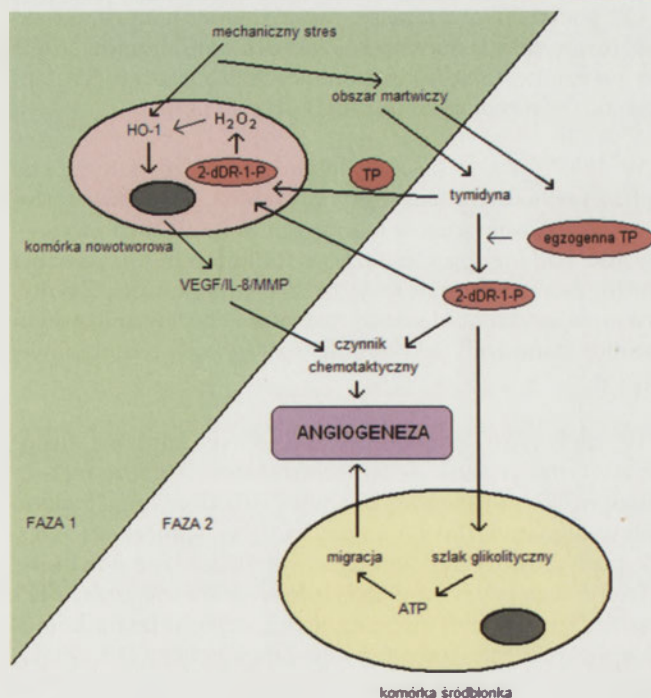
Sengupta i wsp. [12] przeprowadzili również doświadczenia mające na celu zbadanie wpływu fosforylasy tymidynowej na angiogenezę w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Zaproponowali model działania enzymu przedstawiony na rycinie 4. Ich badania wykazały, że fosforylaza tymidynowa nie powoduje wzrostu proliferacji komórek śródbłonnka, natomiast VEGF silnie ją indukuje. Biorąc pod uwagę fakt, iż komórki śródbłonnka podczas procesu naprawy uszkodzeń wymagają składników indukujących zarówno migrację, jak i proliferację, można zasugerować, że odpowiedzią komórek śródbłonnka na działanie fosforylasy jest ich migracja [12]. Badania Sholley'a i wsp. [13] dowiodły, że to właśnie migracja, a nie proliferacja komórek śródbłonnka jest istotą angiogenezy, natomiast Moghaddam'a i wsp. [23] w warunkach *in vitro* wykazały dodatkowo, iż enzym ten posiada zdolność stymulacji migracji komórek śródbłonnka tylko w obecności tymidyny w medium. Na tej podstawie stwierdzają oni, iż enzymatyczna aktywność fosforylasy jest istotą angiogenną aktywności tego enzymu.

Według schematu działania angiogennego fosforylasy tymidynowej (Ryc. 4) mechaniczne uszkodzenie komórek może uaktywnić w niej mechanizm prowadzący do jej

śmierci, co w rezultacie powoduje uwolnienie tymidyny z mikrośrodowiska. Tymidyna może przenikać do żywych komórek nowotworowych, gdzie jest katabolizowana przez enzym do 2-dR1P, który z kolei ulega defosforylacji do 2-dDR. Wewnątrz komórki nowotworowej (faza 1) zredukowane cukry ulegają szeregowi reakcji, prowadzących do powstania wolnych rodników i wpływają na oksygenazę hemową (HO-1), co wiąże się z uwolnieniem czynników angiogennych. Czynniki te działają na komórki śródbłonnka, indukując angiogenezę *in vivo*. Dodatkowo, enzym uwolniony z uszkodzonych komórek lub pochodzenia egzogenne (faza 2) może działać na tymidynę i prowadzić do powstania 2-dR1P, który wykazuje właściwości chemotaktyczne i indukuje angiogenezę. 2-dDR przenika do komórek i może zostać włączona w cykl przemian glikolitycznych, podczas których dochodzi do wytworzenia energii, wykorzystywanej przez komórki podczas migracji. Zaobserwowano również, że dodatek do medium tymidyny może znieść działanie angiogenną fosforylasy tymidynowej, które z kolei może być przywrócone poprzez dodatek 2-dR1P [12].

Liekens i wsp. [24] zaproponowali podobny schemat działania fosforylasy tymidynowej do opisanych powyżej, uwzględniając na nim dodatkowo bezpośredni wpływ 2-dDR na integriny indukujące migrację komórek śródbłonnka. W swojej pracy podkreślili, że PD-ECGF/TP jest celem terapii rakowej, biorąc również pod uwagę wpływ enzymu na metabolizm cytostatyków fluoropirymidynowych.

Nakajima i wsp. [25] zebrali dotychczasowe wiadomości dotyczące 2-dDR jako mediatora fosforylasy tymidynowej w regulacji angiogenezy i progresji guza i przedstawili znaczenie jej inhibitorów w chemioterapii różnych guzów.



Rycina 4. Schemat działania angiogennego fosforylasy tymidynowej zaproponowany przez Sengupta i wsp. [12], zmodyfikowany. Faza 1 - działanie fosforylasy tymidynowej na komórki nowotworowe. Faza 2 - działanie fosforylasy tymidynowej na komórki śródbłonnka.

Fosforylaza tymidynowa uważana jest obecnie za jeden z głównych obiektów badań w terapii rakowej [26-30].

INHIBITORY FOSFORYLAZY TYMIDYNOWEJ

Inhibitory fosforylazy tymidynowej poszukiwane są intensywnie od momentu utożsamienia tego enzymu z płytkopochodnym czynnikiem wzrostu komórek śródbłonna. Fosforylaza tymidynowa katalizuje w guzach rozkład tymidyny do tyminy i 2-deoksyrybozylo-1-fosforanu (Ryc. 1). Syntetyzowane są analogi tymidyny, jak również izolowane są z roślin związki glikozydowe jako analogi deoksyrybozy, które spełniają funkcję inhibitorów kompetycyjnych enzymu. Na podstawie zbadanej krystalicznej struktury cząsteczki enzymu, projektuje się również związki, które hamują aktywność enzymu w sposób niekompetycyjny.

Jednakże użycie tych związków jako czynników przeciwnowotworowych ma wiele wad, ponieważ hamują one aktywność fosforylazy bezpośrednio. Hamowanie enzymu może doprowadzić do wzrostu stężenia tymidyny w osoczu, co jest toksyczne. Nishino i wsp. [31] stwierdzili, że pacjenci z mitochondrialną encefalopatią, którzy mają bardzo niską ekspresję fosforylazy tymidynowej w osoczu wywołaną mutacją w genie kodującym fosforylazę tymidynową, wykazują patologiczne zmiany w mózgu oraz mięśniach wywołanych uszkodzeniem mitochondriów [31].

Obecnie żaden inhibitor fosforylazy tymidynowej nie jest zatwierdzony do użytku klinicznego, choć pewne leki zawierające inhibitory tego enzymu były testowane przedklinicznie i klinicznie [32].

ANALOGI PIRYMIDYNOWE

Od ponad 30 lat znane są związki, które hamują aktywność fosforylazy tymidynowej. Jest to 6-aminotymina (6AT) i jej pochodne, takie jak 6-amino-5-chlorouracyl (6A5CU) i 6-amino-5-bromouracyl (6A5BU) (Ryc. 5) [33].

W 1997 roku w naszym laboratorium zbadany został wpływ pochodnych pirymidynowych na aktywność fosforylazy w cytosolu guzów łagodnych (mięśniakach macicy). Spośród badanej puli związków inhibitorem enzymu był 5-nitrouuracyl, 5-bromouracyl oraz 6-aminouracyl. Zsyntetyzowane acyklonukleozydy również, choć w mniejszym stopniu, hamowały aktywność fosforylazy tymidynowej [34].

W 1999 roku zsyntetyzowano nowy inhibitor fosforylazy tymidynowej – chlorowodorek 5-chloro-6-[1-(2-iminopirolidyno) metylo] uracylu (TPI) (Ryc. 5). Zbadano wpływ tego związku na angiogenezę w komórkach z nadekspresją fosforylazy tymidynowej. Badania te dowiodły, że fosforylaza odgrywa ważną rolę we wzroście guza, a TPI ogranicza ten wzrost poprzez zwiększenie udziału komórek apoptycznych i zahamowanie angiogenezy [15]. Związek ten okazał się 1000 razy bardziej aktywny niż 6-amino-5-chlorouracyl, jeden z najsilniejszych dotychczas znanych inhibitorów [35]. W oparciu o te dane uwzględniono TPI w połączonej terapii z trzyfluorotymidyną (TFT), która jest szybko inaktywowana przez fosforylazę tymidynową. TAS-

102 (podawany doustnie TFT i TPI w stosunku 1:0,5) jest oceniany w I fazie badań u pacjentów ze stwierdzonymi różnymi guzami stałymi. Badania przedkliniczne wykazały, że ta połączona terapia zmniejsza angiogenezę indukowaną przez fosforylazę tymidynową i jednocześnie zmniejsza toksyczność TFT u myszy [36-38].

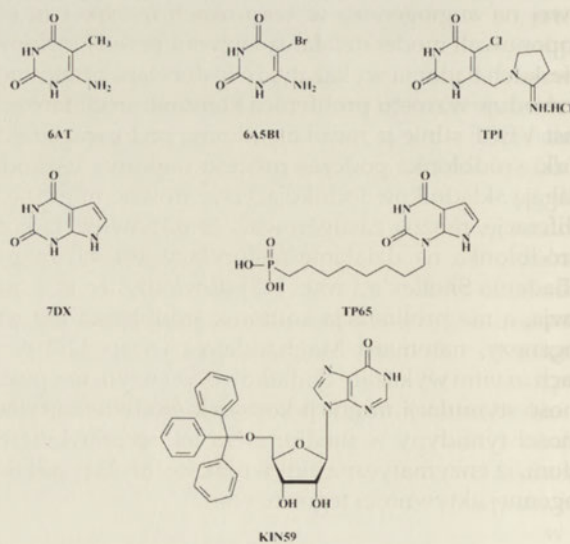
Reigan i wsp. [39] w 2005 r. zaprojektowali prolek 5-halo-6-[(2'-nitroimidazolo-1'yl) metyl] uracyl, redukowany przez oksydazę ksantynową do 2'-amino analogów, które są potencjalnymi inhibitorami TP. Ostatnio, z szeregu zsyntetyzowanych i zbadanych związków niektóre okazały się inhibitorami fosforylazy tymidynowej [40-42]. Nie wymieniamy prac dotyczących syntezy pochodnych uracylu, związków o potencjalnych właściwościach inhibitorowych dla TP, które jednak nie hamowały aktywności enzymu.

ANALOGI PURYNOWE

Do zaprojektowania pierwszej pochodnej purynowej z aktywnością inhibitorową wobec TP, którą nazwano 7DX, użyto modelu cząsteczki enzymu. 7DX może być uważana jako pirymidyna (6-aminotymina), do której dodano drugi pierścień, aby utworzyć stabilne, wzajemnie oddziaływanie z enzymem (Ryc. 5). Aktywność inhibitorowa tak otrzymanego związku była porównywana z 6-aminotyminą [32].

Następnie, na podstawie krystalicznej struktury cząsteczki fosforylazy tymidynowej *E. coli*, zaprojektowano inhibitor fosforylazy tymidynowej o nazwie TP65 (Ryc. 5), który w miejsce tyminy zawiera 7DX i łańcuch węglowy odpowiedni do struktury fosforylazy tymidynowej. TP65 hamuje indukowane przez enzym tworzenie mikronaczyń przez agregację komórek śródbłonna [32,43].

W 2006 roku zsyntetyzowano nowy inhibitor fosforylazy tymidynowej, 5'-O-propyloinozynę (KIN59) (Ryc. 5). Hamuje on aktywność enzymu pochodzącego z komórek człowieka jak i z bakterii. KIN59 nie wykazuje kompetycji w stosunku do tymidyny oraz fosforanu nieorganicznego. Ba-



Rycina 5. Wzory strukturalne wybranych inhibitorów fosforylazy tymidynowej [24]. Symbole pod wzorami objaśnione są w tekście.

daniami mogą zasugerować istnienie allosterycznego centrum aktywnego enzymu. Okazało się także, że KIN59 całkowicie hamuje odpowiedź angiogenną komórek. Jednak sama inozyna nie ma właściwości hamujących aktywności TP oraz angiogenezy wywołanej przez enzym i dlatego wydaje się, że kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za efekt hamujący jest grupa 5'-O-propylowa [44].

Casanova i wsp. [45] poddali modyfikacji inhibitor KIN59. Zsyntetyzowali serię nukleozydowych analogów podstawionych w pozycji 1, 2 i 6 pierścienia purynowego oraz 5'-rybozy. Okazało się, że włączenie grupy cyklopropylometylowej lub cykloheksanometylowej w pozycję N(1) 5'-O-propyloinozyny zwiększa hamowanie w stosunku do KIN59 dziesięciokrotnie. Wydaje się, że grupa propylowa w pozycji 5' rybozy jest kluczowym elementem dla hamowania enzymu. Przedstawione wyniki mogą sugerować, że 5'-O-propylonukleozydy stanowią nową klasę inhibitorów TP [45].

2-DEOKSY-L-RYBOZA

Stwierdzono również, że 2-deoksy-L-ryboza (2-dLR) stereoisomer 2-dDR może tłumić antyapoptyczny efekt izomeru D i ograniczać wzrost komórek z nadprodukcją TP. 2-dLR hamuje angiogenezę, wzrost guza oraz przerzuty wywołane przez fosforylaze tymidynową. Mechanizm hamowania jest jednak nadal niejasny [46].

ZWIĄZKI GLIKOZYDOWE ROŚLINNE

W 2004 roku wyizolowano pewne związki glikozydowe z kory drzewa *Symplocos racemosa*, które *in vitro* hamują aktywność fosforylazy tymidynowej [47]. W bieżącym roku zbadano ich kinetykę hamowania i stwierdzono, że związki te są niekompetycyjnymi inhibitorami fosforylazy tymidynowej i hamują migrację komórek śródbłonna [48].

PODSUMOWANIE

Choć mechanizm działania fosforylazy tymidynowej (płytkopochodnego czynnika wzrostu komórek śródbłonna) na angiogenezę pozostaje do końca nie wyjaśniony, to udowodniono, że 2-deoksy-D-ryboza, produkt działania enzymatycznego tego białka, wywołuje komórkowy stres oksydacyjny, co generuje powstawanie wolnych rodników i promuje wydzielanie czynników angiogennych. Poszukiwanie inhibitorów tej aktywności enzymatycznej wydaje się być jednym z głównych obiektów terapii rakowej.

PIŚMIENNICTWO

1. Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI (1999) Thymidine phosphorylase expression in endometrial carcinomas. *Clin Exp Metastasis* 17: 445-450
2. Avraham Y, Grossowicz N, Yashphe J (1990) Purification and characterization of uridine and thymidine phosphorylase from *Lactobacillus casei*. *Biochim Biophys Acta* 1040: 287-293
3. Walter MR, Cook WJ, Cole LB, Short SA, Koszalka GW, Krenitsky TA, Ealick SE (1990) Three-dimensional structure of thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* at 2.8 Å resolution. *J Biol Chem* 265: 14016-14022
4. Iltzsch MH, el Kouni MH, Cha S (1985) Kinetic studies of thymidine phosphorylase from mouse liver. *Biochemistry* 24: 6799-6807

5. Desgranges C, Razaka G, Rabaud M, Bricaud H (1981) Catabolism of thymidine in human blood platelets: purification and properties of thymidine phosphorylase. *Biochim Biophys Acta* 654: 211-218
6. Focher F, Spadari S (2001) Thymidine phosphorylase: a two-face Janus in anticancer chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets* 1: 141-153
7. Sumizawa T, Furukawa T (1993) Thymidine phosphorylase activity associated with platelet-derived endothelial cell growth factor. *J Biochem* 114: 9-11
8. Miszczak-Zaborska E, Kubiak R, Bienkiewicz A, Bartkowiak J (2008) The cytosol activity of thymidine phosphorylase in endometrial cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 5: 27-64
9. Miszczak-Zaborska E, Smolarek M, Dramiński M, Kubiak R, Józwiak B, Bartkowiak J (2009) Influence of the selected pyrimidine compounds on the activity of thymidine phosphorylase from normal and tumor endometrial cells. *J Ginekol Pol* 80: 590-595
10. Brown NS, Jones A, Fujiyama C, Harris AL, Bicknell R (2000) Thymidine phosphorylase induces carcinoma cell oxidative stress and promotes secretion of angiogenic factors. *Cancer Res* 60: 6298-6302
11. Ikeda R, Tajitsu Y, Iwashita K, Che XF, Yoshida K, Ushiyama M, Furukawa T, Komatsu M, Yamaguchi T, Shibayama Y, Yamamoto M, Zhao HY, Arima J, Takeda Y, Akiyama S, Yamada K (2008) Thymidine phosphorylase inhibits the expression of proapoptotic protein BNIP3. *Biochem Biophys Res Commun* 370: 220-224
12. Sengupta S, Sellers LA, Matheson HB, Fan TP (2003) Thymidine phosphorylase induces angiogenesis *in vivo* and *in vitro*: an evaluation of possible mechanisms. *Br J Pharmacol* 139: 219-231
13. Sholley MM, Ferguson GP, Seibel HR, Montour JL, Wilson JD (1984) Mechanisms of neovascularization. Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. *Lab Invest* 51: 624-634
14. Iruela-Arispe ML, Porter P, Bornstein P, Sage EH (1996) Thrombospondin-1, an inhibitor of angiogenesis, is regulated by progesterone in the human endometrium. *J Clin Invest* 97: 403-412
15. Matsushita S, Nitanda T, Furukawa T, Sumizawa T (1999) The effect of a thymidine phosphorylase inhibitor on angiogenesis and apoptosis in tumors. *Cancer Res* 59: 1911-1916
16. Folkman J (1972) Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 175: 409-416
17. Zhu GH, Lenzi M, Schwartz EL (2002) The Sp1 transcription factor contributes to the tumor necrosis factor-induced expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase in human colon carcinoma cells. *Oncogene* 21: 8477-8485
18. Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18: 4-25
19. Zhang L, Mackenzie IZ, Rees MC, Bicknell R (1997) Regulation of the expression of the angiogenic enzyme platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in endometrial isolates by ovarian steroids and cytokines. *Endocrinology* 138: 4921-4930
20. Nakamoto RH, Uetake H, Iida S, Kolev YV, Soumaoro LT, Takagi Y, Yasuno M, Sugihara K (2007) Correlations between cyclooxygenase-2 expression and angiogenic factors in primary tumors and liver metastases in colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 37: 679-685
21. Fujimoto J (2008) Novel therapeutic strategy for uterine endometrial cancers. *Int J Clin Oncol* 13: 411-415
22. Nagaoka H, Iino Y, Takei H, Morishita Y (1998) Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in macrophages correlates with tumor angiogenesis and prognosis in invasive breast cancer. *Int J Oncol* 13: 449-454
23. Moghaddam A, Zhang HT, Fan TP, Hu DE, Lees VC, Turley H, Fox SB, Gatter KC, Harris AL, Bicknell R (1995) Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 998-1002
24. Liekens S, Bronckaers A, Pérez-Pérez MJ, Balzarini J (2007) Targeting platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 74: 1555-1567
25. Nakajima Y, Madhyastha R, Maruyama M (2009) 2-Deoxy-D-ribose, a downstream mediator of thymidine phosphorylase, regulates tumor

- angiogenesis and progression. *Anticancer Agents Med Chem* 9: 239-245
26. Peters GJ, Bijnsdorp IV, Fukushima M (2008) Thymidine phosphorylase as a target for antiangiogenesis treatment. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 52: 629
 27. Bijnsdorp IV, de Bruin M, Laan AC, Fukushima M, Peters GJ (2008) The role of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in tumor behavior. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27: 681-691
 28. Bronckaers A, Balzarini J, Liekens S (2008) The cytostatic activity of pyrimidine nucleosides is strongly modulated by *Mycoplasma hyorhinis* infection: Implications for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 76: 188-197
 29. Yu EJ, Lee Y, Rha SY, Kim TS, Chung HC, Oh BK, Yang WI, Noh SH, Jeung HC (2008) Angiogenic factor thymidine phosphorylase increases cancer cell invasion activity in patients with gastric adenocarcinoma. *Mol Cancer Res* 6: 1554-1566
 30. Liekens S (2008) Regulation of cancer progression by inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis. *Verh K Acad Geneesk Belg* 70: 175-181
 31. Nishino I, Spinazzola A, Papadimitriou A (2000) Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: an autosomal recessive disorder due to thymidine phosphorylase mutations. *Ann Neurol* 47: 792-800
 32. Pérez-Pérez MJ, Priego EM, Hernández AI, Camarasa MJ, Balzarini J, Liekens S (2005) Thymidine phosphorylase inhibitors: recent developments and potential therapeutic applications. *Mini Rev Med Chem* 5: 1113-1123
 33. Langen P, Etzold G, Bärwolff D, Preussel B (1967) Inhibition of thymidine phosphorylase by 6-aminothymine and derivatives of 6-aminouracil. *Biochem Pharmacol* 16: 1833-1837
 34. Miszczak-Zaborska E, Wozniak K (1997) The activity of thymidine phosphorylase obtained from human uterine leiomyomas and studied in the presence of pyrimidine derivatives. *Z Naturforsch* 52: 670-675
 35. Takao A, Akiyama SI, Nakajo A, Yoh H, Kitazono M, Natsugoe S, Miyadera K, Fukushima M, Yamada Y, Aikou T (2000) Suppression of metastasis by thymidine phosphorylase inhibitor. *Cancer Res* 60: 5345-5348
 36. Emura T, Suzuki N, Fujioka A, Ohshimo H, Fukushima M (2005) Potentiation of the antitumor activity of alpha, alpha, alpha-trifluorothymidine by the co-administration of an inhibitor of thymidine phosphorylase at a suitable molar ratio in vivo. *Int J Oncol* 27: 449-455
 37. Overman MJ, Kopetz S, Varadhachary G, Fukushima M, Kuwata K, Mita A, Wolff RA, Hoff P, Xiong H, Abbruzzese JL (2008) Phase I clinical study of three times a day oral administration of TAS-102 in patients with solid tumors. *Cancer Invest* 26: 794-799
 38. Hong DS, Abbruzzese JL, Bogaard K, Lassere Y, Fukushima M, Mita A, Kuwata K, Hoff PM (2006) Phase I study to determine the safety and pharmacokinetics of oral administration of TAS-102 in patients with solid tumors. *Cancer* 107: 1383-1390
 39. Reigan P, Edwards PN, Gbaj A, Cole C, Barry ST, Page KM, Ashton SE, Luke RW, Douglas KT, Stratford IJ, Jaffar M, Bryce RA, Freeman S (2005) Aminoimidazolymethyluracil analogues as potent inhibitors of thymidine phosphorylase and their bioreductive nitroimidazolyl prodrugs. *J Med Chem* 48: 392-402
 40. Panova N, Kosiová I, Petrová M, Vaněk V, Liboska R, Kovacková S, Kocalka P, Králíková S, Tocič Z, Páv O, Paces O, Rejman D, Rosenberg I (2008) Nucleoside phosphonic acids in thymidine phosphorylase inhibition: structure-activity relationship. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 52: 665-666
 41. Pomeisl K, Holý A, Votruba I (2008) Pyrimidine acyclic nucleoside phosphonates and phosphorylated analogs. Part 2. Syntheses and investigation of their inhibitory effects towards human thymidine phosphorylase. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 52: 657-658
 42. Khan KM, Ambreen N, Hussain S, Perveen S, Choudhary MI (2009) Schiff bases of 3-formylchromone as thymidine phosphorylase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 17: 2983-2988
 43. Esteban-Gamboa A, Balzarini J, Esnouf R, De Clercq E, Camarasa MJ, Pérez-Pérez MJ (2000) Design, synthesis, and enzymatic evaluation of multisubstrate analogue inhibitors of *Escherichia coli* thymidine phosphorylase. *J Med Chem* 43: 971-983
 44. Liekens S, Balzarini J, Hernandez AI, De Clercq E, Priego EM, Camarasa MJ, Perez-Perez MJ (2006) Thymidine phosphorylase is noncompetitively inhibited by 5'-O-trityl-inosine (KIN59) and related compounds. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 25: 975-980
 45. Casanova E, Hernandez AI, Priego EM, Liekens S, Camarasa MJ, Balzarini J, Perez-Perez MJ (2006) 5'-O-trityl-inosine and analogues as allosteric inhibitors of human thymidine phosphorylase. *J Med Chem* 49: 5562-5570
 46. Akiyama S, Furukawa T, Sumizawa T, Takebayashi Y, Nakajima Y, Shimaoka S (2004) The role of thymidine phosphorylase, an angiogenic enzyme, in tumor progression. *Cancer Sci* 95: 851-857
 47. Abbasi MA, Ahmad VU, Zubair M, Fatima N, Farooq U, Hussain S, Lodhi MA, Choudhary MI (2004) Phosphodiesterase and thymidine phosphorylase-inhibiting salirepin derivatives from *Symplocos racemosa*. *Planta Med* 70: 1189-1194
 48. Hussain S, Gaffney J, Ahmed N, Slevin M, Iqbal Choudhary M, Ahmad VU, Qasmi Z, Abbasi MA (2009) An investigation of the kinetic and anti-angiogenic properties of plant glycoside inhibitors of thymidine phosphorylase. *J Asian Nat Prod Res* 11: 159-167

Influence of the thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) on tumor angiogenesis. Catalytic activity of enzyme inhibitors

Elżbieta Miszczak-Zaborska[✉], Monika Smolarek, Jacek Bartkowiak

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

[✉]e-mail: zaborska@zdn.umed.lodz.pl

Key words: thymidine phosphorylase, the platelet derived-endothelial cell growth factor, inhibitors, angiogenesis

ABSTRACT

Thymidine phosphorylase, also known as platelet-derived endothelial cell growth factor, is a potent angiogenic factor. Thymidine phosphorylase is overexpressed in various human tumors and plays an important role in angiogenesis. A novel inhibitor of thymidine phosphorylase (TP), 5-chloro-6-[1-(2-iminopyrrolidinyl) methyl] uracil hydrochloride (TPI) is about 1000-fold more active than 6-amino-5-chlorouracil, one of the most potent TP inhibitors to 1999 year. Thymidine phosphorylase is also inhibited by 5'-O-trityl-inosine (KIN59) and related compounds, 2-deoxy-L-ribose and glycosides isolated from the bark of *Symplocos racemosa*.

STRESZCZENIE

Przedsięwzięcia nakierowane na sekwencjonowanie całych genomów wraz z rozwojem informatyki umożliwiają odtwarzanie ewolucji układu krzepnięcia krwi z zastosowaniem metod bioinformatycznych. Na tej podstawie można stwierdzić, że system kontaktu krzepnięcia krwi wydaje się być ewolucyjnie młody, ukształtowany w pełni dopiero przed rozejściem się ssaków łóżyskowych i torbaczy. Płazy, ptaki i dziobaki posiadają pojedynczy gen odpowiadający przodkowi czynnika XI i prekalikreiny. Opos ma zarówno prekalikreinę osoczną, jak i czynnik XI, podobnie jak ssaki łóżyskowe. Czynnik XII pojawia się po raz pierwszy u płazów, jest obecny zarówno u dziobaka, jak i oposa, ale brak go u kury, prawdopodobnie wskutek utraty genu w linii prowadzącej do ptaków. Niedawne odkrycia przywróciły zainteresowanie wewnątrzpochodnym torem krzepnięcia krwi, gdy stwierdzono, że myszy z wyłączonym genem czynnika XII są chronione przed formowaniem się indukowanych doświadczalnie zakrzepów, nie wykazując jednocześnie zmian w obrębie parametrów prawidłowego krzepnięcia krwi. Proteazy kontaktu mogą być celem działania nowych leków przeciwzakrzepowych.

WPROWADZENIE

Krzepnięcie krwi i zachowanie jej płynności określane są łącznie mianem hemostazy. Hemostazę można podzielić na starszą ewolucyjnie hemostazę pierwotną – z udziałem komórek (płytek krwi u ssaków, trombocytów u pozostałych kręgowców) i wtórną – z udziałem białek krzepnięcia i fibrylizy [1]. Oddziaływanie pomiędzy wyspecjalizowanymi komórkami a czynnikami krzepnięcia prowadzi do utworzenia czopu hemostatycznego, blokującego wypływ krwi w miejscu uszkodzenia. Rolą równoważenia krzepnięcia, przywracania i utrzymania prawidłowej płynności krwi i nie dopuszczenia do zablokowania naczyń krwionośnych odgrywa układ fibrylizy [2].

Pojawienie się kaskadowego mechanizmu krzepnięcia krwi jest niezwykłym osiągnięciem ewolucyjnym kręgowców, które umożliwiło skuteczną ochronę przed utratą płynów ciała oraz obronę przed wnikaniem patogenów [3]. Poczynając od gromady kręgowców, a kończąc na ssakach, krzepnięcie krwi zachodzi gdy proteaza serynowa trombina (T) przekształca rozpuszczalny fibrynogen (Fg) w nierozpuszczalną fibrynę (Fb) [4]. Sama trombina jest produktem proteolitycznego przekształcenia protrombiny (PT), co możliwe jest po aktywacji kaskady czynników krzepnięcia.

Obecność trombiny i jej aktywację przez proteazy serynowe zależne od witaminy K, stabilizację fibrynogenu przez czynnik XIII (FXIII) oraz fibrylizę stwierdzono już nawet u bezzuchwoców – najbardziej prymitywnych przedstawicieli kręgowców [5]. Mechanizmów takich brak jest u strunowców, takich jak lancetnik czy żachwa, oraz u bezkręgowców [6].

W jaki sposób doszło do powstania tak niezwykłego układu kontroli płynności i zestalania krwi u kręgowców? Złożoność mechanizmów hemostazy próbowano wykorzystywać jako dowód fałszywości ewolucji biologicznej, jednakże kiedy różnorodne sekwencje białek i DNA stały się szerzej dostępne, to właśnie ewolucja molekularna dostarczyła mocnych dowodów na to, że ten niezwykle skomplikowany układ nie pojawił się *ex nihilo* w wyniku jednorazowego aktu kreacji [3]. Wiele białek hemostazy, zarówno tych odpowiadających za krzepnięcie, jak i takich których rola polega na przeciwdziałaniu zakrzepom, wykazuje pewne podobne cechy świadczące o ich wspólnym rodowodzie. Cały układ wydaje się być efektem serii duplikacji, mutacji i tasowania domen w obrębie genomu przodków współcześnie istniejących gromad kręgowców zachodzących w czasie około 450 mln lat [7]. Rola czynnika tkankowego (TF) i czynnika VII (FVII) sięga już samych początków ewolucji kręgowców, gdyż ich występowanie stwierdzono u minoga, u którego zarazem występuje tylko jedna proteaza

Michał Błazej Ponczek[✉]

Katedra Biochemii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź

[✉]Katedra Biochemii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237, Łódź; tel.: (42) 635 44 82, faks: (42) 635 44 84, e-mail: mponczek@biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 20 maja 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 18 sierpnia 2009 r.

Słowa kluczowe: ewolucja molekularna, prekalikreina osocza, czynnik XI, czynnik XII, hemostaza, bioinformatyka

Wykaz skrótów: AT3 – antytrombina III; EGF (ang. *epidermal growth factor*) – czynnik wzrostu naskórka; FV, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII – czynniki krzepnięcia krwi, odpowiednio od V do XII; Fb – fibryna; Fg – fibrynogen; FL – fosfolipidy; GLA – domena proteazowa, zawierająca liczne reszty kwasu γ -glutaminowego; HC2 – kofaktor heparyny II; HDS – triada katalityczna histydyna, asparaginan i seryna; HGF – czynnik wzrostu hepatocytów; HGFA – aktywator czynnika wzrostu hepatocytów; KO – kalikreina osocza; PAI-1 (ang. *plasminogen activator inhibitor 1*) – inhibitor 1 aktywatora plazminogenu; PAI-2 (ang. *plasminogen activator inhibitor 2*) – inhibitor 2 aktywatora plazminogenu; PAN – domena jabłkowa; PK – prekalikreina osocza; PC – białko C; Plg – plazminogen; Pln – plazmina; PS – białko S; PT – protrombina; PZ – białko Z; SP – domena proteazowa; u-PA – aktywator plazminogenu typu urokinazowego; T – trombina; TF – czynnik tkankowy; t-PA – aktywator plazminogenu typu tkankowego; WK – wielkocząsteczkowy kininogen

Podziękowania: Praca powstała jako rezultat programu stypendialnego Europejskiej Organizacji Biologii Molekularnej (ang. *EMBO Short-Term Fellowship*) ASTF 83.00-2008.

do czynników kontaktu, które zapoczątkowują wewnątrz-pochodny tor krzepnięcia krwi. Aktywny FXII (FXIIa) ma zdolność przekształcania prekalikreiny osoczowej w kalikreinę (KO) i aktywowania FXI, a ten może przekształcać FIX w FIXa, prowadząc dalej do powstawania kompleksu tenazy. Okazuje się jednak, że FXII nie jest niezbędny do zainicjowania krzepnięcia, a osoby wykazujące jego brak mogą nie wykazywać szczególnych objawów klinicznych zaburzeń krzepnięcia, jak w przypadku pacjenta Johna Hagemana, od którego pochodzi alternatywna nazwa tego białka [19]. FXIIa ma zdolność konwersji plazminogenu w plazminę, odgrywając w ten sposób rolę w zapoczątkowaniu fibrynolizy [20]. Prekalikreina osoczowa i FXI również mogą bezpośrednio aktywować plazminogen [21,22]. Poza czynnikami kontaktu, plazminogen jest aktywowany do plazminy przede wszystkim przez uwalniane ze śródbłonna aktywatorów typu tkankowego (t-PA) i urokinazowego (u-PA). W warunkach fizjologicznych ten mechanizm ma większe znaczenie niż aktywacja poprzez czynniki kontaktu. Głównym inhibitorem plazminy jest α 2-antypłazmina. Aktywatory plazminy hamowane są przez inhibitory (PAI-1, PAI-2) [23].

Kalikeina może zwrotnie aktywować FXII, a FXIIa może słabo bezpośrednio aktywować FIX, ale ten mechanizm nie ma istotnego znaczenia fizjologicznego. Aktywacja czynników kontaktu nie tylko odgrywa pomocniczą rolę w aktywacji krzepnięcia krwi, lecz także rozpoczyna aktywację fibrynolizy, układu dopełniacza i przede wszystkim kininogenezy. Stwierdzono, że aktywacja poprzez czynniki kontaktu jest istotna w powstawaniu skrzeplin w różnych stanach patologicznych, jednakże w warunkach fizjologicznych zapoczątkowanie krzepnięcia krwi *in vivo* nie wymaga udziału układu związanego z aktywacją FXII, ponieważ aktywacja krzepnięcia jest wtedy zdominowana przez układ zależny od uwalniania czynnika tkankowego i aktywacji FVII [19]. FXII może odgrywać rolę w powstawaniu zakrzepów wewnątrz naczyń krwionośnych żywego organizmu, ponieważ wyłączenie genu dla tego białka u myszy chroni przed sztucznie indukowaną zakrzepicą, nie wpływając na parametry prawidłowego krzepnięcia krwi [24,25]. Mógłby to być cel działania nowych leków przeciwzakrzepowych [26].

BADANIE EWOLUCJI HEMOSTAZY

O ile początki poznawania podstaw biochemicznych układu krzepnięcia człowieka sięgają XIX wieku, sam proces ewolucji krzepnięcia krwi kręgowców badany jest zaledwie od ponad pół wieku. Do realizacji tego celu możliwe jest zastosowanie czterech strategii badawczych. Dwie z nich poznają mechanizmy krzepnięcia krwi prostszych organizmów z zastosowaniem metod biochemicznych. Wyniki porównywane są z wcześniej zgromadzoną wiedzą o systemie krzepnięcia krwi człowieka. W pierwszej doświadczenia polegają na studiowaniu oddziaływania niezbadanych wcześniej czynników danego kręgowca ze znanymi czynnikami pochodzącymi od człowieka. Problemem jest tutaj specyficzność gatunkowa. Badanie oddziaływań białek pochodzących od różnych gatunków może prowadzić do błędnych wniosków.

Kolejne podejście opiera się na oczyszczeniu każdego z czynników krzepnięcia z osobna, określeniu jego właściwo-

ści chemicznych i znalezieniu odpowiadającego składnika człowieka. Taka taktyka umożliwia zbadanie czynników występujących w znacznych ilościach, jak protrombina czy fibrynogen, lecz nie nadaje się do białek, które są obecne w osoczu w ilościach śladowych, jak na przykład FVIII. Główną trudnością w obu metodach jest konieczność zdobycia znacznych ilości osocza pochodzącego od różnych gatunków kręgowców. Doświadczenia tego typu umożliwiły jednakże uzyskanie wielu ciekawych informacji [6].

Trzecia strategia możliwa jest dzięki rozwojowi metod genetyki molekularnej i obejmuje klonowanie molekularne i sekwencjonowanie DNA. Technika rekombinacji DNA zrewolucjonizowała badania ewolucyjne, umożliwiając użyskiwanie sekwencji białek występujących nawet w bardzo małych ilościach.

Czwarte podejście jest możliwe dzięki niezwykle rozwojowi informatyki, przyrostowi mocy obliczeniowej komputerów oraz programom badawczym sekwencjonowania całych genomów różnych organizmów. Metody komputerowej analizy sekwencji DNA i kodowanych przez nie białek polegają na rekonstrukcji ewolucji *in silico*, umożliwiając ograniczenie kosztownych badań *in vitro* czy *ex vivo*. Badania laboratoryjne mogą zostać dzięki temu precyzyjnie zaplanowane jako potwierdzenie spostrzeżeń poczynionych w trakcie analiz komputerowych. Każda z wymienionych metod badawczych przyczynia się znacząco do odtworzenia faktycznego obrazu ewolucji molekularnej układu hemostazy.

OD SEKWENCJI GENOMOWYCH DO DOMEN I KONSTRUOWANIA DRZEW FILOGENETYCZNYCH

Zanim możliwe stało się sekwencjonowanie kwasów nukleinowych cała wiedza na temat struktury białek pochodziła z określania sekwencji aminokwasowej [27,28] oraz z krystalografii rentgenograficznej [29].

Znacznie później opracowane zostały metody sekwencjonowania DNA [30,31] i określania struktury białek z zastosowaniem metody jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR, ang. *nuclear magnetic resonance*) [32]. Liczba danych pochodzących z sekwencjonowania DNA bardzo szybko przerosła liczbę danych sekwencji aminokwasowych białek dzięki automatyzacji metody, co znacznie przyspieszyło uzyskiwanie wyników oraz znacznie obniżyło koszty. Gwałtownie powiększające się bazy danych sekwencji nukleotydowych umożliwiają porównania ze znacznie wolniej przyrastającymi bazami bezpośredniego sekwencjonowania białek [33]. Dzięki takim programom jak BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*), możliwe stało się dopasowywanie i przeszukiwanie sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych [34]. Nie jest obecnie problemem przyrównanie fragmentu znanej sekwencji aminokwasowej białka w materiale DNA tego samego lub innego gatunku pod warunkiem, że mamy do dyspozycji dość obszerną bazę sekwencji nukleotydowych danego organizmu. Można w ten sposób znajdować zarówno paralogi, spokrewnione ewolucyjnie sekwencje u tego samego gatunku, powstałe w wyniku duplikacji, jak i ortologi, sekwencje będące efektem rozdzielenia się gatunków [33].

Poczynając od 1990 roku, w którym ruszył projekt poznania genomu człowieka, określono pełne sekwencje nukleotydowe nie tylko człowieka, ale także wielu innych organizmów pochodzących ze wszystkich trzech nadkrólestw: *Archaea*, *Bacteria*, *Eucarya* [35]. Prace znacznie przyspieszyło opracowanie metody sekwencjonowania WGS (ang. *whole genome shotgun*), w której przeprowadza się przypadkowe szatkowanie całego DNA na fragmenty, sekwencjonowanie i analizowanie wyników za pomocą specjalistycznego oprogramowania komputerowego [36,37]. Postawiono w ten sposób pierwszy krok konieczny do identyfikacji funkcjonalnych genów. Z drugiej strony, już pierwsze pełne genomy umożliwiły konstrukcję drzew filogenetycznych w oparciu o różne metody i strategie.

W celu identyfikacji genów w uzyskanych sekwencjach DNA opracowano szereg metod i programów. Wymienić tutaj można takie aplikacje jak GRAIL, FGENEH, MZWF, GENSCAN, GeneID, Geneparser czy HMMgene. Umożliwiają one poszukiwanie genu i przewidywanie jego struktury. Określają położenie intronów lub eksonów i generują sekwencję aminokwasową produktu białkowego. Nie istnieje co prawda jeden prosty sposób, który pozwoliłby na przewidywanie eksonów ze 100% prawdopodobieństwem, jednakże w celu uzyskania maksymalnie dokładnych wyników stosuje się algorytmy oparte na kombinacji kilku metod. Strategie poszukiwania genów można podzielić na trzy główne kategorie: metody oparte na składzie – uwzględniają ogólne właściwości sekwencji, metody oparte na sygnałach – analizują obecność lub brak specyficznych sekwencji i konsensusów sekwencji oraz metody porównawcze oparte na homologii sekwencji [38]. Użytecznym programem do przewidywania kompletnej struktury genu jest GENSCAN. Umożliwia on identyfikację intronów, eksonów, regionów promotorowych oraz sygnałów poliadenylacji. Sekwencja wejściowa nie musi przy tym reprezentować jednego genu. Może on dokonywać przewidywań z dużą dokładnością na sekwencjach niekompletnych genów albo wielu genów rozdzielonych innymi fragmentami DNA. GENSCAN, opracowany w MIT (ang. *Massachusetts Institute of Technology*), opiera się na modelu probabilistycznym składu sekwencji genomowej i struktury genu [39].

Pewnym utrudnieniem komputerowej analizy ewolucji sekwencji białkowych jest zjawisko tasowania eksonów. Umożliwia ono z jednej strony powstawanie nowych białek o nowych właściwościach biochemicznych poprzez przedstawianie domen, z których zbudowane są białka i na podstawie których grupuje się je do określonych rodzin białkowych PFAM [40]. Z drugiej utrudnia to znacznie analizę ewolucyjną białek, jeśli bierze się pod uwagę całą sekwencję aminokwasową danego białka. Obiekcją tego problemu jest przyrównywanie jedynie sekwencji wybranej domeny, najlepiej o określonej dobrze funkcji biologicznej [9]. Domena wybrana do studiów ewolucyjnych powinna być w miarę dobrze zachowana w ewolucji, co świadczy dodatkowo o jej istotnej roli w organizmie. Nawet jeśli znajduje się w kilku eksonach, co jest powszechne w przypadku dużych domen, a zdarza się także i w mniejszych, powinna być ona chroniona przed tasowaniem budujących ją eksonów, przez silną presję selekcyjną, ponieważ mogłoby to prowadzić do utraty funkcji, za którą odpowiada w białku.

Na podstawie wyszukanych w DNA eksonów możliwe jest odtworzenie sekwencji aminokwasowej zarówno całych białek, jak i poszczególnych domen. Właściwości badanej sekwencji można sprawdzić za pomocą takich narzędzi bioinformatycznych, jak PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/search>) [41] czy PROSITE (<http://www.expasy.org/prosite/>) [42].

Sekwencji aminokwasowych białek i ich domen można poszukiwać z użyciem TBLASTN. Jako zapytanie stosuje się wtedy macierzę znanej sekwencji aminokwasowej wybranej domeny badanego białka jednego gatunku, przeszukując bazę danych sekwencji nukleotydowych innego gatunku. Odpowiedzią są dopasowania sekwencji aminokwasowych, na podstawie których możliwe jest odtworzenie fragmentów lub całości nieznanego białka homologicznego [34].

Niezwykle użytecznymi narzędziami są coraz powszechniejsze przeglądarki genomów (ang. *genome browsers*), które łączą w sobie zwykle od razu kilka narzędzi bioinformatycznych. Dostępne są przez dowolną przeglądarkę internetową, udostępniają sekwencje nukleotydowe różnych organizmów, zawierają różne wersje BLAST, przewidują występowanie eksonów, zawierają mapy genomu oraz umożliwiają łatwe przemieszczanie się pomiędzy sekwencjami. Jednym z bardziej zaawansowanych modułów tego typu jest ENSEMBL (www.ensembl.org), wspólny projekt WTSI (ang. *The Wellcome Trust Sanger Institute*) i EMBL (ang. *European Molecular Biology Laboratory*) – EBI (ang. *European Bioinformatics Institute*), zawierający genomy wielu gatunków, sekwencjonowane w różnych ośrodkach badawczych na całym świecie [43]. Innym rozwijającym się i szybkim narzędziem jest przeglądarka Uniwersytetu Kalifornijskiego Santa Cruz <http://genome.ucsc.edu/>. Obie posiadają bogaty zbiór genomów różnych organizmów wraz z narzędziami do ich badania.

Badanie sekwencji kodujących i niekodujących zidentyfikowanych już genów jest bogatym źródłem informacji nie tylko o produktach ich ekspresji, ale i o samych genach. Jest to niezmiernie pomocne dla poznania funkcji biologicznej w aspekcie całego proteomu oraz umożliwia badanie ewolucji nie tylko organizmów, z których pochodzą, ale także ewolucji samych białek poprzez dopasowanie sekwencji i konstruowanie drzew filogenetycznych za pomocą takich programów, jak PHYLIP (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) czy Phylodendron (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html>). Wszystkie wymienione narzędzia znacznie ułatwiają rekonstrukcje ewolucji molekularnej białek hemostazy kręgowców.

Wspólna strategia biochemii porównawczej i bioinformatyki opiera się na zbadaniu najpierw grup najbardziej oddalonych od siebie ewolucyjnie. W przypadku gromad kręgowców ważne jest dokładne ustalenie kiedy się one od siebie oddzieliły metodami datowania stosowanymi w paleontologii. Gen lub produkt genu obecny u obu gromad świadczy, że musiał istnieć także u ich wspólnego przodka. Ustalając czy dany gen występuje u organizmów, które wyodrębniły się wcześniej, można ustalić jego względny czas duplikacji. Dodatkowo, należy pamiętać, że niektóre linie ewolucyjne czasami tracą pewne geny. Pomocne może być

także znalezienie najprostszego sposobu złożenia różnych domen sekwencyjnych [6].

BUDOWA DOMENOWA BIAŁEK HEMOSTAZY

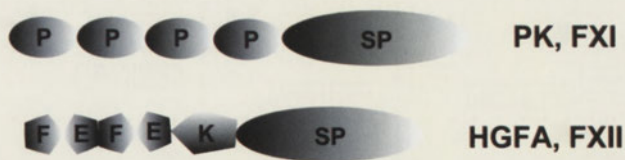
Poznano już dość dużo typów różnych domen sekwencyjnych, które odpowiednio nazwano i pogrupowano. Białka mają zwykle charakterystyczny układ domen i na tej podstawie zaliczane są do określonych rodzin i podrodzin. Wiele sekwencji tworzących dany typ domeny wykazuje podobieństwo i występuje często nawet w białkach pełniących odmienne funkcje, jak np. w przypadku tzw. domen A typu 1, 2, 3 występujących w białkach osocza ceruloplazminy, FV i FVIII oraz w białku błonowym hefestynie – ferroksydazie nabłonka jelit, które z kolei jest odpowiedzialne za transport żelaza w jelitach [44]. Może to świadczyć o ich wspólnym pochodzeniu, a analiza budowy domenowej wraz z przyrównywaniem sekwencji jest niezwykle użyteczna w rekonstrukcji ewolucji białek.

Wiele białek krzepnięcia ma charakter proteaz serynowych, dlatego do badania ich ewolucji użyć można sekwencji aminokwasowej domeny proteazowej (SP), zakodowanej zwykle w kilku eksonach, w której to obrębie występują silnie zachowane w ewolucji reszty aminokwasowe triady katalitycznej HDS [9]. Proteazy układu hemostazy charakteryzują się złożoną budową domenową, a każde z tych białek, oprócz wymienionej C-końcowej domeny proteazowej, posiada różnorodne domeny N-końcowe.

Jedną z ważniejszych takich domen jest GLA, zawierająca liczne reszty kwasu γ -glutaminowego, którego synteza jest zależna od witaminy K. Do białek krzepnięcia krwi kręgowców, posiadających domenę GLA, należą: protrombina, FVII, FIX i FX, białko C, białko S i białko Z¹. Pozostałe peryferyczne domeny, występujące w proteazach układu hemostazy, to: domeny kringlowe, palce fibronektynowe (FN-1, FN-2 i FN-3), domeny czynnika wzrostu naskórka (EGF) i domeny jabłkowe (PAN). Domeny kringlowe są charakterystyczne dla protrombiny, FXII, plazminogenu oraz t-PA i u-PA. Domeny EGF są typowe dla wszystkich proteaz serynowych układu hemostazy za wyjątkiem protrombiny, plazminogenu oraz FXI i prekalikreiny osoczowej [44]. Domeny PAN występują w czterech kopiach w FXI i prekalikreinie osoczowej (Ryc. 2) oraz w jednej kopii w plazminogenie [45].

EWOLUCJA UKŁADU KONTAKTU

Już pierwsze analizy porównawcze sekwencji proteaz serynowych układu hemostazy doprowadziły do wniosku, że pewne białka, szczególnie te zaliczane do czynników kontaktu – FXI, FXII i prekalikreina osoczowa, musiały pojawić się stosunkowo niedawno w toku ewolucji, znacznie wcześniej niż inne i powinny być nieobecne u niższych kręgowców. Wykazano brak aktywności FXI u gadów i ptaków przy istniejącej aktywności odpowiadającej prekalikreinie osoczowej. Stwierdzono także brak aktywnego FXII u



Rycina 2. Budowa domenowa wybranych proteaz serynowych. FXI, czynnik XI; PK, prekalikreina osoczowa; FXII, czynnik XII; HGFA, aktywator czynnika wzrostu hepatocytów. Domeny: SP, domena proteazowa; P, domena jabłkowa (PAN); K, domena kringlowa; F, domena fibronektynowa; E, domena czynnika wzrostu naskórka (EGF).

ptaków i węży, ale zarazem wrażliwość tego czynnika na prekalikreinę osoczową u żółwi i krokodyli [46].

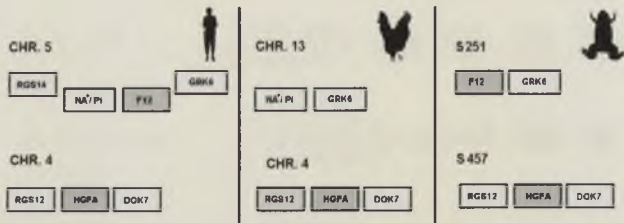
Porównywanie sekwencji proteaz serynowych czynników kontaktu potwierdziły, że białka te musiały wyewoluować stosunkowo niedawno. FXI i prekalikreina osoczowa człowieka wykazują tak duże podobieństwo pod względem sekwencji aminokwasowej, iż duplikacja musiała nastąpić w niezbyt odległym ewolucyjnie momencie². Silnych dowodów dostarczyły ostatnio przeprowadzone analizy kompletnych genomów oposa, dziobaka, kury domowej, żaby z rodzaju *Xenopus*, danio pręgowanego i rozdymki tygrysię. Potwierdzono brak FXI, FXII i prekalikreiny osoczowej u ryb. Występuje jednakże gen białka homologicznego do aktywatora czynnika wzrostu hepatocytów (HGFA) człowieka, który jest paralogiem FXII. Stwierdzono obecność genu FXII u żab, dziobaka i oposa, natomiast brak u kury. Paralogi FXII i czynnika wzrostu hepatocytów położone są u ssaków na odrębnych chromosomach, a u *Xenopus* znaleziono je na odrębnych fragmentach sekwencjonowanego DNA. W przypadku ptaków musiało dojść do utraty genu dla FXII, na co wskazuje porównanie położenia sąsiadujących genów u badanych przedstawicieli ssaków, ptaków i płazów [9] (Ryc. 3). Jest to w zgodzie z ponad stuletnimi obserwacjami wydłużonego czasu krzepnięcia krwi na drodze kontaktu u kury oraz z niedawnymi badaniami biochemicznymi u sępa i strusia, co potwierdza utratę genu dla FXII w całej gromadzie [47,48].

W przypadku pozostałych proteaz kontaktu pojedynczy gen, odpowiadający przodkowi FXI i prekalikreiny osoczowej (prePK/FXI), pojawił się u żaby, kury i dziobaka (Ryc. 4). Opos, przedstawiciel torbaczy, posiada zarówno prekalikreinę osoczową, jak i FXI, podobnie jak ssaki łożyskowe. Podobnie jak u człowieka, geny paralogów prekalikreiny osoczowej i FXI położone są jeden za drugim na tym samym chromosomie, wskazując na lokalną duplikację. Na uwagę zwraca też syntenia sąsiadujących genów, zarówno w przypadku par paralogów FXII – HGF, jak i FXI – PK (Ryc. 3,4).

Na podstawie powyższych analiz oraz drzewa filogenetycznego skonstruowanego na podstawie dopasowania sekwencji domen proteazowych (SP) stwierdzić można, że pojawienie się wśród czynników krzepnięcia proteaz kontaktu: FXII, PK i FXI miało miejsce wskutek przynajmniej dwóch duplikacji w trakcie kilkuset milionów lat ewolucji, poczynając od FXII i HGFA oraz prePK-FXI u przodka krę-

¹Białko S nie posiada domeny proteazowej, lecz dwie domeny lamininy G, białko Z nie ma aktywności proteazowej, ponieważ brak jest w domenie proteolitycznej prawidłowej triady katalitycznej.

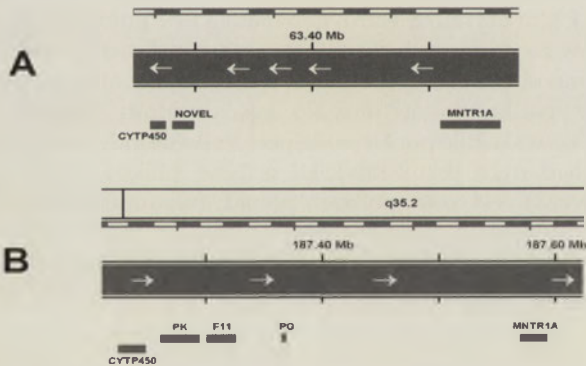
²58% pełne sekwencje, 68% domeny proteazowe



Rycina 3. Położenie sąsiadujących genów dla czynnika XII i HGFA u człowieka, kury (tylko HGFA) i żaby. Geny: RGS14, 14 regulator białka G; Na⁺/Pi; białko transportujące fosforany zależne od jonów sodu; F12, czynnik XII; GRK6, kinaza 6 powiązana z białkiem G; RGS12, 12 regulator białka G; HGFA, aktywator czynnika wzrostu hepatocytów; DOK7, białko Dok-7.

gowców czworonożnych, a kończąc na FXI i prekalikreinie osoczowej przed rozejściem się ssaków łżyskowych i torbaczy (Ryc. 5).

FXI ssaków w czwartej domenie jabłkowej (PAN) posiada zachowaną w ewolucji resztę cysteiny w pozycji 321, dzięki czemu formuje homodimery. Prekalikreina osoczowa posiada dodatkowo resztę cysteiny 326³, która z resztą Cys321 tworzy wewnątrzłańcuchowe wiązanie disulfidowe i, podobnie jak większość proteaz układu krzepnięcia krwi, występuje w postaci monomerów. Mutacja w kodonie Cys326 do glicyny, po duplikacji genu dla prePK/FXI, umożliwiła pojawienie się niespotykanych u innych proteaz właściwości FXI do tworzenia dimerów. Białko występujące u żaby,



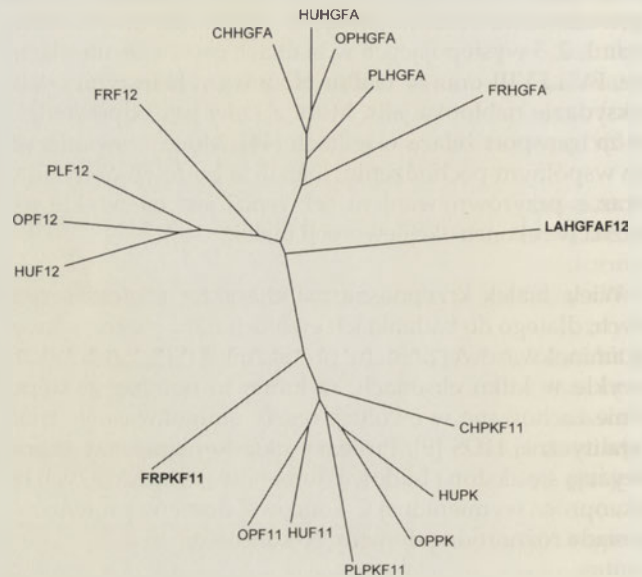
Rycina 4. Lokalizacja genów sąsiadujących z FXI/PK na chromosomie człowieka i kury. Geny: CYTP450, cytochrom P450; NOVEL, przodek PK-FXI; PK, prekalikreina; F11, czynnik XI; PG, pseudogen; MNTR1A, receptor melatoniny typu 1A (na podstawie ENSEMBL).

kury i dziobaka jest monomerem, ponieważ, podobnie jak prekalikreina osoczowa człowieka, zawiera dwie reszty cysteiny w pozycji odpowiadającej 321 i 326 [9].

W innym niedawnym, niezależnym doniesieniu, dotyczącym analizy ewolucyjnej kininogenów, okazało się, że mimo występowania u ryb kininogenu podobnego do wielkocząsteczkowego kininogenu ssaków, białko nie posiada segmentu bogatego w resztę histydyny, który jest niezbędny do aktywności w układzie kontaktu [49]. Fragment ten pojawia się po raz pierwszy dopiero u płazów, co zgadza się z pojawieniem się FXII i prePK/FXI w tej właśnie grupie kręgowców.

³Numeracja według sekwencji aminokwasowej białka człowieka.

Wcześniejsze prace wskazywały na aktywność układu kininogenazy u gadów i aktywację czynnika odpowiadającego prekalikreinie osoczowej przez FXII. Można zatem przypuszczać, że pierwotną funkcją proteaz kontaktu była kininogenaza, a dopiero pojawienie się FXI u przodka ssaków łżyskowych i torbaczy wskutek duplikacji prekalikreiny osoczowej⁴ umożliwiło udział w procesie krzepnięcia krwi i tym samym aktywację przez kontakt.



Rycina 5. Drzewo filogenetyczne na podstawie dopasowania sekwencji aminokwasowej domeny SP proteaz kontaktu i aktywatora czynnika wzrostu hepatocytów wybranych kręgowców: LAHGFAF12, przodek aktywatora czynnika wzrostu hepatocytów i czynnika XII u minoga; FRF12, czynnik XII żaby *Xenopus*; PLF12, czynnik XII dziobaka; OPF12, czynnik XII oposa; HUF12, czynnik XII człowieka; FRHGFA, aktywator czynnika wzrostu hepatocytów żaby *Xenopus*; CHHGFA, aktywator czynnika wzrostu hepatocytów kury; PLHGFA, aktywator czynnika wzrostu hepatocytów dziobaka; OPHGFA, aktywator czynnika wzrostu hepatocytów oposa; HUHGFA, aktywator czynnika wzrostu hepatocytów człowieka; FRPKF11, przodek prekalikreiny i czynnika XI u żaby; CHPKF11, przodek prekalikreiny i czynnika XI u kury; PLPKF11, przodek prekalikreiny i czynnika XI u dziobaka; OPF11, czynnik XI oposa; HUF11, czynnik XI człowieka; OPPK, prekalikreina osoczowa oposa; PKHU, prekalikreina osoczowa człowieka.

PODSUMOWANIE

Należy jeszcze raz podkreślić, że nawet u ssaków FXII nie jest niezbędny do aktywacji układu krzepnięcia, a jego brak u człowieka nie wiąże się z groźnymi objawami klinicznymi. Czynnik ten został wykryty przez Oscara Ratnofa w 1955 roku po stwierdzeniu wydłużonego czasu krzepnięcia u Johna Hagemana, który wykazywał brak wcześniej nie odkrytego czynnika krzepnięcia, ale zarazem nie miał objawów krwotocznych [50,51]. Paradoksalnie, bezpośrednią przyczyną śmierci Hagemana była zatorowość tętnicy płucnej jako powikłanie po wypadku przy pracy [52]. Co ciekawe, wśród ssaków walenie wykazują brak ekspresji genu tego białka wskutek występowania pseudogenu [53,54]. Brak FXII stwierdzono także u niektórych węży i żółwi morskich, lecz u żółwi lądowych i krokodyli wykazano aktywność tego białka [46,55]. Gen dla FXII występuje

⁴Czynnik ten, wcześniej określany jako prePK/FXI, uznać można jako prekalikreinę osoczową ponieważ wykazuje on budowę i aktywność prekalikreiny osoczowej ssaków łżyskowych i torbaczy.

także w genomie jaszczurki *Anolis carolinensis* (podobnie jak tylko jeden gen dla prePK-FXI)⁵, a zanika w linii prowadzącej do ptaków.

Wyłączenie genu dla FXII u myszy chroni przed sztucznie indukowaną zakrzepicą, nie wpływając na parametry prawidłowego krzepnięcia krwi [24,25], co otwiera perspektywy opracowania nowych terapii przeciwzakrzepowych działających na wewnątrzpochodny szlak aktywacji i krzepnięcia krwi, które byłyby pozbawione komplikacji krwotocznych związanych z hamowaniem zewnątrzpochodnego toru aktywacji krzepnięcia krwi [26].


PIŚMIENNICTWO

1. Lopaciuk S, Biederman A (2001) Zakrzepy i zatory, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa
2. Riddel JPJ, Aouizerat BE, Miaskowski C, Lillicrap DP (2007) Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs* 24: 123-131
3. Aird WC (2003) Hemostasis and irreducible complexity. *J Thromb Haemost* 1: 227-230
4. Blomback B (1996) Fibrinogen and fibrin-proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res* 83: 1-75
5. Doolittle RF (1965) Differences in the clotting of lamprey fibrinogen by lamprey and bovine thrombins. *Biochem J* 94: 735-741
6. Doolittle RF (1993) The evolution of vertebrate blood coagulation: a case of Yin and Yang. *Thromb Haemost* 70: 24-28
7. Davidson CJ, Tuddenham EG, McVey JH (2003) 450 million years of hemostasis. *J Thromb Haemost* 1: 1487-1494
8. Doolittle RF, Jiang Y, Nand J (2008) Genomic evidence for a simpler clotting scheme in jawless vertebrates. *J Mol Evol* 66: 185-196
9. Ponczek MB, Gailani D, Doolittle RF (2008) Evolution of the contact phase of vertebrate blood coagulation. *J Thromb Haemost* 6: 1876-1883
10. Schenone M, Furie BC, Furie B (2004) The blood coagulation cascade. *Curr Opin Hematol* 11: 272-277
11. Broze GJJ (1995) Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 6 Suppl 1: S7-13
12. Bauer KA, Kass BL, ten Cate H, Hawiger JJ, Rosenberg RD (1990) Factor IX is activated *in vivo* by the tissue factor mechanism. *Blood* 76: 731-736
13. Horne M (2005) Overview of hemostasis and thrombosis; current status of antithrombotic therapies. *Thromb Res* 117: 15-7; discussion 39-42
14. Rapaport SI, Rao LV (1995) The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". *Thromb Haemost* 74: 7-17
15. Nesheim M, Wang W, Boffa M, Nagashima M, Morser J, Bajzar L (1997) Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 78: 386-391
16. Vasse M (2008) Protein Z, a protein seeking a pathology. *Thromb Haemost* 100: 548-55
17. Maas C, Govers-Riemslog JWP, Bouma B, Schiks B, Hazenberg BPC, Lokhorst HM, Hammarström P, ten Cate H, de Groot PG, Bouma BN, Gebbink MFBG (2008) Misfolded proteins activate factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation. *J Clin Invest* 118: 3208-3218
18. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, Song Y, Tzima E, Kennerknecht E, Niepmann M, von Bruhl M, Sedding D, Massberg S, Günther A, Engelmann B, Preissner KT (2007) Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6388-6393
19. Schmaier AH (2008) The elusive physiologic role of Factor XII. *J Clin Invest* 118: 3006-3009
20. Goldsmith GHJ, Saito H, Ratnoff OS (1978) The activation of plasminogen by Hageman factor (Factor XII) and Hageman factor fragments. *J Clin Invest* 62: 54-60
21. Laake K, Venneröd AM (1974) Factor XII-induced fibrinolysis: studies on the separation of prekallikrein, plasminogen proactivator, and factor XI in human plasma. *Thromb Res* 4: 285-302
22. Mandle RJJ, Kaplan AP (1979) Hageman-factor-dependent fibrinolysis: generation of fibrinolytic activity by the interaction of human activated factor XI and plasminogen. *Blood* 54: 850-862
23. Collen D, Lijnen HR (1995) Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thromb Haemost* 74: 167-171
24. Renné T, Pozgajová M, Grüner S, Schuh K, Pauer H, Burfeind P, Gailani D, Nieswandt B (2005) Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 202: 271-281
25. Kleinschnitz C, Stoll G, Bendszus M, Schuh K, Pauer H, Burfeind P, Renné C, Gailani D, Nieswandt B, Renné T (2006) Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med* 203: 513-518
26. Colman RW (2006) Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? *J Exp Med* 203: 493-495
27. Edman P (1950) A method for the determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem Scand* 4: 283-293
28. Niall HD (1973) Automated Edman degradation: the protein sequenator. *Methods Enzymol* 27: 942-1010
29. Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Phillips DC (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 181: 662-666
30. Maxam AM, Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 560-564
31. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
32. Wüthrich K, Wagner G, Richarz R, Braun W (1980) Correlations between internal mobility and stability of globular proteins. *Biophys J* 32: 549-560
33. Higgs PG, Attwood TK (2008) Rewolucja informatyczna w naukach biomedycznych, W: Murzyn K (red) *Bioinformatyka i ewolucja molekularna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 5-18
34. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
35. Kawarabayasi Y, Hino Y, Horikawa H, Jin-no K, Takahashi M, Sekine M, Baba S, Ankai A, Kosugi H, Hosoyama A, Fukui S, Nagai Y, Nishijima K, Otsuka R, Nakazawa H, Takamiya M, Kato Y, Yoshizawa T, Tanaka T, Kudoh Y, Yamazaki J, Kushida N, Oguchi A, Aoki K, Masuda S, Yanagii M, Nishimura M, Yamagishi A, Oshima T, Kikuchi H (2001) Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *DNA Res* 8: 123-140
36. Weber JL, Myers EW (1997) Human whole-genome shotgun sequencing. *Genome Res* 7: 401-409
37. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ i wsp. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351
38. Baxevanis A (2005) Metody przewidywania regionów kodujących w sekwencjach DNA, W: Baxevanis A, Quellerie B (red) *Bioinformatyka. Podręcznik do analizy genów i białek*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 248-267
39. Burge C, Karlin S (1997) Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J Mol Biol* 268: 78-94
40. Gherardi E, Gonzalez Manzano R, Cottage A, Hawker K, Aparicio S (1997) Evolution of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP). *Ciba Found Symp* 212: 24-35; discussion 35-41, 42-45
41. Finn RD, Tate J, Mistry J, Coggill PC, Sammut SJ, Hotz H, Ceric G, Forslund K, Eddy SR, Sonnhammer ELL, Bateman A (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 36: 281-288
42. de Castro E, Sigrist CJA, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, Gasteiger E, Bairoch A, Hulo N (2006) ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res* 34: 362-365

⁵Nieopublikowane wyniki autora z przeszukiwania genomu *Anolis carolinensis* (<http://www.broad.mit.edu/models/anole>) z użyciem <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>.

43. Birney E, Andrews TD, Bevan P, Caccamo M, Chen Y, Clarke L, Coates G, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Down T, Eyraes E, Fernandez-Suarez XM, Gane P, Gibbins B, Gilbert J, Hammond M, Hotz H, Iyer V, Jekosch K, Kahari A, Kasprzyk A, Keefe D, Keenan S, Lehvaslaiho H, McVicker G, Melsopp C, Meidl P, Mongin E, Pettett R, Potter S, Proctor G, Rae M, Searle S, Slater G, Smedley D, Smith J, Spooner W, Stabenau A, Stalker J, Storey R, Ureta-Vidal A, Woodwark KC, Cameron G, Durbin R, Cox A, Hubbard T, Clamp M (2004) An overview of Ensembl. *Genome Res* 14: 925-928
44. Jiang Y, Doolittle RF (2003) The evolution of vertebrate blood coagulation as viewed from a comparison of puffer fish and sea squirt genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7527-7532
45. Tordai H, Bányai L, Patthy L (1999) The PAN module: the N-terminal domains of plasminogen and hepatocyte growth factor are homologous with the apple domains of the prekallikrein family and with a novel domain found in numerous nematode proteins. *FEBS Lett* 461: 63-67
46. Conlon JM (1999) Bradykinin and its receptors in non-mammalian vertebrates. *Regul Pept* 79: 71-81
47. Frost CL, Naudé RJ, Oelofsen W, Jacobson B (1999) Comparative blood coagulation studies in the ostrich. *Immunopharmacology* 45: 75-81
48. Weir-M J, Acurero Z, Salas-A R, Arteaga-Vizcaino M (2004) Blood coagulation factors in the black headed vulture (*Coragyps atratus*), a potential animal model for the study of haemostasis. *Thromb Res* 113: 269-273
49. Zhou L, Li-Ling J, Huang H, Ma F, Li Q (2008) Phylogenetic analysis of vertebrate kininogen genes. *Genomics* 91: 129-141
50. Ratnoff OD, Colopy JE (1955) A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. *J Clin Invest* 34: 602-613
51. Ratnoff OD, Margolius AJ (1955) Hageman trait: an asymptomatic disorder of blood coagulation. *Trans Assoc Am Physicians* 68: 149-154
52. Ratnoff OD, Busse RJ, Sheon RP (1968) The demise of John Hageman. *N Engl J Med* 279: 760-761
53. Robinson AJ, Kropatkin M, Aggeler PM (1969) Hageman factor (factor XII) deficiency in marine mammals. *Science* 166: 1420-1422
54. Semba U, Shibuya Y, Okabe H, Yamamoto T (1998) Whale Hageman factor (factor XII): prevented production due to pseudogene conversion. *Thromb Res* 90: 31-37
55. Soslau G, Wallace B, Vicente C, Goldenberg SJ, Tupis T, Spotila J, George R, Paladino F, Whitaker B, Violetta G, Piedra R (2004) Comparison of functional aspects of the coagulation cascade in human and sea turtle plasmas. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 138: 399-406

The contact factors of hemostasis: examination of molecular evolution and new therapeutic perspectives

Michał Blazej Ponczek 

Department of General Biochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 12/16 Banacha St., 90-237, Lodz, Poland

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

Key words: molecular evolution, plasma prekallikrein, factor XI, factor XII, hemostasis, bioinformatics

ABSTRACT

Enterprises of whole genome sequencing together with information technology progress enable reconstruction of blood clotting evolution by bioinformatic methods. It together offers a base to conclude that the contact phase of vertebrate blood coagulation is evolutionary young and shaped merely before divergence of marsupial and placental mammals. Amphibians, birds and platypus own a single gene corresponding to the predecessor of factor XI and plasma prekallikrein. The opossum has both PK and FXI like eutherian mammals. FXII appears first in amphibians, it is present in platypus and opossum, but disappears in lineage leading to birds, probably by gene loss. The last findings brought to live the intrinsic coagulation pathway as it was discovered that FXII-knockout mice were protected from experimentally induced thrombosis, with no changes of proper clotting. The contact proteases may be a target for new antithrombotic therapies.

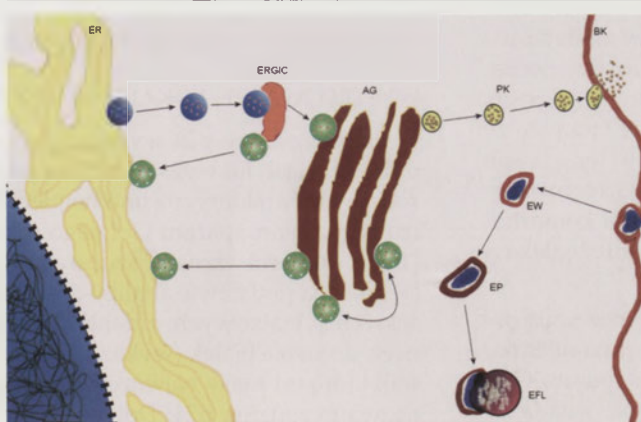
STRESZCZENIE

Transport białek w szlaku wydzielniczym ma charakter pęcherzykowy – z błon jednego organellum tworzą się pęcherzyki, które ulegają fuzji z błonami następnego. Białka rodziny p24 są obecne w błonach organelli szlaku wydzielniczego (ER, aparat Golgiego, pęcherzyki typu COPII i COPI). Doniesienia o ich znaczeniu w rozwoju choroby Alzheimera czynią je przedmiotem szczególnego zainteresowania. Umieszczenie białek z rodziny p24 w organellach szlaku wydzielniczego oraz poziom ich syntezy, zależny od rodzaju tkanki i związany z jej aktywnością wydzielniczą, wskazuje na udział białek p24 w procesie wydzielniczym. Na poziomie molekularnym ich funkcja pozostaje nadal nieznaną. Dotychczas zaproponowano, że białka p24: (1) są receptorami dla wybranych białek transportowanych szlakiem wydzielniczym; (2) regulują powstawanie pęcherzyków transportowych; (3) pełnią funkcje strukturalne i morfogenetyczne w organellach szlaku wydzielniczego; (4) biorą udział w kontroli jakości transportowanych białek. Niniejsza praca stanowi krytyczny przegląd doniesień na temat funkcji białek z rodziny p24.

TRANSPORT PĘCHERZYKOWY W KOMÓRCE EUKARIOTYCZNEJ

GŁÓWNE SZLAKI TRANSPORTOWE W KOMÓRCE

Budowa komórki eukariotycznej – występowanie na jej terenie wyodrębnionych, obłonionych organelli wewnątrzkomórkowych – oraz jej rozmiar wymusiły wykształcenie regulowanych systemów wewnątrzkomórkowego transportu białek, lipidów i innych makrocząsteczek. Jednym z rodzajów transportu wewnątrzkomórkowego jest transport pęcherzykowy. Pęcherzyki transportowe powstają przez pączkowanie z błony jednego organellum i są aktywnie transportowane w kierunku drugiego organellum docelowego, z którym następnie łączą się w procesie fuzji błonowej, uwalniając swoją zawartość do światła tego organellum [1,2]. W systemie transportu pęcherzykowego wyróżniamy trzy podstawowe szlaki transportowe: szlaki wydzielniczy i biosyntetyczny prowadzą z siateczki śródplazmatycznej (ER) do aparatu Golgiego, gdzie szlaki te rozdzielają się, transportowany materiał jest sortowany, po czym pęcherzyki wydzielnicze kierowane są do błony komórkowej, a transport biosyntetyczny kierowany jest do lizosomów (wakuol u grzybów i roślin) lub do innych lokalizacji komórkowych, właściwych dla transportowanych białek. Trzeci szlak – endocytozy – prowadzi od błony komórkowej przez wczesne i późne endosomy do lizosomów (Ryc. 1). Transport pęcherzykowy jest zawsze dwukierunkowy: transport wychodzący (ang. *anterograde*) prowadzi od ER do miejsca działania białka, a transport powrotny (ang. *retrograde*) w kierunku przeciwnym. Transport powrotny jest niezbędny dla zachowania niezmienności i spójności poszczególnych organelli – odpowiada za dynamiczne zatrzymywanie białek we właściwych im organellach szlaku wydzielniczego (przez ich odzyskiwanie z dalszych etapów transportu), zapewnia zachowanie równowagi błon komórkowych i umożliwia ponowne wykorzystanie białek odpowiedzialnych za proces transportu [1,3].



Rycina 1. Szlaki transportu pęcherzykowego. AG – aparat Golgiego, PK – pęcherzyki opłaszczone klatryną, EW – wczesny endosom, EP – późny endosom, EFL – endosom w fuzji z lizosomem, niebieskie kółko – pęcherzyki z płaszczem COPII, zielone kółko – pęcherzyki z płaszczem COPII.

Joanna Kamińska[✉]

Marta Hoffman-Sommer

Michał Płachta

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

[✉]Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa; tel.: (22) 592 13 16, e-mail: kaminska@ibb.waw.pl

Artykuł otrzymano 9 września 2009 r.

Artykuł zaakceptowano 13 listopada 2009 r.

Słowa kluczowe: białka p24, transport pęcherzykowy, płaszcz COPI, płaszcz COPII

Wykaz skrótów: COPI, COPII (ang. *coat protein complex I or II*) – kompleks białek opłaszczających pęcherzyki; ER – siateczka śródplazmatyczna; ERAD – ang. *ER-associated degradation*; ERGIC – ang. *ER-Golgi Intermediate Compartment*; GPI – kotwica glikozylofosfatydyloinozitolowa; UPR – ang. *unfolded protein response*

Podziękowania: Praca stanowi zmodyfikowaną i skróconą wersję pracy licencjackiej Pana Michała Płachty zatytułowanej „Białka z rodziny p24 u drożdży i wyższych Eukaryota; czy są niezbędne do życia.” Praca ta została obroniona w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego na Wydziale Rolnictwa i Biologii, Warszawa 2008. Autorzy dziękują Pani Doc. dr hab. Małgorzacie Łobockiej za opiekę merytoryczną nad pracą licencjacką. Praca została napisana w ramach realizacji projektu badawczego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego N303 101 32/3456.

Bardzo istotne dla prawidłowego przebiegu transportu pęcherzykowego jest wydajne selekcjonowanie i akumulowanie białek i innych cząsteczek będących przedmiotem transportu (ang. *cargo*) oraz proces fuzji pęcherzyka z odpowiednią błoną docelową. Kluczową rolę w rozpoznawaniu i pakowaniu transportowanych cząsteczek odgrywają białka płaszczka, pokrywające od strony cytoplazmatycznej powierzchnię tworzącego się pęcherzyka. W przypadku przeznaczonych do transportu białek błonowych zawierających domeny cytoplazmatyczne, selekcja polega na rozpoznaniu sygnałów kierujących, obecnych w ich domenach cytosolowych, przez białka płaszczka [1]. Natomiast białka, które nie mogą bezpośrednio oddziaływać z białkami płaszczka, na przykład białka pozbawione fragmentów cytoplazmatycznych, białka wiążące się z błoną za pomocą kotwicy glikozylofosfatydyloinozytolowej (GPI) oraz białka rozpuszczalne, wymagają dodatkowych białek receptorowych [1,2]. Selekcja do pęcherzyka białek przeznaczonych do transportu zachodzi jednocześnie z procesem zakrzywiania błony wskutek działania na błonę białek płaszczka. Za wybór właściwej błony docelowej – zależnie od transportowanych cząsteczek – odpowiadają czynniki kotwiczące pęcherzyki (ang. *vesicle tethering factors*) oraz czynniki fuzyjne (ang. *membrane fusion factors*). Jedne i drugie uczestniczą także w sortowaniu białek przeznaczonych do transportu [4], w związku z czym uważa się, że w komórce występują różne rodzaje pęcherzyków, specyficzne dla danego typu białka, oraz że przed pączkowaniem następuje koncentracja odpowiednich białek. Za koncentrację białek odpowiadają prawdopodobnie zarówno białka płaszczka, jak i czynniki kotwicząco-sortujące. Zgodnie z przewidywaniami tego modelu pokazano ostatnio, że w ER istnieją rejony błony, z których powstają pęcherzyki określonego typu [5].

PĘCHERZYKI COPII I COPI

Na różnych etapach transportu funkcjonują różne białka płaszczka (Ryc. 1), charakterystyczne dla danej populacji pęcherzyków. Na wczesnych etapach szlaku wydzielniczego – od ER do aparatu Golgiego – za transport odpowiadają pęcherzyki z płaszczkami COPI i COPII. Transport wychodzący z ER wymaga białek płaszczka COPII. Płaszczki COPII budują dwa kompleksy białkowe, Sec23/24 i Sec13/31, oraz GTPaza Sar1. Białko Sec24 jest receptorem dla większości transportowanych białek, a białko Sec23 reguluje hydrolizę cząsteczki GTP przez Sar1 [1]. Ostatnie prace nad białkiem Sar1 wykazały, że jego N-koniec ma zdolność do zakrzywiania błony [6]. W związku z tym postuluje się, że za zakrzywianie błony podczas powstawania pęcherzyków odpowiada GTPaza Sar1 razem z kompleksem Sec23/24, który dodatkowo wpływa na kształt pęcherzyka [6]. U roślin i drożdży pęcherzyki COPII ulegają fuzji bezpośrednio z aparatem Golgiego, natomiast w komórkach ssaków pęcherzyki te łączą się ze sobą na drodze fuzji homotypowej, tworząc w ten sposób większą strukturę błonową – ERGIC (ang. *ER-Golgi Intermediate Compartment*). Jest to dodatkowy przedział komórkowy, którego podstawową funkcją jest sortowanie białek na wczesnych etapach wydzielania [7].

Z błon struktury ERGIC i aparatu Golgiego powstają pęcherzyki COPI, które odpowiadają za transport na odcinku ERGIC-Golgi oraz za transport prowadzący z aparatu Golgiego do ER i ERGIC. Płaszczki pęcherzyków COPI składa się

z podjednostek α -, β -, β' -, γ -, δ -, ϵ -, ζ -COP oraz z GTPazy Arf1. Od niedawna do białek płaszczki COPI zalicza się również białka aktywujące hydrolityczną funkcję GTPazy Arf1, tzw. białka ArfGAP. Białka ArfGAP uczestniczą też w sortowaniu białek przeznaczonych do transportu, a w doświadczeniach *in vitro* wykazano, że wzmagają formowanie pęcherzyków z błon komórkowych i z liposomów [8]. Zablockowanie działania białek płaszczki COPI hamuje zarówno transport z ERGIC do aparatu Golgiego, jak i transport powrotny z ERGIC do ER i z aparatu Golgiego do ER. Doświadczenia prowadzone w komórkach ssaków wykazały jednak, że niektóre rodzaje białek mogą być transportowane nawet wtedy, gdy funkcjonowanie białek COPI jest zablockowane, co wskazuje na istnienie kilku równoległych dróg transportu powrotnego z aparatu Golgiego, w tym również dróg niezależnych od COPI [3,8,9].

ROLA LIPIDÓW W TRANSPORCIE PĘCHERZYKOWYM

Oprócz białek istotną rolę w transporcie pęcherzykowym odgrywają także lipidy. Jako składniki błon biologicznych, lipidy są pasywnymi uczestnikami transportu, ale nie tylko: wraz z wyizolowaniem i scharakteryzowaniem drożdżowego mutantu *sec14* stało się jasne, że pełnią one również ważne funkcje regulacyjne. W mutancie tym, który wykazywał zaburzenia w transporcie wydzielniczym, uszkodzone jest białko regulujące poziom fosfatydyloinozytolu i fosfatydylocholino w wybranych błonach, co wskazywało na udział tych lipidów w prawidłowym przebiegu wydzielania [10]. Udział lipidów staje się oczywisty, gdy uzmysłowimy sobie kilka rzeczy. Przede wszystkim skład lipidowy błony jest istotny dla prawidłowego wiązania wielu białek zaangażowanych w powstawanie oraz fuzję pęcherzyków, na przykład dla GTPazy. Prawidłowy skład lipidowy warunkuje również samo kształtowanie się pęcherzyków, wpływa bowiem na proces deformacji błony. Ponadto, lipidy mogą regulować koncentrację niektórych białek przeznaczonych do transportu przez bezpośrednie oddziaływania z nimi lub przez swój wpływ na ich oligomeryzację [11,12].

W naszym myśleniu o transporcie pęcherzykowym powinniśmy zatem uwzględnić błony biologiczne w całej ich złożoności – jako struktury utworzone zarówno z białek, jak i z lipidów. Co więcej, musimy pamiętać także o tym, że błony są strukturami dynamicznymi i że w trakcie tworzenia się i fuzji pęcherzyka dochodzi nie tylko do zmian w oddziaływaniach między białkami, ale też do zmian w składzie lipidowym błon i w oddziaływaniach białkowo-lipidowych, a zatem do przeorganizowania całych fragmentów błon.

BIAŁKA p24 - CHARAKTERYSTYKA RODZINY

WYSTĘPOWANIE, LOKALIZACJA, STRUKTURA

Białka rodziny p24 występują zarówno u grzybów, np. u drożdży, jak i u wyższych *Eukaryota*. Pierwsze białka z tej rodziny scharakteryzowano najpierw biochemicznie, przez izolację z błon aparatu Golgiego z komórek HeLa u ludzi [13], z komórek trzustki szczura [14] i z drożdży [15]. Następnie, na podstawie analizy dostępnych w bazach danych sekwencji białkowych, zidentyfikowano całą grupę podobnych do siebie białek (wykazujących około 30% identyczności), którą od masy najwcześniej opisanego białka (24 kDa) nazwano rodziną p24. Dotychczas u drożdży zidentyfiko-

wano osiem białek z tej rodziny – należą do nich Emp24, Erv25 oraz sześć białek Erp1-6 [16]. U *Caenorhabditis elegans* znanych jest sześć białek p24, a u ssaków siedem (p23, p24, p25, p26, p27, tp24, Ers25) [17-19]. Najwięcej białek p24 jest u roślin – u *Arabidopsis thaliana* przynajmniej jedenaście [20]. Zachowanie białek p24 w toku ewolucji oraz ich powszechność i obfitość wśród eukariontów sugerują, że odgrywają one ważną rolę w życiu komórki. Rzeczywiście, delecje genów p24 u ssaków są letalne: zarodki myszy z delecjami obydwu alleli genu p23 obumierają na wczesnych etapach embriogenezy [21]. Wiadomo też, że białka rodziny p24 odgrywają istotną rolę w patogenezie choroby Alzheimera [22]. Natomiast komórki drożdży pozostają żywotne nawet wtedy, gdy są pozbawione jednocześnie wszystkich ośmiu genów kodujących białka p24 [23].

Białka p24 występują nie tylko w aparacie Golgiego, ale też w błonach ER, ERGIC oraz w pęcherzykach transportowych COPI i COPII [16,18,24]. U myszy białko p23 znaleziono też w błonach granuł wydzielniczych komórek β trzustki [25]. Lokalizacja w organellach szlaku wydzielniczego oraz poziom ekspresji zależny od rodzaju tkanki i związany z jej aktywnością wydzielniczą, wskazuje na udział białek p24 w procesie wydzielania [25]. Zaangażowaniem w regulację transportu białek ważnych dla procesu embriogenezy i sygnalizacji komórkowej tłumaczyć można letalność zarodków myszy pozbawionych białek p24.

Oprócz podobieństwa struktury pierwszorzędowej – na podstawie którego zidentyfikowano całą rodzinę – białka p24 mają także identyczną budowę domenową (Ryc. 2). Wszystkie mają jedną domenę transbłonową i dużą N-końcową część zlokalizowaną w świetle ER (około 170 reszt aminokwasowych), zaś domena cytoplazmatyczna jest krótka (10-15 reszt aminokwasowych). Ze względu na homologię fragmentu lumenalnego białka p24 podzielono na cztery podrodziny: α , β , δ i γ [17,18]. W części lumenalnej występuje ponadto domena GOLD z dwiema zachowanymi w ewolucji resztami cysteiny [26].

OLIGOMERYZACJA

Wszystkie białka p24 wykazują zdolność do tworzenia heterooligomerów – zazwyczaj występują w postaci heterodimerów i heterotetramerów, w skład których wchodzi podjednostki należące do różnych podrodziny [16,18,27]. Homooligomerów nie znaleziono, natomiast białka p24 występują również jako monomery [27]. Za oligomeryzację odpowiada fragment poprzedzający domenę błonową, o strukturze superhelisy (ang. *coiled-coil*) [28]. Proponowane jest, że w powstawanie oligomerów może być zaangażowana domena transbłonowa, jednak sama nie jest ona wystarczająca [29].

W przypadku drożdży wiadomo, że funkcjonalnym kompleksem białek p24 jest heterotetramer i że w jego skład wchodzi po jednym białku z każdej z podrodziny rodziny p24. Białka Emp24 i Erv25, jako jedyni przedstawiciele swoich podrodziny, stanowią rdzeń kompleksu [30]. Brak choćby jednego z białek rdzenia kompleksu p24 powoduje destabilizację heterotetramery i degradację wolnych białek p24 [16,31].

Zdolność białek p24 do tworzenia heterooligomerów jest cechą zachowaną u wszystkich eukariontów, gdyż jest istotna dla funkcjonowania i dystrybucji tych białek [16]. Przy-

kładowo, w komórkach ssaczy nadprodukcja białka p23 prowadzi do jego akumulacji w ER, co z kolei wpływa na lokalizację pozostałych białek p24. Jednocześnie oznacza to, że lokalizacja białka p23 nie zależy jedynie od obecnego w nim sygnału eksportu z ER (patrz dalej). Zaproponowano więc, iż opuszczenie ER przez białko p23 zależy od obecności specyficznych sygnałów w kontekście całego kompleksu białek p24 [18]. Jest to zgodne z obserwacją, że obecność białek p25 i p26 ułatwia transport pary p23/p24 [24]. Natomiast transport białek p24, p26 i tp24 prawdopodobnie nie wymaga heterooligomeryzacji. W komórkach HeLa białko p26 występuje w wyższych stężeniach niż pozostałe białka p24 i funkcjonuje głównie w formie monomeru. Z kolei białko tp24 występuje w mniejszych ilościach niż pozostałe białka rodziny. Uważa się więc, że zmieniające się oddziaływania między białkami z rodziny p24 decydują o tym, w jakim kierunku są one transportowane [27].

SYGNAŁY LOKALIZACYJNE W BIAŁKACH p24

Kompleksy białek p24 tworzą się prawdopodobnie w momencie wychodzenia z ER [32]. Eksport białek p24 z ER jest regulowany i zależy od występujących w nich sygnałów lokalizacyjnych, takich jak motyw LV (reszty leucyny, waliny), aromatyczny motyw FF (dwóch reszt fenyloalaniny), czy od reszty kwasu glutaminowego i reszty glutaminy w domenie błonowej [29,33]. Za efektywność eksportu niektórych białek p24 mógłby też odpowiadać motyw dwóch reszt aminokwasów kwaśnych (reszta kwasu asparaginowego i kwasu glutaminowego, rozdzielone inną resztą aminokwasową) [34]. Eksport białek p24 z ER następuje dzięki wiązaniu z podjednostkami płaszczka COPII. *In vitro* białko Emp24 wykazuje powinowactwo do wszystkich podjednostek tego płaszczka – Sar1, Sec23/24 i Sec13/31. Usunięcie sygnału FF z Emp24 zaburza wiązanie białek Sec13/31 i Sar1, ale nie wpływa na wiązanie Sec23/24. Z kolei białko Erv25 posiada zmodyfikowany motyw aromatyczny (sekwencja YF), dzięki któremu wiąże kompleksy Sec23/24 i Sec13/31, natomiast białko Erv25 nie wykazuje powinowactwa do GTPazy Sar1. Dlatego też oba białka – Emp24 i Erv25 – są tak samo ważne dla efektywnego eksportu całego kompleksu z ER [30]. Być może wiązanie przez białka p24 kompleksu Sec13/31 – co ma miejsce podczas eksportu białek p24 z ER – stymuluje aktywację GTPazy Sar1 przez dimer Sec23/24. Byłoby to zgodne z hipotezą, że rekrutacja Sec13/31 przez p24 wpływa na tempo hydrolizy GTP przez Sar1 [30].

Za powrót białek p24 do ER także odpowiadają specjalne motywy aminokwasowe. Najlepiej poznany jest motyw dwóch sąsiadujących lizyn (KKXX lub wariant KXXXX na C-końcu białka), który jest odpowiedzialny za oddziaływania z



Rycina 2. Schemat struktury białka z rodziny p24. Zaznaczono domenę GOLD, domenę o strukturze superhelisy, domenę transbłonową (DB), dwie zachowane w ewolucji reszty cysteiny (C), motywy sygnałowe obecne w cytoplazmatycznych domenach białek p24 (LV, FF/YF, KKXX/KXXXX).

plaszczem pęcherzyków COPI (podjednostkami α - i β' -COP) [7,35]. Przykładowo, motyw ten jest zarazem konieczny i wystarczający do osiągnięcia właściwej lokalizacji w błonie ER przez białko Atp24 (białko z rodziny p24 z *Arabidopsis thaliana*). W badaniach *in vitro* wykazano, że motyw dwóch sąsiadujących lizyn wiąże nie tylko białka płaszczu COPI, ale też GTPazę Arf1. Pozbawione tego motywu sygnałowego białko Atp24 trafia do wakuoli oraz na powierzchnię błony komórkowej [20]. U ssaków motyw dwóch sąsiadujących lizyn występuje jedynie w białkach p23 oraz p25, gdzie zapewnia silne wiązanie płaszczu COPI. W przypadku białka p25, wyłączenie tego sygnału powoduje transport białka do aparatu Golgiego, do dalszych organelli oraz na powierzchnię komórki, gdzie następnie białko to podlega endocytozie [36]. Drożdżowy homolog białka p25 – Emp24 – jest pozbawiony motywu dwóch sąsiadujących lizyn, natomiast podobną funkcję spełnia tu motyw dwóch aminokwasów aromatycznych (opisany wyżej motyw dwóch fenyloalanin), wiążący podjednostkę γ -COP [28, 35]. Białko Erv25 też nie zawiera typowego motywu KKXX, a jego funkcję pełni w tym przypadku zmodyfikowany motyw KTKHII [30].

PROPONOWANE FUNKCJE BIAŁEK p24

Mimo dość szczegółowych danych co do lokalizacji komórkowej białek p24 i ich oddziaływań z innymi białkami, nie udało się dotychczas ustalić ich funkcji ani wyjaśnić, dlaczego zostały one utrzymywane w toku ewolucji. W komórkach ze zmutowanymi genami p24 opisano wiele bardzo różnych fenotypów, na podstawie których zaproponowano co najmniej cztery różne funkcje dla białek p24. Poniżej przedstawiamy najpierw krótki przegląd znanych fenotypów i ich interpretacji, a następnie próbujemy pokazać, że wszystkie fenotypy związane z mutacjami w genach p24 można wytłumaczyć jedną funkcją molekularną – rolą w utrzymaniu homeostazy lipidowej w błonach organelli szlaku wydzielniczego.

BIAŁKA p24 SĄ RECEPTORAMI DLA WYBRANYCH BIAŁEK TRANSPORTOWANYCH SZLAKIEM WYDZIELNICZYM

W komórkach drożdży białka p24 są potrzebne do wydajnego transportu niektórych białek z ER; dotyczy to przede wszystkim białek z kotwicą GPI, jak na przykład Gas1. W mutancie *emp24 Δ* ilość białka Gas1 pakowanego do pęcherzyków COPII wynosi około 70% w porównaniu ze szczepem typu dzikiego, co powoduje częściową akumulację Gas1 w komórce [15,37]. Fakt, że zatrzymanie transportu Gas1 w mutancie *emp24 Δ* jest niepełne (spadek o około 30%) [15], wynika prawdopodobnie z aktywności transportu niespecyficznego – tzw. *bulk-flow* – któremu białka te miałyby podlegać [38]. Ponieważ białka Emp24 i Erv25 oddziałują z Gas1 (choć na razie nie wiadomo, który fragment białka Gas1 odpowiada za te oddziaływania), a jednocześnie obydwa wiążą też podjednostki płaszczu COPII, zaproponowano że białka p24 funkcjonują jako receptory dla Gas1, a także dla innych białek z kotwicą GPI [39]. Jednak najnowsze prace z laboratorium H. Riezmana wykazują, że to raczej inne białka są aktywnie segregowane, podczas gdy białka z kotwicą GPI nie trafiają wybiórczo do pęcherzyków transportowych, zaś rolą białek p24 w tym procesie może być rekrutowanie białek z kotwicą GPI do odpowiednich miejsc „wyjścia” z

ER albo wręcz udział w organizacji tych rejonów błony ER [5,38]. Wpływ białek p24 na transport białek z kotwicą GPI nie jest ograniczony tylko do drożdży. Ostatnio opisano, że w komórkach ssaków transport białka DAF (ang. *decay-accelerating factor*), wyposażonego w kotwicę GPI, wymaga specyficznie białka p23 [40].

Konsekwencją zaburzeń w transporcie niektórych białek jest ich akumulacja w ER i pobudzenie w mutantach p24 systemu odpowiedzi na stres w ER, tzw. *unfolded protein response* (UPR). To może tłumaczyć nieprawidłowe wydzielanie Kar2 (drożdżowy homolog ssaczego białka BiP), obserwowaną w drożdżowych mutantach pozbawionych jednego z genów białek p24. Aktywacja systemu UPR powoduje bowiem zwiększenie syntezy białka opiekuńczego Kar2, co może prowadzić do wysycenia receptora odpowiedzialnego za jego odzysk z aparatu Golgiego – białka Erd2 – i w konsekwencji – do wydzielenia samego Kar2 [41]. Aktywacją systemu UPR można też wytłumaczyć inny fenotyp związany z mutacją *emp24 Δ* : przywrócenie żywotności mutantu *sec13 Δ* (gen *SEC13*, kodujący podjednostkę płaszczu COPII, jest dla drożdży genem niezbędnym do życia) – wiadomo bowiem, że pobudzenie systemu UPR pozwala na przeżycie mutantom upośledzonym w tworzeniu pęcherzyków COPII [42,43]. Tak więc proponowana funkcja białek p24 jako receptorów dla wybranych białek wydzielniczych dobrze tłumaczy również fenotypy wydzielania Kar2 i przywrócenia żywotności szczepom z mutacją *sec13 Δ* .

BIAŁKA p24 REGULUJĄ POWSTAWANIE PĘCHERZYKÓW COPI

Jak już wspominaliśmy wyżej, białka p24 oddziałują z podjednostkami płaszczu COPI. Obecność niektórych białek rodziny p24 w pęcherzykach COPI jest kwestią kontrowersyjną – istnieją zarówno doniesienia, że są nieobecne [44], jak i takie, w których ilościowo określono ich zawartość w pęcherzykach COPI [45] – jednak obecnie powszechnie przyjmuje się, że białka z rodziny p24 występują w pęcherzykach COPI. Jak można uzasadnić ten fakt? Przede wszystkim, jeżeli pełnią one w komórce funkcję receptorów dla białek transportowanych w pęcherzykach COPII, to oddziaływanie z COPI może służyć odzyskowi kompleksu p24 do ER wraz z innymi elementami strukturalnymi pęcherzyków [31]. Jednak wiadomo, że w mutancie *emp24 Δ* zaburzone jest również powstawanie pęcherzyków COPI oraz transport z aparatu Golgiego do ER [46]. Te fenotypy wskazują, że białka p24 występują w pęcherzykach COPI nie tylko w charakterze biernego „ładunku”.

Udokumentowane oddziaływania białek p24 z takimi białkami, jak GTPaza Arf1 i aktywujące ją białka ArfGAP, oraz z elementami płaszczu COPI sugerują, że białka p24 aktywnie uczestniczą w transporcie powrotnym. Wydaje się, że odgrywają ważną rolę w procesie pączkowania pęcherzyków COPI. Wniosek ten oparty jest na wynikach badań *in vitro*, w których odtwarzano powstawanie pęcherzyków COPI, używając liposomów i oczyszczonych białek. W reakcji prowadzonej jedynie w obecności GTPazy Arf1, jej regulatorów oraz podjednostek płaszczu COPI, wydajność powstawania pęcherzyków z liposomów jest jednak niska, podczas gdy dodanie do mieszaniny reakcyjnej cytoplazmatycznego fragmentu białka p23 z kotwicą lipidową – lipopeptydu – poprawia wydajność reakcji. Stwierdzono

ponadto, że lipopeptyd jest konieczny do związania z liposomami białek płaszczu COPI i że w obecności lipopeptydu p23 efektywność pączkowania jest niezależna od składu lipidowego liposomów. Dodatkowo, obecność lipopeptydu powodowała segregację GTPazy Arf1 do wyróżnionych domen błonowych [47]. Obecnie białka p24 są uważane za niezbędny składnik liposomów w doświadczeniach odtwarzających pączkowanie pęcherzyków COPI *in vitro* [47].

Wpływ białek p24 na wydajne pączkowanie wynika zapewne z ich zdolności do stymulowania polimeryzacji płaszczu COPI. Właściwość tę wykazano *in vitro*, przy czym heterotetramery – forma występująca *in vivo* – działały silniej niż homooligomery [48]. Stymulujący wpływ białek p24 na płaszcz COPI wiąże się prawdopodobnie z ich oddziaływaniami z Arf1-GDP – GTPazą Arf1 w postaci związanej z cząsteczką GDP. Postulowany mechanizm tego zjawiska zakłada, że oddziaływanie takie powoduje związanie GTPazy z błoną, gdzie rezydują białka GEF, które wymieniają nukleotyd GDP na GTP, co z kolei prowadzi do bezpośredniego zakotwiczenia Arf1 w błonie [7]. Oddziaływanie z p23 zapewniałoby tu szybkość i precyzyjnie zlokalizowaną wymianę nukleotydu związanego z GTPazą Arf1. Po związaniu GTP, Arf1 oddysocjowywałaby od białka p23, dzięki czemu powstawałyby na błonie dwa osobne miejsca wiązania płaszczu COPI: jedno tworzone przez białko p23, wiążące podjednostkę γ -COP [35], a drugie tworzone przez GTPazę Arf1, oddziałującą z podjednostką β -COP [7]. Takie podwójne wiązanie COPI działałoby stymulująco na tworzenie płaszczu. W dodatku stwierdzono *in vitro*, że dimery białek p24 wiążą się do białka γ -COP w dwóch niezależnych miejscach. Zarazem to właśnie dimery, a nie monomery są wydajnie selekcjonowane do pęcherzyków COPI. Na podstawie tych wyników postawiono więc hipotezę, iż obecność białek p24 w pęcherzykach COPI regulowana jest dynamicznymi zmianami stanu ich oligomeryzacji. Według tego modelu, kompleksy wstępne COPI, występujące w cytoplazmie, wykorzystują podjednostkę γ -COP do stałego sondowania powierzchni aparatu Golgiego. Jeżeli dojdzie do związania aktywnej GTPazy Arf1-GTP oraz dimerów p24 przez podjednostkę γ -COP, to inicjowane jest składanie pęcherzyka [35].

Jednocześnie istnieją dane wskazujące, że cytoplazmatyczne końce białek p24 są inhibitorami reakcji hydrolizy GTP przez Arf1 wywołanej związaniem białek płaszczu COPI. Bez zahamowania tej reakcji doszłoby najpewniej do zbyt wczesnej depolimeryzacji powstającego płaszczu białkowego, jeszcze przed pełnym uformowaniem się pęcherzyka. Jest to istotne zwłaszcza dla procesu sortowania białek przeznaczonych do transportu do tworzących się pęcherzyków. Brak białek p24 w błonie, powodujący zbyt szybką dysocjację elementów płaszczu ze względu na wyższą aktywność ArfGAP, ograniczałby czas, jakim powstający kompleks dysponuje na wyselekcjonowanie białek. Z tego powodu białka p24 określa się jako „wewnętrzny zegar” reakcji hydrolizy GTP przez Arf1 [7].

Także u drożdży badania nad wpływem białek p24 na formowanie pęcherzyków COPI sugerują, że białka te są aktywne w transporcie z aparatu Golgiego do ER. Na ich udział w transporcie COPI wskazują oddziaływania genetyczne między genami białek rodziny p24 a genami kodującymi podjednostki płaszczu pęcherzyków COPI: *SEC21*

(kodującym γ -COP), *SEC27* (kodującym β' -COP), czy genem *GLO3* (kodującym białko o aktywności GAP względem Arf1). Mutant *emp24Δ glo3Δ* jest nieżywoty, zaś mutanty *emp24Δ sec21-1* i *erv25Δ sec21-1* nie rosną w temperaturze, w której rośnie każdy z pojedynczych mutantów. Sugeruje to, że białka Emp24 lub Erv25 są istotne gdy kompleksy COPI są nie w pełni funkcjonalne na skutek mutacji w genach kodujących ich podjednostki. Natomiast zwiększenie poziomu *Glo3* w tych mutantach (*emp24Δ sec21-1* i *erv25Δ sec21-1*) znosi efekt, odpowiednio, braku Emp24 lub Erv25. Ponieważ wiadomo, że białko *Glo3* wiąże podjednostkę γ -COP, może to sugerować udział białek p24 w wiązaniu do błony białek płaszczu COPI. Podobny wniosek wynika z doświadczeń *in vitro*, w których przeprowadzano reakcję tworzenia pęcherzyków COPI z błon aparatu Golgiego wyizolowanych z mutantu *emp24Δ*. Obserwowano w tych warunkach defekt w tworzeniu pęcherzyków COPI, który jest niewidoczny, gdy reakcję przeprowadza się przy nadmiarze oczyszczonych białek COPI. Za rolę białek p24 w stabilizacji kompleksów inicjujących składanie pęcherzyków COPI przemawia też fakt, że cytoplazmatyczne końce białek Emp24 i Erv25 wiążą białko *Glo3* [46]. Dotychczas nie udało się jednak wyjaśnić eksperymentalnie, jakie znaczenie dla transportu mają te oddziaływania.

Jak ma się funkcja białek p24 w powstawaniu pęcherzyków COPI do ich roli w transporcie białek z kotwicą GPI? Trzeba tu rozważyć dwie możliwości. Po pierwsze, białka p24 mogą pełnić dwie niezależne funkcje: jedną związaną z sortowaniem białek z kotwicą GPI do pęcherzyków COPI i drugą związaną z formowaniem pęcherzyków COPI. Natomiast druga możliwość – prostsza i naszym zdaniem bardziej prawdopodobna – jest taka, że białka p24 uczestniczą bezpośrednio w tworzeniu pęcherzyków COPI, a zaburzenia w przenoszeniu białek z kotwicą GPI są wtórnym efektem zablokowania transportu powrotnego, niezbędnego dla odzyskiwania składników maszynierii transportowej.

BIAŁKA p24 BIORĄ UDZIAŁ W KONTROLOWANIU STRUKTURY TRANSPORTOWANYCH BIAŁEK

W ER dochodzi do fałdowania i modyfikacji białek. Te o nieprawidłowej konformacji, z podstawieniami aminokwasowymi lub źle zmodyfikowane, ulegają zatrzymaniu w ER i stają się substratem dla systemu degradacji związanej z ER, tzw. ERAD (ang. *Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation*). Mechanizm ten zabezpiecza komórkę przed toksycznością związaną z nagromadzeniem nieprawidłowych białek. Postuluje się, że białka z rodziny p24 uczestniczą w tej kontroli. Funkcję taką zaproponowano na podstawie doświadczeń, w których badano oddziaływania genetyczne między genem *SEL-9* (koduje białko p24 u *Caenorhabditis elegans*) a genami *LIN-12* i *GLP-1* (kodują białka receptorowe *LIN-12/NOTCH*, odpowiedzialne za oddziaływania międzykomórkowe i za określenie specyficznego przeznaczenia komórki podczas embriogenezy). Zaobserwowano bowiem, że redukcja aktywności białka *Sel-9* powoduje wzmożoną aktywność receptorów *LIN-12/NOTCH* oraz zwiększenie ilości zmutowanych receptorów na powierzchni komórek, podczas gdy przy normalnie funkcjonującym białku *Sel-9* zmienione receptory zatrzymywane były wewnątrz komórki [49]. Wyniki te wskazywały na udział białka *Sel-9* w usu-

waniu nieprawidłowych białek ze szlaku wydzielniczego, zapewne poprzez ich degradację.

Również badania nad odkładaniem w mózgu złogów peptydu β -amyloidu ($A\beta$) i rozwojem choroby Alzheimera, wskazują na udział białek p24 w kontroli jakości transportowanych białek. Wyciszenie genu białka p23 skutkuje bowiem zwiększeniem stabilności i poziomu wydzielania prekursora β -amyloidu – białka APP (ang. *Amyloid Precursor Protein*). Podwyższony poziom komórkowego APP może wynikać z tego, że także cząsteczki APP o nieprawidłowej konformacji są transportowane na powierzchnię komórki [50]. Kwestia ta jest jednak kontrowersyjna, gdyż inni autorzy twierdzą, że brak jest wpływu p23 na poziom APP na powierzchni komórki [51]. Wiadomo natomiast, że białko p23 jest składnikiem kompleksu γ -sekretazy, który proteolitycznie tnie APP. Wyciszenie ekspresji genu białka p23 z użyciem techniki małych interferencyjnych RNA (siRNA) powoduje zwiększenie aktywności tego kompleksu względem APP i tworzenie większych ilości peptydu $A\beta$. Co więcej, mutacje zmieniające aktywność γ -sekretazy (związane z dziedzicznymi formami choroby Alzheimera) w połączeniu z wyciszeniem p23, wpływają dodatkowo na zwiększenie ilości $A\beta$ [50]. Jedną z możliwych interpretacji tego faktu jest taka, że białko p23 uczestniczy w kontroli jakości białek i jest potrzebne do degradacji zmienionych podjednostek γ -sekretazy.

W stanach wzmożonej aktywności wydzielniczej wydajna kontrola fałdowania białek jest szczególnie ważna, gdyż podwyższone stężenie transportowanych białek może promować ich agregację. Wzrost poziomu syntezy białek p24 jest związany ze wzmożonym wydzielaniem podczas wydzielania insuliny przez komórki β trzustki [25] oraz podczas wydzielania hormonu proopiomelanokortyny (POMC) przez komórki przedniego płata przysadki u żaby *Xenopus laevis* [52,53]. Zaobserwowano też wzrost ekspresji jednego z genów kodujących białko z rodziny p24 – *ERS25* – w różnych warunkach stresowych, kiedy gromadzą się białka o nieprawidłowej konformacji i/lub zatrzymane jest wydzielanie (stres oksydacyjny, podwyższona temperatura, zastosowanie związków chemicznych, takich jak tunikamycyna czy brefeldyna A). Spostrzeżenie to wspiera hipotezę o roli białek p24 w monitorowaniu homeostazy na szlaku wydzielania [19].

Z kolei u drożdży opisano sytuację odwrotną. W mutacji *emp24 Δ* stwierdzono bowiem przyspieszoną degradację zmutowanej formy wakuolarnego białka karboksypeptydazy Y (CPY), tak zwanego CPY*. Szybkość degradacji CPY* zależy od aktywności systemu ERAD i od wydajności transportu z ER do aparatu Golgiego [54]. Przyspieszenie degradacji CPY* wskutek mutacji *emp24 Δ* może więc wynikać z dodatkowego pobudzenia systemu UPR, który reguluje transkrypcję wielu genów, między innymi stymulując ekspresję genów systemu ERAD i genów białek zaangażowanych w transport ER-Golgi-ER [55].

Na udział białek p24 w kontroli jakości białek u drożdży wskazują natomiast podobieństwa między mutacjami *emp24 Δ* i *yos9 Δ* (białko Yos9 jest elementem systemu ERAD), takie jak brak wpływu na wzrost w różnych warunkach i opóźnienie transportu białka Gas1, a także bezpośrednie oddziaływanie białek Yos9 i Gas1 [56,57]. Oddziaływanie Yos9

z Gas1 wiąże się z udziałem białka Yos9 w kontroli jakości glikozylowanych białek [58]. Inną przesłanką wspierającą hipotezę o udziale białek p24 w procesie kontroli jakości białek u drożdży, jest fakt że brak białka Bst1, deacetylazy kotwicy GPI – podobnie jak brak białka Emp24 – pozwala na przeżycie mutantowi *sec13 Δ* , pozbawionemu podjednostki płaszczka COPII [57]. Należy przy tym zauważyć, że etap deacetylacji kotwicy jest jednym z etapów kontroli jakości białka z kotwicą GPI [59]. Podobieństwa oddziaływań i fenotypów mutantów *emp24 Δ* i *yos9 Δ* czy *emp24 Δ* i *bst1 Δ* wspierają hipotezę, że białka p24 stanowią element systemu kontroli jakości wybranych białek, a w szczególności białek z kotwicą GPI.

BIAŁKA p24 PEŁNIĄ FUNKCJE STRUKTURALNE I MORFOGENETYCZNE W ERGIC I APARACIE GOLGIEGO

Badania nad funkcją białek p24, oparte głównie na analizie mikroskopowej, biochemicznej oraz doświadczeniach *in vitro*, pokazują, że białka p24 pełnią w błonach funkcje strukturalne i morfogenetyczne. Szczególne znaczenie przypisuje się w tym kontekście białku p23. W komórkach HeLa sprowokowanie akumulacji p23 w ER – przez nadprodukcję tego białka – prowadzi do wytworzenia się domen o regularnej morfologii, zawierających zakumulowane białko p23. Towarzyszy temu fragmentacja aparatu Golgiego, pozbawionego w tych warunkach białka p23. Mimo tak silnego wpływu na morfologię ER i aparatu Golgiego, w komórkach nadprodukcujących p23 nie stwierdzono zahamowania transportu z udziałem pęcherzyków COPI i COPII, co sugeruje, że fenotyp morfologiczny nie jest po prostu wtórnym skutkiem zaburzeń w transporcie białek [60]. Także u myszy wykazano wpływ p23 na morfologię aparatu Golgiego w komórkach nerek i wątroby: delecja jednego allelu tego genu powoduje rozszerzenie cystern Golgiego oraz pojawienie się błoniastych struktur sferycznych [21]. Ponadto, białka p24 są niezbędne w procesie tworzenia peroksysomów u *Hansenula polymorpha* [61].

Wpływ białek p24 na kształtowanie organelli szlaku wydzielniczego może wynikać z ich oddziaływań z innymi białkami. Na przykład, zmiany w budowie aparatu Golgiego mogą wynikać z oddziaływań z pełniącymi funkcje strukturalne białkami macierzy aparatu Golgiego, jak p115, GM130, GRASP55 czy GRASP65 [62]. Z kolei oddziaływanie białek p24 z płaszczem COPI i ich udział w stabilizowaniu COPI na błonie, jest istotny nie tylko dla wspomnianego już tworzenia pęcherzyków, ale także dla utrzymania struktury aparatu Golgiego i dla powstawania struktury ERGIC [63]. Jednak rola białek p24 w morfologii organelli wydzielniczych może się też wiązać z ich wpływem na rozmieszczenie cholesterolu w błonach. Taką hipotezę postawiono na podstawie analizy komórek nadprodukcujących białko p25 pozbawione sygnału dwóch sąsiadujących lizyn (KKVV). Zmienione białko akumulowało się w późnych endosomach, powodując zmiany w morfologii endosomów i promując ich agregację. Okazało się, że akumulacji p25 w endosomach towarzyszy relokacja cholesterolu: wykluczenie go z błon endosomalnych i akumulacja w regionach perinuklearnych, w strukturach zawierających białko Lamp1 – marker lizosomów [36]. Efekt wykluczania cholesterolu przez białka z rodziny p24 prawdopodobnie występuje także w obrębie aparatu Golgiego. Na podobnej zasadzie, akumulowanie

białek p24 do pęcherzyków COPI również może powodować wykluczanie cholesterolu z błon tych pęcherzyków. Mechanizm ten tłumaczyłby, w jaki sposób utrzymywany jest gradient stężenia cholesterolu obserwowany w błonach organelli szlaku wydzielniczego [36].

ZAKOŃCZENIE

Wymienione powyżej proponowane funkcje białek p24 nie wykluczają się wzajemnie. Transport z ER do aparatu Golgiego w pęcherzykach COPII, powstawanie pęcherzyków COPI i transport powrotny z aparatu Golgiego do ER, kontrola jakości białek w szlaku wydzielniczym i prawidłowa morfogeneza organelli wydzielniczych, to zjawiska ściśle ze sobą powiązane. System kontroli jakości transportowanych białek może działać poprawnie tylko wtedy, gdy zaangażowane w ten transport organella są zbudowane prawidłowo, zaś zaburzenia w kontroli jakości prowadzą do transportowania nieprawidłowych białek, co może powodować zmiany w morfologii organelli wydzielniczych. Zmianami w budowie tych organelli można wyjaśnić również defekty w funkcjonowaniu pęcherzyków COPI i COPII, a zaburzenia w transporcie mogą z kolei odpowiadać za nieprawidłowy skład i budowę organelli wydzielniczych. Tak więc wszystkie opisane fenotypy mutantów p24 można sprowadzić do nieprawidłowej budowy organelli szlaku wydzielniczego i wynikających z tego wtórnych zaburzeń. Proponujemy zatem model, w którym białka p24 regulują strukturę błon organelli szlaku wydzielniczego i w ten sposób pośrednio wpływają na sortowanie i transport zarówno białek, jak i lipidów.

W tej sytuacji powstaje jednak pytanie, w jaki sposób białka p24 wpływają na budowę organelli wydzielniczych. Stawiamy hipotezę, że może to wynikać z ich udziału w utrzymywaniu homeostazy lipidowej błon. Jak białka p24 miałyby realizować tę funkcję? Być może przez swój wpływ na GTPazę Arf1 i czynniki ArfGAP, a co za tym idzie – na szereg białek efektorowych GTPazy – na przykład na fosfolipazy. A może poprzez bezpośredni wpływ na segregację w błonach cholesterolu i innych lipidów. Przyszłe eksperymenty powinny dostarczyć nam odpowiedzi na powyższe pytania.

PIŚMIENNICTWO

1. Bonifacino J, Glick B (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116: 153-166
2. Lee M, Miller E, Goldberg J, Orci L, Schekman R (2004) Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 87-123
3. Pavelka M, Neumüller J, Ellinger A (2008) Retrograde traffic in the biosynthetic-secretory route. *Histochem Cell Biol* 129: 277-288
4. Mayor S, Riezman H (2004) Sorting GPI-anchored proteins. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5: 110-120
5. Castillon G, Watanabe R, Taylor M, Schwabe T, Riezman H (2009) Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast. *Traffic* 10: 186-200
6. Lee M, Orci L, Hamamoto S, Futai E, Ravazzola M, Schekman R (2005) Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell* 122: 605-617
7. Bèthune J, Wieland F, Moelleken J (2006) COPI-mediated transport. *J Membr Biol* 211: 65-79
8. Sannerud R, Saraste J, Goud B (2003) Retrograde traffic in the biosynthetic-secretory route: pathways and machinery. *Curr Opin Cell Biol* 15: 438-445

9. Appenzeller-Herzog C, Hauri H (2006) The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci* 119: 2173-2183
10. Mousley C, Tyeryar K, Vincent-Pope P, Bankaitis V (2007) The Sec14-superfamily and the regulatory interface between phospholipid metabolism and membrane trafficking. *Biochim Biophys Acta* 1771: 727-736
11. Watanabe R, Funato K, Venkataraman K, Futerman A, Riezman H (2002) Sphingolipids are required for the stable membrane association of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in yeast. *J Biol Chem* 277: 49538-49544
12. Lee M, Hamamoto S, Schekman R (2002) Ceramide biosynthesis is required for the formation of the oligomeric H⁺-ATPase Pma1p in the yeast endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 277: 22395-22401
13. Stames M, Craighead M, Hoe M, Lampen N, Geromanos S, Tempst P, Rothman J (1995) An integral membrane component of coatomer-coated transport vesicles defines a family of proteins involved in budding. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8011-8015
14. Blum R, Feick P, Puype M, Vandekerckhove J, Klengel R, Nastainczyk W, Schulz I (1996) Tmp21 and p24A, two type I proteins enriched in pancreatic microsomal membranes, are members of a protein family involved in vesicular trafficking. *J Biol Chem* 271: 17183-17189
15. Schimmöller F, Singer-Krüger B, Schröder S, Krüger U, Barlowe C, Riezman H (1995) The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J* 14: 1329-1339
16. Marzioch M, Henthorn D, Herrmann J, Wilson R, Thomas D, Bergeron J, Solari R, Rowley A (1999) Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Mol Biol Cell* 10: 1923-1938
17. Carney G, Bowen N (2004) p24 proteins, intracellular trafficking, and behavior: *Drosophila melanogaster* provides insights and opportunities. *Biol Cell* 96: 271-278
18. Dominguez M, Deigaard K, Füllekrug J, Dahan S, Fazel A, Paccaud J, Thomas D, Bergeron J, Nilsson T (1998) gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer. *J Cell Biol* 140: 751-765
19. Hwang S, Boswell S, Seo J, Lee S (2008) Novel oxidative stress-responsive gene ERS25 functions as a regulator of the heat-shock and cell death response. *J Biol Chem* 283: 13063-13069
20. Langhans M, Marcote M, Pimpl P, Virgili-López G, Robinson D, Aniento F (2008) *In vivo* trafficking and localization of p24 proteins in plant cells. *Traffic* 9: 770-785
21. Denzel A, Otto F, Girod A, Pepperkok R, Watson R, Rosewell I, Bergeron J, Solari R, Owen M (2000) The p24 family member p23 is required for early embryonic development. *Curr Biol* 10: 55-58
22. Verdile G, Gandy S, Martins R (2007) The role of presenilin and its interacting proteins in the biogenesis of Alzheimer's beta amyloid. *Neurochem Res* 32: 609-623
23. Springer S, Chen E, Duden R, Marzioch M, Rowley A, Hamamoto S, Merchant S, Schekman R (2000) The p24 proteins are not essential for vesicular transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4034-4039
24. Emery G, Rojo M, Gruenberg J (2000) Coupled transport of p24 family members. *J Cell Sci* 113: 2507-2516
25. Hosaka M, Watanabe T, Yamauchi Y, Sakai Y, Suda M, Mizutani S, Takeuchi T, Isobe T, Izumi T (2007) A subset of p23 localized on secretory granules in pancreatic beta-cells. *J Histochem Cytochem* 55: 235-245
26. Anantharaman V, Aravind L (2002) The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. *Genome Biol* 3: research0023.1-0023.7
27. Jenne N, Frey K, Brugger B, Wieland F (2002) Oligomeric state and stoichiometry of p24 proteins in the early secretory pathway. *J Biol Chem* 277: 46504-46511
28. Ciufu L, Boyd A (2000) Identification of a luminal sequence specifying the assembly of Emp24p into p24 complexes in the yeast secretory pathway. *J Biol Chem* 275: 8382-8388
29. Fiedler K, Rothman J (1997) Sorting determinants in the transmembrane domain of p24 proteins. *J Biol Chem* 272: 24739-24742
30. Belden W, Barlowe C (2001) Distinct roles for the cytoplasmic tail sequences of Emp24p and Erv25p in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *J Biol Chem* 276: 43040-43048
31. Belden W, Barlowe C (1996) Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Biol Chem* 271: 26939-26946

32. Füllekrug J, Suganuma T, Tang B, Hong W, Storrle B, Nilsson T (1999) Localization and recycling of gp27 (hp24gamma3): complex formation with other p24 family members. *Mol Biol Cell* 10: 1939-1955
33. Nakamura N, Yamazaki S, Sato K, Nakano A, Sakaguchi M, Mihara K (1998) Identification of potential regulatory elements for the transport of Emp24p. *Mol Biol Cell* 9: 3493-3503
34. Nishimura N, Balch W (1997) A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* 277: 556-558
35. Bethune J, Kol M, Hoffmann J, Reckmann I, Brügger B, Wieland F (2006) Coatomer, the coat protein of COPI transport vesicles, discriminates endoplasmic reticulum residents from p24 proteins. *Mol Cell Biol* 26: 8011-8021
36. Emery G, Parton R, Rojo M, Gruenberg J (2003) The trans-membrane protein p25 forms highly specialized domains that regulate membrane composition and dynamics. *J Cell Sci* 116: 4821-4832
37. Muñoz M, Riezman H (2000) The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J Cell Biol* 148: 925-930
38. Watanabe R, Castillon G, Meury A, Riezman H (2008) The presence of an ER exit signal determines the protein sorting upon ER exit in yeast. *Biochem J* 414: 237-245
39. Muñoz M, Nuoffer C, Hauri H, Riezman H (2000) The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J Cell Biol* 148: 925-930
40. Takida S, Maeda Y, Kinoshita T (2008) Mammalian GPI-anchored proteins require p24 proteins for their efficient transport from the ER to the plasma membrane. *Biochem J* 409: 555-562
41. Belden W, Barlowe C (2001) Deletion of yeast p24 genes activates the unfolded protein response. *Mol Biol Cell* 12: 957-969
42. Sato M, Sato K, Nakano A (2002) Evidence for the intimate relationship between vesicle budding from the ER and the unfolded protein response. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 560-567
43. Higashio H, Kohno K (2002) A genetic link between the unfolded protein response and vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 568-574
44. Rojo M, Pepperkok R, Emery G, Kellner R, Stang E, Parton R, Gruenberg J (1997) Involvement of the transmembrane protein p23 in biosynthetic protein transport. *J Cell Biol* 139: 1119-1135
45. Sohn K, Orci L, Ravazzola M, Amherdt M, Bremser M, Lottspeich F, Fiedler K, Helms J, Wieland F (1996) A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *J Cell Biol* 135: 1239-1248
46. Aguilera-Romero A, Kaminska J, Spang A, Riezman H, Muñoz M (2008) The yeast p24 complex is required for the formation of COPI retrograde transport vesicles from the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 180: 713-720
47. Bremser M, Nickel W, Schweikert M, Ravazzola M, Amherdt M, Hughes C, Söllner T, Rothman J, Wieland F (1999) Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell* 96: 495-506
48. Nickel W, Brügger B, Wieland F (2002) Vesicular transport: the core machinery of COPI recruitment and budding. *J Cell Sci* 115: 3235-3240
49. Wen C, Greenwald I (1999) p24 proteins and quality control of LIN-12 and GLP-1 trafficking in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 145: 1165-1175
50. Vetrivel K, Gong P, Bowen J, Cheng H, Chen Y, Carter M, Nguyen P, Placanica L, Wieland F, Li Y, Kounnas MZ, Thirakaran G (2007) Dual roles of the transmembrane protein p23/TMP21 in the modulation of amyloid precursor protein metabolism. *Mol Neurodegener* 2: 4
51. Chen F, Hasegawa H, Schmitt-Ulms G, Kawarai T, Böhm C, Katayama T, Gu Y, Sanjo N, Glista M, Rogava E, Wakutani Y, Pardossi-Piquard R, Ruan X, Tandon A, Checler F, Marambaud P, Hansen K, Westaway D, St George-Hyslop P, Fraser P (2006) TMP21 is a presenilin complex component that modulates γ -secretase but not ϵ -secretase activity. *Nature* 440: 1208-1212
52. Kuiper R, Bouw G, Janssen K, Rötter J, van Herp F, Martens G (2001) Localization of p24 putative cargo receptors in the early secretory pathway depends on the biosynthetic activity of the cell. *Biochem J* 360: 421-429
53. Rötter J, Kuiper R, Bouw G, Martens G (2002) Cell-type-specific and selectively induced expression of members of the p24 family of putative cargo receptors. *J Cell Sci* 115: 1049-1058
54. Caldwell S, Hill K, Cooper A (2001) Degradation of endoplasmic reticulum (ER) quality control substrates requires transport between the ER and Golgi. *J Biol Chem* 276: 23296-23303
55. Travers K, Patil C, Wodicka L, Lockhart D, Weissman J, Walter P (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101: 249-258
56. Friedmann E, Salzberg Y, Weinberger A, Shaltiel S, Gerst J (2002) YOS9, the putative yeast homolog of a gene amplified in osteosarcomas, is involved in the endoplasmic reticulum (ER)-Golgi transport of GPI-anchored proteins. *J Biol Chem* 277: 35274-35281
57. Elrod-Erickson M, Kaiser C (1996) Genes that control the fidelity of endoplasmic reticulum to Golgi transport identified as suppressors of vesicle budding mutations. *Mol Biol Cell* 7: 1043-1058
58. Szathmari R, Biemann R, Nita-Lazar M, Burda P, Jakob C (2005) Yos9 protein is essential for degradation of misfolded glycoproteins and may function as lectin in ERAD. *Mol Cell* 19: 765-775
59. Fujita M, Yoko-O T, Jigami Y (2006) Inositol deacylation by Bst1p is required for the quality control of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Biol Cell* 17: 834-850
60. Rojo M, Emery G, Marjomaki V, McDowall AW, Parton R, Gruenberg J (2000) The transmembrane protein p23 contributes to the organization of the Golgi apparatus. *J Cell Sci* 113: 1043-1057
61. Otzen M, Krikken A, Ozimek P, Kurbatova E, Nagotu S, Veenhuis M, van der Klei I (2006) In the yeast *Hansenula polymorpha*, peroxisome formation from the ER is independent of Pex19p, but involves the function of p24 proteins. *FEMS Yeast Res* 6: 1157-1166
62. Barr F, Preisinger C, Kopajtich R, Körner R (2001) Golgi matrix proteins interact with p24 cargo receptors and aid their efficient retention in the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 155: 885-891
63. Mitrovic S, Ben-Tekaya H, Koegler E, Gruenberg J, Hauri H (2008) The cargo receptors Surf4, endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC)-53, and p25 are required to maintain the architecture of ERGIC and Golgi. *Mol Biol Cell* 19: 1976-1990

The p24 family proteins - regulators of vesicular trafficking

Joanna Kamińska[✉], Marta Hoffman-Sommer, Michał Płachta

Institute of Biochemistry and Biophysics PAS; 5a Pawlowskiego St., 02-106 Warsaw, Poland

[✉]e-mail: kaminska@ibb.waw.pl

Key words: p24 family proteins, vesicular trafficking, COPI coat, COPII coat

ABSTRACT

The trafficking of proteins in the secretory pathway is mediated by vesicles. Proteins of the p24 family are present on the membranes of secretory pathway organelles (ER, Golgi, COPI and COPII vesicles). Evidence exists showing that p24 proteins play a role in the development of Alzheimer disease, making them an interesting research subject. Their presence in the secretory pathway and their tissue-dependent expression levels suggest that p24 proteins are involved in secretion. However, their molecular function is not clear. Several potential functions have been proposed for p24 proteins: (1) that they function as receptors for selected cargo; (2) that they regulate vesicle biogenesis; (3) that they perform structural and morphogenetic functions in the secretory pathway; (4) that they are responsible for quality control of transported proteins. In this article, we provide a critical review of the postulated functions of p24 proteins.

STRESZCZENIE

Szok cieplny wywołuje wiele fizjologicznych zmian w każdej komórce. Detekcja szoku oraz aktywacja szlaków przekazywania sygnałów komórkowych prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny Hsf i do wzmożonej ekspresji genów kodujących białka stresu. Ich zadaniem jest szeroko pojęta ochrona białek, to jest zapobieganie agregacji polipeptydów o błędnej strukturze oraz niedopuszczanie do oddziaływania rozwiniętych białek z niewłaściwymi partnerami. Poza tym, białka Hsp przywracają uszkodzonym przez stres polipeptydom prawidłową konformację, a w przypadkach kiedy defekty są zbyt duże, kierują uszkodzone polipeptydy do degradacji. W pracy podkreślona jest szczególna rola białek Hsp w odpowiedzi immunologicznej dwóch odległych ewolucyjnie gromad zwierząt: ssaków i owadów. Poza ogólną charakterystyką odpowiedzi komórki na szok cieplny opisano pozytywne skutki, jakie może przynieść poddanie organizmu działaniu podwyższonej temperatury. Zwrócono uwagę na fakt, że doświadczenie szoku cieplnego może determinować reakcję organizmów na inny rodzaj stresu, jak na przykład zakażenie u ssaków i owadów czy szok osmotyczny u drożdży. W pracy uwzględniono również wzajemne oddziaływanie szlaków przekazywania sygnałów aktywowanych w warunkach stresowych.

WPROWADZENIE

Każda żywa komórka, niezależnie od tego czy jest samodzielnym organizmem czy częścią złożonego organizmu wielokomórkowego, reaguje na zmieniające się warunki środowiska zewnętrznego, jak i wewnętrznego. Na tę reakcję składa się percepcja zmiany oraz przekazanie sygnału prowadzące do adaptacji fizjologii komórki do zmienionych warunków. Takimi zmianami wymagającymi przystosowania mogą być: wzrost lub obniżenie temperatury, stres oksydacyjny, stres osmotyczny, niedobór substancji odżywczych, zmiana pH czy zakażenie. Każda z nich indukuje charakterystyczne dla siebie szlaki przekazywania sygnału. Oprócz tego aktywowane są mechanizmy bardziej uniwersalne, regulujące ekspresję genów, których produkty białkowe pełnią istotną funkcję w adaptacji komórki do szeroko rozumianych niekorzystnych zmian. Należą do nich synteza białek szoku cieplnego (Hsp, ang. *heat-shock proteins*) czy też białek Grp (ang. *glucose-regulated proteins*), zwanych ogólnie białkami stresu. Jest to tak zwana ogólna odpowiedź na stres. U *Saccharomyces cerevisiae* w ogólnej odpowiedzi na stres, zwanej czasami odpowiedzią na stres środowiskowy, biorą udział dwa czynniki transkrypcyjne zawierające motywy palców cynkowych: Msn2p oraz Msn4p (ang. *multicopy suppressor of snf1*) [1,2]. W optymalnych warunkach wzrostu czynniki te znajdują się w cytoplazmie, zaś w warunkach stresowych przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie wiążą się do elementów STRE (ang. *stress-response element*), zawierających motyw CCCCT w promotorach genów docelowych [3]. Wykazano, że u drożdży *S. cerevisiae* około 200 genów zawiera element STRE w sekwencji promotorowej [4,5]. Należą do nich, między innymi, geny kodujące białka szoku cieplnego *HSP12*, *HSP26*, *HSP104*, geny biorące udział w metabolizmie komórkowym, np. gen kodujący heksokinazę *HXK1*, syntazę trehalozo-6-fosforanu *TPS1*, katalazę *CTT1*, dysmutazę ponadtlenkową *SOD2*. Należy tu wspomnieć, że ekspresja genów w odpowiedzi na stres jest negatywnie regulowana przez kinazę białkową A (PKA; szlak RAS-cAMP). Aktywność PKA jest wyższa u drożdży w logarytmicznej fazie wzrostu, a obniża się w fazie stacjonarnej. Z tego powodu, między innymi, drożdże intensywnie dzielące się są bardziej podatne na stres, niż drożdże z fazy stacjonarnej [6,7].

Dzięki poznaniu zjawiska ogólnej odpowiedzi na stres możemy wyjaśnić mechanizmy cross-protekcji, to znaczy zwiększonej odporności na jeden rodzaj stresu po uprzednim działaniu innego. I tak na przykład, drożdże poddane działaniu podwyższonej temperatury są bardziej odporne na stres osmotyczny [8]. Mechanizmy cross-protekcji obserwuje się również u wyższych organizmów. *Drosophila melanogaster* poddana szokowi cieplnemu jest bardziej odporna na

Iwona Wojda[✉]

Zakład Immunologii Bezkręgowców, Instytut Biologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

[✉]Zakład Immunologii Bezkręgowców, Instytut Biologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; e-mail:wojda@hektor.umcs.lublin.pl

Artykuł otrzymano 2 września 2009 r.
Artykuł zaakceptowano 2 października 2009 r.

Słowa kluczowe: szok termiczny, odporność wrodzona, stres osmotyczny, kinazy MAP, ssaki, owady, drożdże *Saccharomyces cerevisiae*

Wykaz skrótów: ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase*) – kinaza MAP regulowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi; białka Hsp (ang. *heat-shock protein*) – białka szoku cieplnego; białka Hsc (ang. *heat-shock cognate*) – białka szoku cieplnego syntetyzowane konstytutywnie; HSE – sekwencja w promotorach genów, do której wiążą się czynniki transkrypcyjne Hsf (ang. *heat-shock element*); JNK, p38 – kinazy MAP aktywowane stresem; LPS – lipopolisacharyd; PAMPs (ang. *pathogen-associated molecular patterns*) – wzorce molekularne charakterystyczne dla patogenów; Slt2p (Mpk1p) – kinaza MAP w szlaku spójności komórkowej *Saccharomyces cerevisiae*; STRE – sekwencja w promotorach genów, do której wiążą się czynniki transkrypcyjne Msn2p i Msn4p; czynnik Hsf (ang. *heat-shock factor*) – czynnik transkrypcyjny aktywowany szokiem termicznym; IRAK (ang. *IL-1 receptor-associated kinase*) – kinaza zasocjowana z receptorem interleukiny 1

Podziękowania: Serdecznie dziękuję Pani prof. dr hab. Teresie Jakubowicz za cenne uwagi merytoryczne oraz Panu magistrowi Pawłowi Czubli za uwagi językowe pomocne w przygotowaniu niniejszej pracy.

obniżenie temperatury [9]. Można więc stwierdzić, że powiedzenie „co nas nie zabije, to nas wzmocni”, ma molekularne uzasadnienie.

SZOK CIEPLNY

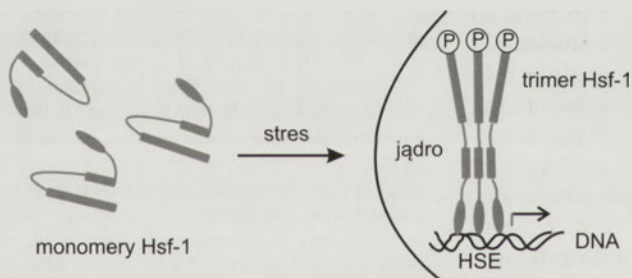
Zmiany temperatury poza zakres warunków optymalnych o 5-10°C prowadzą do szoku cieplnego [10]. U niektórych ryb może on być spowodowany wzrostem temperatury wody już do 5°C. Bakterie termofilne z kolei, dzielące się w 50°C, doświadczają szoku przy wzroście temperatury powyżej 60°C. Drożdże pączkujące *Saccharomyces cerevisiae*, dla których optymalną temperaturą wzrostu jest 28-30°C, doświadczają szoku w 35-37°C. Komórki, które nie są w stanie dostosować się do podwyższonej temperatury określa się jako termowrażliwe (Ts, ang. *temperature-sensitive*). Dla większości szczepów *Saccharomyces cerevisiae* temperatura powyżej 41°C prowadzi do śmierci komórek. Drożdże, które są w stanie przeżyć w temperaturze do 55°C określa się jako termotolerancyjne [11]. Muszka owocowa, *Drosophila melanogaster*, posiada zdolność przetrwania w zakresie od -10°C do ponad 40°C, przy czym temperaturą optymalną jest dla niej około 25°C [12].

Poddanie żywego organizmu działaniu podwyższonej temperatury powoduje wiele zmian w komórce, takich jak: denaturacja białek, powstawanie agregatów białkowych,

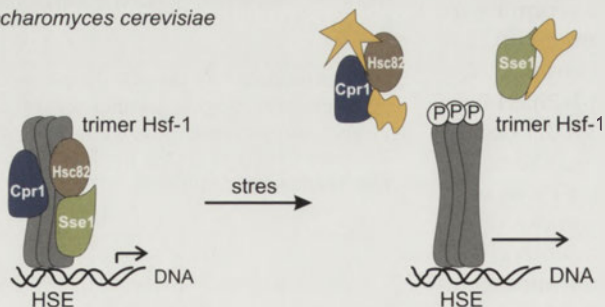
zmiany w strukturze lub płynności błon biologicznych oraz, w zależności od intensywności szoku, przejściowe zahamowanie cyklu komórkowego. Szok cieplny hamuje przede wszystkim te procesy, które są przeprowadzane przez duże kompleksy białkowe. Jednym z takich procesów jest dojrzewanie mRNA, którego zahamowanie prowadzi do kumulacji pre-mRNA i niedoboru dojrzałego mRNA, a w konsekwencji – do wstrzymania syntezy wielu białek przy jednoczesnej wzmożonej produkcji białek Hsp. Czasami długotrwały bądź zbyt drastyczny szok cieplny może okazać się dla komórki letalny. Dotychczas nie poznano wszystkich mechanizmów prowadzących do śmierci komórki w szoku cieplnym. Istnieje kilka koncepcji wyjaśnienia tego zjawiska. Jedną z możliwości jest istnienie w komórce białek istotnych do przeżycia, a wyjątkowo wrażliwych na podwyższoną temperaturę. Inna możliwość jest taka, że zdenaturowane lub/i zagregowane białka powstające w szoku cieplnym są dla komórki toksyczne. Możliwe jest również, że zaangażowanie wielu polipeptydów w odpowiedź komórki na działanie wysokiej temperatury uniemożliwia im udział w podtrzymywaniu innych, istotnych dla życia funkcji [13].

Reakcję organizmu na szok cieplny po raz pierwszy opisał w 1962 roku Ferruccio Ritossa, który zauważył, że podwyższenie temperatury hodowli muszki owocowej indukuje wzmożoną aktywność niektórych loci na chromosomach politenicznych larw [14]. Poza tym zaobserwował szczególny profil ekspresji genów w slińnikach owada w warunkach szoku cieplnego. Jednak dopiero później, bo w 1974 roku, wykazano że wiele genów ulegających intensywnej ekspresji w podwyższonej temperaturze koduje białka, które nazwano białkami szoku cieplnego [15]. Ekspresja ich genów zachodzi przy udziale czynników transkrypcyjnych z rodziny Hsf (ang. *heat-shock factor*). U ssaków zidentyfikowano cztery czynniki Hsf, z których największą ekspresję wykazują Hsf-1 i Hsf-2, przy czym Hsf-1 jest bardziej uniwersalny. W optymalnych warunkach, Hsf-1 znajduje się w cytoplazmie jako monomer, który nie jest w stanie wiązać się do DNA. W warunkach stresu jest on fosforylowany, ulega trimeryzacji, nabywając kompetencji do wiązania się do DNA. Wędruje wówczas do jądra komórkowego, gdzie wiąże się do promotorów genów docelowych [16-19]. Podobnie wygląda aktywacja czynnika Hsf u *Drosophila melanogaster* [20]. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, czynnik Hsf-1 jest niezbędny do przeżycia. W optymalnych warunkach wzrostu, w kompleksie z białkami, takimi jak Cpr7p, Hsc2p, Sse1p, wiąże się on do promotorów genów utrzymując ich ekspresję na podstawowym poziomie. W warunkach stresu, pojawienie się niesfałdowanych polipeptydów powoduje oddysocjowanie związanych z Hsf-1 białek, a tym samym jego pełną aktywację i intensywną transkrypcję genów zależnych od tego czynnika [11]. Aktywacja czynnika Hsf u ssaków i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jest schematycznie przedstawiona na Ryc. 1.

Homo sapiens



Saccharomyces cerevisiae



Rycina 1. Aktywacja czynnika Hsf u człowieka i drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. W optymalnych warunkach nieaktywne monomery Hsf u człowieka znajdują się w cytoplazmie, zaś w szoku cieplnym tworzą ufosforylowane trimery, nabywając kompetencji do wiązania DNA. Aktywny Hsf wiąże się do promotorów genów docelowych, regulując ich transkrypcję. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, czynnik transkrypcyjny Hsf, w połączeniu z białkami Hsp (które częściowo hamują jego aktywność) znajduje się w jądrze komórkowym, gdzie reguluje ekspresję wybranych genów na podstawowym poziomie. W warunkach szoku cieplnego, białka Hsp są odłączane od Hsf przez niesfałdowane bądź nieprawidłowo sfałdowane białka (kolor żółty), powodując pełną aktywację Hsf i intensywną transkrypcję genów zawierających motyw HSE. Na podstawie [11,21] - zmodyfikowane.

Geny, których transkrypcja jest regulowana przez Hsf, mają w swoich promotorach sekwencję HSE (ang. *heat-shock element*), zawierającą odwrócone, komplementarne powtórzenie motywu nGAAn, np. nTTCnnGAAnnTTCn. Liczba powtórzeń oraz dzielących je nukleotydów jest czynnikiem warunkującym ekspresję konkretnego genu przez dany czynnik Hsf. Białkami regulowanymi przez Hsf są wspo-

mniane wcześniej białka szoku cieplnego. Z drugiej strony wiadomo, że kumulacja białek szoku cieplnego hamuje aktywność czynnika Hsf i jest sygnałem do wyciszenia odpowiedzi na stres. Proces ten, zwany autoregulacją odpowiedzi na stres, ma miejsce zarówno u drożdży, owadów, jak i ludzi [18,22].

Białka szoku cieplnego można podzielić na te, które są konstytutywnie syntetyzowane - białka Hsc (ang. *heat-shock cognate*; na przykład Hsc70) oraz na indukowalne - Hsp, których produkcja zwiększa się w warunkach stresowych. Syntetyzowane w szoku cieplnym białka Hsp funkcjonują głównie jako białka opiekuńcze. Przyłączają się one do uszkodzonych białek, uniemożliwiając ich oddziaływanie z niewłaściwymi partnerami oraz przywracając im prawidłową strukturę. Białka, których struktura została nieodwracalnie uszkodzona są kierowane to proteolitycznej degradacji [23,24]. Dzięki białkom Hsp ma miejsce indukcja syntezy trehalozy - dwucukru, którego zadaniem jest ochrona białek przed denaturacją. Z tego powodu trehaloza nazywana bywa „chemicznym chaperonem” [25]. Poziom syntezy białek Hsp zmienia się w zależności od fazy cyklu komórkowego, stopnia rozwoju i różnicowania. W optymalnych warunkach wzrostu, białka szoku cieplnego odpowiadają za fałdowanie natywnych białek, zapobiegają ich niepożądaną agregacji, biorą udział w tworzeniu kompleksów białkowych, transporcie białek przez błony biologiczne, degradacji białek, a także regulacji aktywności czynników transkrypcyjnych oraz kinaz białkowych. Odgrywają one również istotną rolę w reakcjach immunologicznych u bardziej złożonych organizmów, o czym będzie mowa później. Biorąc za kryterium ich masę cząsteczkową, jak również kompleksy funkcyjne jakie tworzą, białka szoku cieplnego możemy podzielić na kilka grup. Każda z nich mogłaby być tematem oddzielnego opracowania, dlatego poniżej nakreślię jedynie ogólny obraz tych białek, odsyłając czytelnika do prac przeglądowych, charakteryzujących szczegółowo daną grupę białek.

BIAŁKA Hsp100

Białka Clp/Hsp100 należą do dużej rodziny AAA+ (ang. *ATP-ases associated with various cellular activities*). Cechuje je, między innymi, budowa oligomeryczna, obecność domen wiążących ATP typu Walker (ang. *walker-type*) oraz wykorzystywanie energii pochodzącej z hydrolizy ATP. Białka Hsp100 cechuje zdolność do rozbijania kompleksów białkowych oraz do rozwijania struktur prawidłowo zwiniętych białek. Tworzą one homoheksamery, a wiele z nich również heterooligomeryczne kompleksy z peptydazami. W pierwszym etapie białka Clp/Hsp100 rozpoznają białko docelowe, wiążą je, a następnie, wykorzystując energię z ATP, rozwijają i aktywnie transportują wewnątrz kompleksu do miejsca o aktywności peptydazy, gdzie rozwinięte białko jest degradowane. W przypadku białek nie związanych z peptydazami ma miejsce rozbicie kompleksów białkowych bądź zmiana struktury białka. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* białko Hsp104 odgrywa istotną rolę w rozpuszczaniu agregatów białkowych powstałych wskutek warunków stresowych (np. szoku cieplnego) podczas powrotu do wzrostu w warunkach optymalnych. Preinkubacja drożdży w 37°C, powoduje zwiększenie ich przeżywalności w

temperaturze 55°C, między innymi ze względu na zwiększoną ilość białka Hsp104. Więcej informacji na temat białek Hsp100 znajdzie czytelnik w pracach [26,27].

BIAŁKA Hsp90

Białka Hsp90 (zwane także HSPC) są najliczniejsze spośród wszystkich białek szoku cieplnego. W stanie fizjologicznym mogą one stanowić od 1% do 2% wszystkich protein [28]. U ludzi istnieje wiele białek należących do tej rodziny: Hsp90 α , Hsp90 β w cytoplazmie, Hsp90N – zasocjowane z kinazą Raf oraz Grp90, Trap1 odpowiednio w siateczce śródplazmatycznej i mitochondrium [29,30]. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* posiadają dwa geny kodujące Hsp90, tj. HSP82, którego ekspresja jest indukowana szokiem cieplnym, oraz HSC82, którego ekspresja zachodzi konstytutywnie [31]. Mutanty delecyjne w każdym z tych genów są żywotne, podczas gdy utrata obydwu genów jest dla drożdży letalna. *Drosophila melanogaster* posiada jeden gen kodujący Hsp90, tj. HSP83 [32]. Białka Hsp90, często w kompleksach z innymi białkami stresu (np. Hsp70), przyłączają się do polipeptydów, przywracając im bądź utrzymując je w odpowiedniej konformacji. W stanie fizjologicznego wzrostu Hsp90 wykazują pewną wybiórczość, tj. łączą się z wybranymi białkami, tzw. „klientami” Hsp90. Do tych białek należą kinazy białkowe: Src, Raf, Akt, Her2, EGFR, Abl; czynnik transkrypcyjny Hsf; czynniki translacyjne: eIF2 α , eIF4F; receptory steroidowe; białko p53 oraz telomeraza. Lista białek, u których stwierdzono oddziaływanie z Hsp90 stale rośnie (<http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>). Rolą homodimerów Hsp90 jest utrzymywanie swoich „klientów” w odpowiedniej konformacji, która umożliwia im aktywację w odpowiedzi na dany bodziec. Jest to tak zwany stan kompetencji konformacyjnej. Odgrywają więc ważną rolę w przekazywaniu sygnałów w komórce. Białka Hsp90 „współpracują” z wieloma białkami pomocniczymi i do swojej aktywności potrzebują ATP. Zmiany konformacyjne spowodowane wiązaniem ATP determinują wiązanie się Hsp90 z ich wieloma białkami pomocniczymi, co z kolei determinuje zdolność do wiązania „klientów”. Białka Hsp90 razem z Hsp40 biorą udział w regulacji aktywności czynnika transkrypcyjnego Hsf we wspomnianej wcześniej autoregulacji odpowiedzi na stres. W komórkach *Drosophila melanogaster* oraz w komórkach ssaków z zahamowaną aktywnością Hsp90 wykazano opóźnienie w nabyciu termotolerancji i wygaszeniu odpowiedzi na stres. Ponadto, zahamowanie aktywności Hsp90 prowadzi do aktywowania odpowiedzi na stres pod nieobecność stresu [19,33,34].

Szczególnie interesująca jest rola białek Hsp90 w buforowaniu zmian genetycznych, to jest niedopuszczaniu do fenotypowego ujawnienia się mutacji, które zaszły w genomie organizmu. Białka Hsp90 wiążą zmutowane białka/peptydy i nadają im strukturę umożliwiającą prawidłowe wykonywanie swoich funkcji. Te utajone mutacje mogą ujawnić się w warunkach niedoboru białka Hsp90, na przykład w silnym stresie, kiedy Hsp90 są zaangażowane w łagodzenie jego skutków. Osobniki z wyrażoną w fenotypie mutacją podlegają wówczas prawom doboru naturalnego Darwina [35,36].

RODZINA BIAŁEK Hsp70/Hsp40

Genom człowieka zawiera 13 genów kodujących białka rodziny Hsp70 (zwanej także rodziną HSPA), muszka owocowa *Drosophila melanogaster* i drożdże *Saccharomyces cerevisiae* posiadają odpowiednio 12 i 14 genów dla Hsp70, zaś *Escherichia coli* - jedynie trzy [37]. Białka Hsp70 mieszczą się w różnych przedziałach komórkowych, jak cytosol, światło siateczki śródplazmatycznej czy mitochondrium. Stabilizują one nowopowstające polipeptydy już w trakcie ich syntezy na rybosomie i transportu przez błony biologiczne. Odbywa się to przy współudziale białek pomocniczych z rodziny Hsp40 (zwanej także rodziną DnaJ) oraz z wykorzystaniem energii czerpanej z hydrolizy ATP. Warto zaznaczyć, że polipeptydy ze znacznym uszkodzeniem struktury mogą być kierowane do degradacji w systemie zależnym od ubikwiny [38].

Ekspresja genów kodujących białka z rodziny Hsp70 znacznie zwiększa się w stresie; niektóre z nich ulegają ekspresji tylko w warunkach stresowych co umożliwia „naprawę” uszkodzonych białek oraz syntezę nowych. Należy również wspomnieć, że białka należące do rodziny Hsp70 hamują apoptozę poprzez powstrzymywanie tworzenia apoptosomu oraz blokowanie aktywacji kinaz z rodziny p38 i JNK indukowanych stresem, a także biorą udział w rozbijaniu niepożądaných agregatów białkowych. Z tego powodu określa się je mianem molekularnych detergentów. Warto zauważyć, że u ssaków, między innymi ze względu na swoje antyapoptotyczne właściwości, białka Hsp70 odgrywają rolę w nowotworzeniu. W komórkach nowotworowych obserwuje się zwiększony poziom Hsp70. Więcej informacji dotyczących rodziny Hsp70 czytelnik może zna-

leźć w kilku opublikowanych ostatnio pracach przeglądowych [39-43].

RODZINA BIAŁEK Hsp60/Hsp10

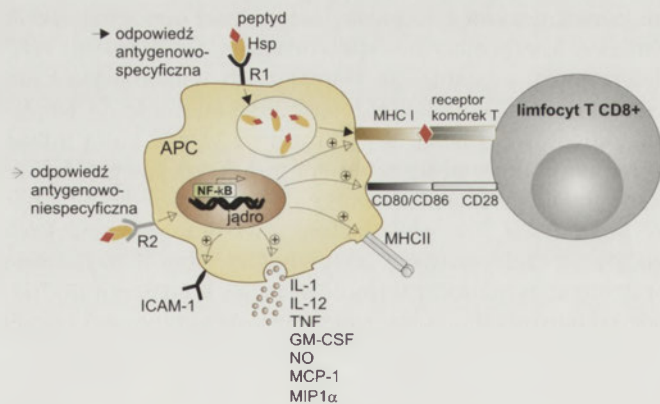
Podobnie do Hsp70, rodzina białek Hsp60 (zwana także rodziną HSPD) bierze udział w dojrzewaniu białek [44]. Razem z białkami pomocniczymi - Hsp10 (GroES u Prokaryota) - tworzą wielocząsteczkowe kompleksy, wewnątrz których powstaje środowisko, sprzyjające prawidłowemu fałdowaniu białka [44-47]. Warto zaznaczyć, że białka Hsp60 są bardzo immunogenne [48]. Bakteryjne GroEL wielu patogenów silnie indukuje zarówno komórkową, jak i humoralną odpowiedź immunologiczną [47,49].

MAŁE BIAŁKA SZOKU CIEPLNEGO

Do grupy sHsp (ang. *small Hsp*, HSPB) należą białka o masie cząsteczkowej od 12 do 43 kDa [50]. Tworzą one funkcyjne oligomery składające się z 12-24 podjednostek. Każda z nich zawiera ściśle zachowaną domenę α -kryształy oraz słabo zachowane w ewolucji domeny N-końcową i krótką C-końcową [51]. Przykładami białek sHsp są: Hsp26, Hsp42 u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, Hsp27/26/22/23 u *Drosophila melanogaster* czy Hsp25/27, Hsp20, HspB2/B3 u ssaków. Ekspresja genów kodujących białka sHsp zależy od warunków wzrostu, stopnia rozwoju tkanki/narządu czy stopnia zróżnicowania. Nadekspresja genów niskocząsteczkowych białek Hsp prowadzi do nabycia termotolerancji [52]. W przeciwieństwie do pozostałych białek, sHsp nie wymagają do swojej aktywności ATP [53]. Konsekwencją tego jest brak zdolności tych białek do fałdowania polipeptydów. Ich rolą jest jedynie wiązanie zdenaturowanych białek i ich ochrona przed tworzeniem agregatów i precipitacją. Tak chronione białka mogą być następnie poddane fałdowaniu przez kompleksy białek opiekuńczych zależne od ATP. Z tego powodu, małe białka Hsp nazywane są białkami podtrzymującymi (ang. *holding chaperones*) [54-56].

ROLA BIAŁEK SZOKU CIEPLNEGO W ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ

Białka szoku ciepłego od wielu lat są przedmiotem zainteresowania immunologów. Ich synteza wzrasta w czasie zakażenia czy uszkodzenia tkanki. Z uwagi na swą funkcję białek opiekuńczych, wiążą się z wieloma różnymi polipeptydami. Oznacza to, że w danym czasie, w każdej komórce znajdują się białka Hsp związane z całą gamą różnych peptydów, stanowiących niejako „bibliotekę” peptydów komórkowych. Wśród nich znajdują się peptydy prawidłowe, jak również nieprawidłowe, powstające w warunkach stresu równie czy w wyniku mutacji. Te nietypowe peptydy mogą być ekspozowane na powierzchni komórki, stanowiąc sygnał, że dana komórka jest chora. Kiedy zmiany w komórkach są znaczne, dochodzi do ich lizy, a zawartość, w tym białka szoku ciepłego związane z peptydami, wydostaje się do przestrzeni międzykomórkowych, co stanowi sygnał niebezpieczeństwa dla układu immunologicznego. Aktywowana jest wówczas odpowiedź skierowana przeciw tym nietypowym komórkom (nowotworowym, zakażonym lub uszkodzonym). U ssaków białka Hsp w kompleksie z antygenami nowotworowymi są rozpoznawane przez komórki

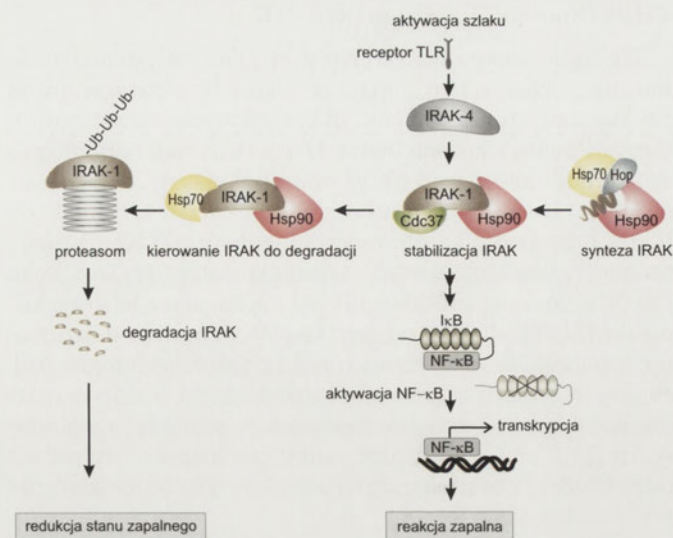


Rycina 2. Rola białek szoku ciepłego w stymulacji odpowiedzi immunologicznej. Białko szoku ciepłego (np. Gp96, Hsp70, Hsp90) w połączeniu z peptydem wiąże się do receptora R1 (np. CD91) komórki prezentującej antygen (APC), ulega włączeniu, po czym peptyd jest prezentowany przez MHC klasy I limfocytom T. Prowadzi to do powstania limfocytów T pamięci immunologicznej skierowanych przeciwko prezentowanym peptydom. Antygenowo niespecyficzna odpowiedź polega na oddziaływaniu kompleksu z receptorem R2 (np. TLR2, TLR4, CD36, CD91, CD40) i aktywacji komórki prezentującej antygen, czego skutkiem jest uwolnienie mediatorów oraz związków cytotoksycznych a także wzrost syntezy MHC klasy I i II, oraz kostymulatorów CD80/86. IL - interleukina; TNF - czynnik martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor*); GM-CSF - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*); NO - tlenek azotu; MCP-1 - białko chemotaktyczne monocytów (ang. *monocyte chemotactic protein*); MIP1 α - białko zapalne makrofagów (ang. *macrophage inflammatory protein*); APC - komórka prezentująca antygen (ang. *antigen-presenting cell*). Na podstawie [21,57,58] - zmodyfikowane.

układu immunologicznego, zwane komórkami prezentującymi antygen (APC, ang. *antigen-presenting cells*). Następnie kompleks peptyd - Hsp jest transportowany do węzłów chłonnych, po czym antygen pojawia się na powierzchni APC i jest prezentowany limfocytom T. Jednocześnie w komórkach APC stymulowany jest drugi receptor (np. CD36), co prowadzi do uwolnienia mediatorów układu immunologicznego oraz syntezy kostymulatorów (CD80/ CD86). Powstaje więc pula limfocytów T „zaprogramowanych” na wyszukiwanie komórek noszących te anormalne peptydy (Ryc. 2). Poznanie tego zjawiska ma ogromne znaczenie w opracowywaniu szczepionek przeciwnowotworowych. Technologia ta opiera się na naśladowaniu sygnału niebezpieczeństwa poprzez iniekcję do organizmu kompleksów peptydy- białka szoku ciepłego (Grp96, Hsp70, Hsp90, Hsp110, Grp170) otrzymanych z komórek nowotworowych. Ta wcześniej wspomniana „biblioteka” peptydów, charakterystyczna dla danego typu nowotworu, nazywana jest czasami jego antygenowym odciskiem palca i zawiera, na przykład, fragmenty onkoprotein czy antygeny embrionalne, powstałe w wyniku derepresji niektórych genów w transformowanych komórkach dojrzałego organizmu [59,60]. Jak wykazano na myszach, jeśli w tak zaszczepionym organizmie pojawią się komórki tego samego typu nowotworu, zostaną one natychmiast rozpoznane i odrzucone przez układ immunologiczny [61-63]. Obecnie powyższe obserwacje mają zastosowanie kliniczne w immunoterapii nowotworów [64,65].

Jednak rola białek Hsp w modulacji aktywności układu immunologicznego jest bardziej złożona. Istnieją doniesienia o przeciwzapalnym działaniu białek szoku ciepłego. Własne białka Hsp czy, ogólnie, własne białka stresu (SP) są prezentowane limfocytom T o niskim powinowactwie, zwykle bez kostymulacji, pod nieobecność czynników zapalnych. Są one rozpoznawane przez te limfocyty jako własne (*self*), skutkiem czego jest uwalnianie immunosupresyjnych cytokin (IL-4, IL-10). Peptydy związane z takimi białkami Hsp są zwykle prawidłowe, a więc słabo immunogenne [58]. Warto zaznaczyć, że w chorobach, takich jak artretyzm, choroba Behceta i toczeń trzewny, obserwuje się aktywność układu immunologicznego skierowaną przeciwko własnym białkom szoku ciepłego.

Wykazano także, że w czasie zakażenia białka Hsp wiążą się do peptydów patogenu i w ten sposób wzmacniają ich immunogenność, działają więc jak adiuwanty [66-68]. Poza tym, mogą one wiązać nie tylko białkowe cząsteczki patogenu. Na przykład, Hsp90 wiąże niezmetylowany motyw CpG w DNA, charakterystyczny dla bakterii oraz (podobnie jak Gp96) wiąże lipopolisacharyd. Związanie bakteryjnych struktur z białkami Hsp ułatwia ich oddziaływanie z receptorami TLR (ang. *Toll-like receptor*). Receptory te, znajdujące się na powierzchni komórek układu immunologicznego, rozpoznają i wiążą struktury charakterystyczne dla patogenu (PAMPs). U ssaków zidentyfikowano 12 tego typu receptorów i nazwano TLR1-TLR12. Przyłączenie ligandu do receptora TLR powoduje stymulację kaskad sygnałowych, co prowadzi m.in. do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. [69,70]. Czynnikiem ten reguluje ekspresję genów w odpowiedzi zarówno na stres, jak i na zakażenie. Aktywacja NF- κ B polega, między innymi, na fosforylacji związanego



Rycina 3. Rola białka Hsp90 w aktywacji makrofagów przez szlak TLR. Aktywacja receptora TLR, a następnie białka IRAK-4 i IRAK-1 prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i do wzrostu ekspresji genów czynników prozapalnych. Hsp90 w kompleksie z Hsp70 oraz białkiem Hop umożliwia uzyskanie prawidłowej konformacji przez nowosyntetyzowane białko IRAK-1. Następnie, w kompleksie z białkiem pomocniczym Cdc37, Hsp90 wiąże dojrzałe białko IRAK-1, co chroni je przed degradacją. Przy niedostatecznej ilości kompleksu Hsp90/Cdc37 wiązanie białka Hsp70 prowadzi do ubikwitylacji IRAK-1, skutkiem czego jest skierowanie białka do proteolitycznej degradacji. Ma wówczas miejsce wyciszenie szlaku prowadzącego do aktywacji NF- κ B. Według [73]-zmodyfikowane.

z nim inhibitorem I κ B przez kompleks kinaz IKK (ang. *I κ B-kinase*). Powoduje to uwolnienie aktywnego czynnika i jego translokację do jądra komórkowego. Białka Hsp odgrywają również istotną rolę w dalszych etapach przekazywania sygnału. Mianowicie, stabilizacja kompleksu IKK jest możliwa dzięki białkom szoku ciepłego Hsp70 i Hsp90. Odłączenie tych białek w warunkach silnego stresu bądź ich dezaktywacja, prowadzi do zahamowania szlaku i wyciszenia reakcji zapalnej [71,72].

Kolejnym przykładem udziału białek Hsp w przekazywaniu sygnałów poprzez szlak TLR jest ich rola w stymulacji makrofagów (Ryc. 3). Makrofagi, jak wiadomo, są istotnym składnikiem odporności wrodzonej, wytwarzają bowiem cytokiny zapalne (na przykład TNF α , IL-1), posiadają zdolności fagocytarne, jak również biorą udział w stymulacji odporności swoistej. Receptor TLR4 jest aktywowany przez lipopolisacharyd (LPS), zaś TLR9 – przez niezmetylowaną sekwencję CpG. Związanie ligandu do receptora TLR prowadzi do aktywacji IRAK-4, a następnie IRAK-1 (ang. *IL-1 receptor-associated kinase*). Prowadzi to do aktywacji czynnika NF- κ B oraz szlaków kinaz MAP, a w konsekwencji – do uwolnienia czynników prozapalnych. W utrzymaniu IRAK-1 w stabilnej strukturze funkcjonalnej bierze udział białko Hsp90, wspomagane przez Cdc37. W podwyższonej temperaturze (np. gorączka) wzrasta ilość kompleksów IRAK-1/Hsp90/Cdc37. Jeśli ilość Hsp90/Cdc37 jest niewystarczająca, po przyłączeniu Hsp70 IRAK-1 zostaje zdegradowane w systemie zależnym od ubikwityny. Nastąpi wówczas wyciszenie aktywności szlaku i wygaśnięcie reakcji zapalnej. Tak więc wiązanie odpowiedniego „zestawu” białek szoku ciepłego do IRAK-1 może wpływać na aktywację/wyci-

szanie szlaków przekazywania sygnałów w komórkach układu immunologicznego (Ryc. 3) [73].

Opisując funkcje białek Hsp w regulacji odpowiedzi immunologicznej, warto dodać, że białka Hsp patogenów są czynnikami stymulującymi układ odpornościowy gospodarza. Również własne białka Hsp zakażonego organizmu mogą modulować jego układ immunologiczny. Wykazano, że Hsp60 stymulują produkcję interleukin (IL-1, IL-6, IL-12, IL-15) oraz czynnika martwicy nowotworu (TNF- α) przez monocyty/makrofagi oraz stymulują limfocyty T. Z kolei Hsp70 stymulują produkcję IL-1 i TNF α przez te same komórki [74,75]. Białka rodziny Hsp90 stymulują dojrzewanie komórek dendrytycznych oraz produkcję cytokin [76]. Więcej informacji na temat roli białek stresu w odpowiedzi immunologicznej znajdzie czytelnik w pracach przeglądowych [21,77,78]. Rola białek szoku cieplnego w stymulacji odpowiedzi immunologicznej u ssaków jest schematycznie podsumowana na Ryc. 4.

Jaką rolę ogrywają białka szoku cieplnego w odporności bezkręgowców? Na początku należałoby ogólnie przedstawić jakie są różnice między odpowiedzią immunologiczną ssaków i bezkręgowców. Przede wszystkim u tych ostatnich występuje tylko odporność wrodzona, która wykazuje zarówno strukturalne, jak i funkcjonalne podobieństwo do odporności wrodzonej ssaków. Pojawiają się wprawdzie prace sugerujące pewien rodzaj pamięci immunologicznej u bezkręgowców, jednak jest on ewolucyjnie różny od typowej odporności swoistej ssaków [79]. Owady stanowią prosty model badawczy, bowiem ich wrodzona odporność nie jest „zakłócona” odpornością nabytą. Ponieważ mechanizmy odporności wrodzonej u ssaków odgrywają istotną rolę w czasie zakażenia patogenami, wyniki otrzymane z wykorzystaniem owadów jako organizmów modelowych często mają swoje przełożenie na mechanizmy odporności u ssaków. Z tego powodu owady są wykorzystywane do badania wirulentności wielu patogenów człowieka, np. *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*

[80-82], jak również do badania skuteczności leków przeciw patogenom, zanim zostaną one przetestowane na ludziach [83-84]. W odpowiedzi na zakażenie u owadów aktywowane są dwa szlaki przekazywania sygnału: Toll i/lub Imd prowadzące do aktywacji czynników transkrypcyjnych Dif i Relish (homologi NF- κ B). Następuje wówczas ich translokacja do jądra komórkowego i indukcja ekspresji genów peptydów odpornościowych. U owadów nie ma przeciwciał, a jedynie peptydy o aktywności przeciwbakteryjnej i/lub przeciwgrzybowej syntetyzowane głównie przez ciało tłuszczowe oraz hemocyty [85]. U owadów z przeobrażeniem pełnym peptydy są indukowane, zaś u tych z przeobrażeniem niepełnym mogą być obecne w ciele tłuszczowym lub hemocytach i uwalniane wskutek zakażenia. Należy pamiętać, że peptydy odpornościowe nie są swoiste, w tym znaczeniu jak swoiste są przeciwciała w stosunku do danego antygeny. Dany organizm stale dysponuje pulą tych samych genów kodujących peptydy odpornościowe, a ilość i rodzaj syntetyzowanych w danych warunkach peptydów zależą od rodzaju zakażenia: bakterie Gram-dodanie, Gram-ujemne, grzyby czy pierwotniaki.

Stosunkowo niewiele wiadomo jak szok cieplny wpływa na mechanizmy odpornościowe bezkręgowców. Wykazano, że u nicienia *Caenorhabditis elegans* podczas zakażenia aktywowany jest czynnik transkrypcyjny Hsf-1. Aktywacja tego czynnika odgrywa istotną rolę w zwiększonej odporności nicienia na zakażenia w warunkach szoku cieplnego. Postuluje się tu również rolę Hsp90, którego odłączenie od Hsf-1 w podwyższonej temperaturze powoduje translokację czynnika transkrypcyjnego do jądra komórkowego i ekspresję genów kodujących białka/peptydy odpornościowe [86,87]. Również hodowla immunizowanych gąsienic barciaka większego *Galleria mellonella* w warunkach umiarkowanego szoku cieplnego czy też ekspozycja gąsienic na krótkotrwały szok cieplny przed zakażeniem pozytywnie wpływa na aktywność odpornościową hemolimfy oraz ekspresję genów peptydów odpornościowych. Co za tym idzie, owady poddane działaniu szoku cieplnego przed zakażeniem takimi entomopatogenami, jak *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis* czy *Beauveria bassiana* wykazują nieco większą odporność w porównaniu z owadami, które nie były ekspozowane na działanie wysokiej temperatury [88-91]. Nieznane są molekularne mechanizmy powyższych obserwacji. Badania wskazują na rolę białek szoku cieplnego Hsp90. Z uwagi na to, że biorą one udział w utrzymaniu kompetencji konformacyjnej niektórych kinaz MAPKKK (np. Src), mogą odgrywać istotną rolę w aktywowaniu układu immunologicznego owadów. Wykazano bowiem, że kinaza JNK ulega intensywnej fosforylacji po iniekcji LPS [88], jednak iniekcja mieszaniny żywych bakterii i drożdży indukuje wszystkie szlaki kinaz MAP (Wojda i inni, dane niepublikowane). Z drugiej strony samo białko Hsp90 i/lub produkty jego degradacji mogą działać jako cząsteczki sygnałowe w mechanizmach aktywacji szlaków odpornościowych [89]. Również możliwe jest, że podobnie jak u *C. elegans*, Hsp90 może odgrywać rolę w aktywacji czynnika Hsf. Wyniki badań prowadzonych w naszym laboratorium wskazują, że aktywność Hsp90 może mieć wpływ na skuteczność niektórych mechanizmów przebijania się entomopatogenów przez mechanizmy odpornościowe zakażonych owadów (Kowalski i inni, dane niepublikowane).



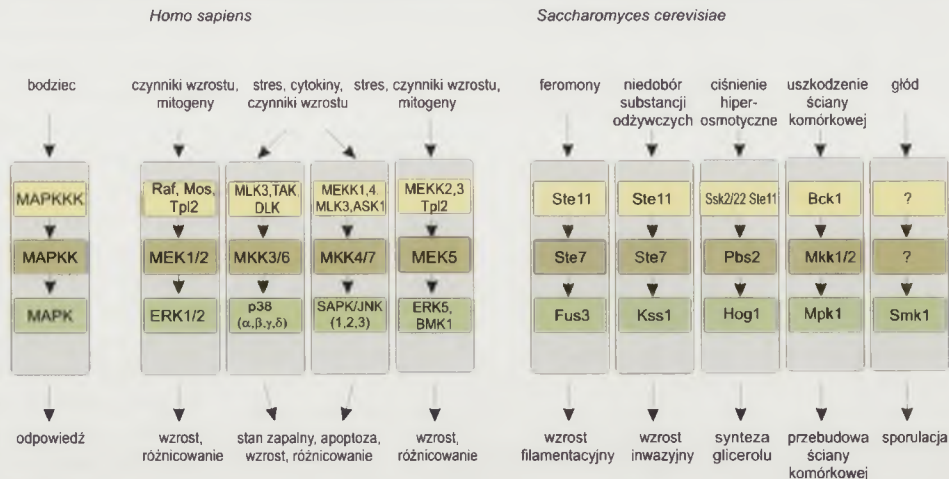
Rycina 4. Schemat podsumowujący udział białek Hsp w stymulacji układu immunologicznego ssaków. Objaśnienia w tekście.

SZLAKI PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW W KOMÓRCIE AKTYWOWANE W WARUNKACH SZOKU CIEPLNEGO

Komórki eukariotyczne rozwinęły szereg szlaków przekazywania sygnałów umożliwiających detekcję, przekazanie, amplifikację sygnału oraz odpowiedź pozwalającą na adaptację do danych warunków, w tym podwyższonej temperatury. Takimi szlakami bardzo dobrze zachowanymi w całym świecie eukariotycznym są szlaki kinaz MAP (ang. *mitogen-activated protein kinases*). Sercem takiego szlaku jest kaskada trzech kinaz: MAPKKK (MEKK), MAPKK (MEK) oraz MAPK (Ryc. 5). Pierwsze z nich, MAPKKK, po aktywacji fosforyluje i aktywują MAPKK, czyli kinazy kinaz MAP.

MAPKK są enzymami o podwójnej specyficzności, to znaczy przenoszą reszty fosforanowe zarówno na treoninę, jak i tyrozynę w motywie Thr-X-Tyr, gdzie X oznacza aminokwas charakterystyczny dla danej kinazy MAP. U ssaków główne szlaki kinaz MAP to: szlak ERK (ang. *extracellular signal-responsive kinase*), prowadzący do aktywacji kinaz ERK1/2, oraz ERK5, szlaki prowadzące do aktywacji kinaz p38 i JNK (ang. *stress-activated protein kinases* - SAPKs/JNKs). Ogólnie przyjmuje się, że szlak ERK1/2 jest aktywowany przez mitogeny oraz czynniki wzrostu, zaś szlaki p38 oraz JNK – w warunkach stresowych, takich jak promieniowanie UV, uszkodzenie mechaniczne, stres oksydacyjny czy szok cieplny. Informacje dotyczące aktualnej wiedzy odnośnie szlaków kinaz MAP znajdzie czytelnik w pracy przeglądowej [92]. Wiadomo, że aktywacja szlaku ERK w warunkach umiarkowanego szoku cieplnego zależy od rodzaju komórek/tkanki. Przejściową fosforylację kinaz ERK1/2 obserwuje się np. w fibroblastach [93]. Szlaki JNK oraz p38, aktywowane są zarówno w warunkach umiarkowanego, jak i drastycznego szoku cieplnego. Warto jednak wspomnieć, że aktywacja szlaku JNK w silnym szoku cieplnym jest niezależna od białka Rac1 [94].

Uważa się, że kinazy ERK są enzymami, których aktywacja sprzyja przeżyciu komórek (działanie antyapoptotyczne), podczas gdy szlaki kinaz SAPK/JNK i p38 są proapoptotyczne. Uogólniając, stosunek jaki istnieje między stopniem aktywacji szlaku ERK a SAPK/JNK i p38 jest czynnikiem determinującym przeżycie lub wejście komórki w apoptozę. Zależność ta nie jest jednak ścisła i zależy od rodzaju i siły stresu [95,96]. Poza szlakami kinaz MAP, w warunkach umiarkowanego szoku cieplnego u ssaków, aktywowane są również szlaki kinaz PI3K-Akt/PKB-GSK-3β, a także szlak oksydazy NADPH. Aktywacja szlaków w warunkach umiarkowanego szoku cieplnego prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego Hsf, ekspresji genów białek szoku cieplnego, a także do syntezy cykliny D1 [93]. Umiarkowany szok cieplny bowiem w komórkach ssaków pozytywnie reguluje przechodzenie do kolejnych etapów cyklu komórkowego oraz różnicowanie, podczas gdy dra-



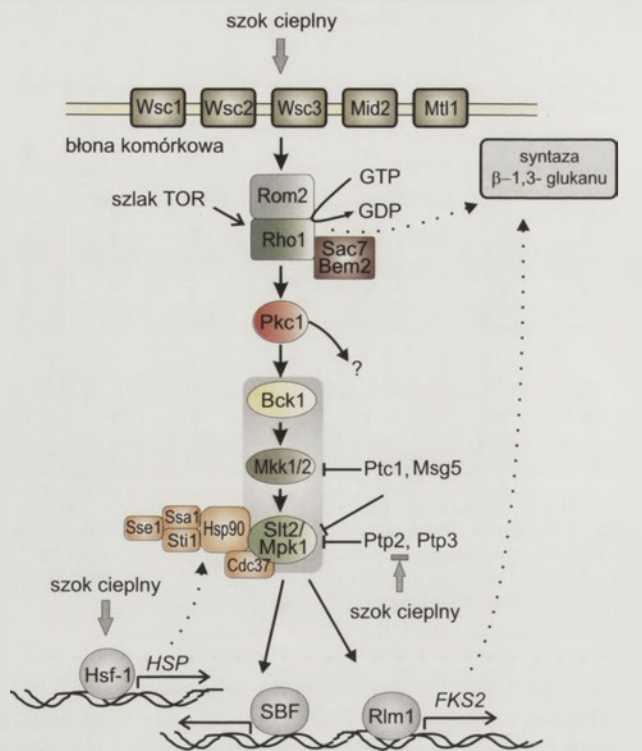
Rycina 5. Szlaki kinaz MAP u człowieka i drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. U ssaków w warunkach szoku termicznego aktywowane są szlaki p38 oraz JNK. W zależności od rodzaju komórek może być również stymulowany szlak ERK. U *Saccharomyces cerevisiae* w podwyższonej temperaturze obserwuje się wzrost aktywności szlaku PKC oraz przejściowo szlaku HOG, jednak wszystkie szlaki są ze sobą strukturalnie i funkcjonalnie powiązane. Pomiędzy kinazami MAP ssaków i drożdży występuje wysoka homologia.

styczny szok cieplny prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego i apoptozy. Różnice pomiędzy odpowiedzią komórki ssaczkiej na umiarkowany i drastyczny szok cieplny opisane są w pracy przeglądowej [94].

Szlaki kinaz MAP istnieją w całym świecie eukariotycznym. U drożdży pączkujących *Saccharomyces cerevisiae* istnieje 5 szlaków kinaz MAP aktywowanych przez szok osmotyczny, feromony, dostępność składników odżywczych czy szok cieplny. Szlaki kinaz MAP u ssaków i drożdży zestawione są na Ryc. 5.

O wysokim zachowaniu w ewolucji sekwencji kinaz MAP może świadczyć fakt, że drożdżowa kinaza Hog1p (ang. *high osmolarity glycerol kinase*) wykazuje około 50% identyczności w stosunku do p38 człowieka [97]. To pokrewieństwo kinaz MAP jest nie tylko strukturalne, ale i funkcjonalne. Na przykład ssacze kinazy p38 czy JNK mogą zastępować nieobecność Hog1p u drożdży w warunkach ciśnienia hipertonicznego. Poza tym kinaza ERK5 człowieka, może funkcjonalnie zastąpić kinazę Mpk1p *S. cerevisiae*, aktywowaną m.in. w szoku cieplnym [98].

U drożdży *S. cerevisiae* szlakiem, którego aktywność znacznie wzrasta w warunkach szoku cieplnego jest szlak kinazy białkowej C (PKC), zwany inaczej szlakiem spójności komórkowej (Ryc. 6). Receptorami szlaku są Wsc1-4p, Mid2p, Mtl1p - wszystkie posiadają jedną domenę transbłonową, sekwencję sygnałową w końcu N łańcucha oraz intensywnie glikozylowaną domenę zewnątrzkomórkową. Receptory te wykazują podobieństwo do ssaczych receptorów integryn [99]. Centralnym elementem szlaku jest kinaza białkowa C (Pkc1p) – jedyna izoforma PKC u drożdży [100]. Związanie GTP do białka Rho1p umożliwia przyłączenie i aktywację Pkc1p. Aktywność Rho1p jest stymulowana przez czynniki wymieniające GDP na GTP, to jest Rom1p i Rom2p, natomiast hamowana przez białka stymulujące jego aktywność GTP-azową, to jest Sac7p oraz Bem2p. Białko Rho1p jest podjednostką regulatorową syntazy β- gluka-



Rycina 6. Szlak spójności komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Sygnał pochodzący z receptorów błonowych jest przekazywany na białko Rho1p. Białkami regulującymi jego aktywność są Rom1p i Rom2p - czynniki wymieniające GDP na GTP oraz Sac7p i Bem7p, które stymulują aktywność GTP- azową Rho1p. Następnie aktywowana jest kinaza Pkc1p oraz moduł kinaz MAP: Bck1p, Mkk1/2p oraz Slt2p/Mpk1p, a w końcu czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję genów, których produkty białkowe wpływają na strukturę/właściwości ściany komórkowej. W wyciszeniu szlaku biorą udział fosfatazy białkowe: Ptc1p, Ptp2p, Ptp3p, Msg5p. Białka szoku cieplnego umożliwiają prawidłową konformację kompleksu Slt2p z czynnikami transkrypcyjnymi SBF i Rlm1p. Aktywacja czynników transkrypcyjnych SBF i Rlm1p przez Slt2p jest możliwa dzięki białkom Hsp. Szlak PKC jest także regulowany przez szlak TOR (ang. *target of rapamycin*), kontrolujący wzrost drożdży w zależności o dostępności składników pokarmowych.

nu, która stymuluje aktywność podjednostki katalitycznej Fks1p lub Fks2p. Aktywność kompleksu syntazy glukanu jest niezbędna w procesach przebudowy ściany komórkowej, na przykład w czasie pączkowania czy w szoku cieplnym. Moduł kinaz MAP aktywowany przez Pkc1p tworzą: MAPKKK - Bck1p; MAPKK - Mkk1p, Mkk2p; MAPK - Slt2p, przez innych autorów zwana Mpk1p [101]. Stymulacja szlaku PKC w szoku cieplnym prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych Rlm1p oraz kompleksu SBF (Swi4p i Swi6p), które kontrolują ekspresję genów zaangażowanych w metabolizm ściany komórkowej, w tym wspomnianej wyżej podjednostki katalitycznej syntazy glukanu Fks1p. Mutanty w szlaku spójności mają ścianę komórkową cieńszą i mniej wytrzymałą. Cechuje je, między innymi, termowrażliwość, wrażliwość na kofeinę oraz odporność na działanie calcofluoru, a także liza komórek po podziałaniu feromonu na wczesnym etapie tworzenia filamentów. Wzrost takim komórkom umożliwia obecność w podłożu tzw. osmotycznego stabilizatora (sorbitol, NaCl), który od zewnątrz równoważy nacisk, wywierany przez turgor komórki na ścianę komórkową [102]. Mutanty delecyjne *pkc1* wykazują znacznie silniejszy fenotyp niż mutanty w kinazach MAP, co dowodzi dywergencji szlaku w tym punkcie.

W tym miejscu warto pokrótce napisać jak zbudowana jest ściana komórkowa *Saccharomyces cerevisiae*. Stanowi ona aż 20 do 30% suchej masy drożdży. Warstwa wewnętrzna, która zapewnia ścianie komórkowej elastyczność, zbudowana jest z polimerów D-glukozy tworzących β -glukan (80-90% stanowią połączenia β -1,6- glikozydowe, zaś 8-18% to wiązania β -1-3-glikozydowe) oraz chityny (1 do 2%). Warstwę zewnętrzną, zapewniającą ochronę przed enzymami degradującymi ścianę komórkową stanowią glikozylowane mannoproteiny: glikozylfosfatydyloinozytole (GPI) oraz białka Pir1p do Pir4p. Zmiany zachodzące w ścianie komórkowej w czasie cyklu komórkowego czy stresu mogą być jakościowe, związane z wbudowaniem bądź usunięciem konkretnych białek i ilościowe, czyli zmiany proporcji poszczególnych składników [99]. Warto zaznaczyć, że to właśnie składniki ściany komórkowej drożdży, głównie β -glukany, są elementami rozpoznawanymi przez układ immunologiczny zakażonego organizmu.

Badania prowadzone w ciągu ostatnich dwóch lat wskazują na ścisłą zależność między aktywnością czynnika Hsf-1 drożdży a zdolnością kinazy Slt2p/Mpk1p do aktywacji czynników transkrypcyjnych Rlm1p i SBF w szoku cieplnym. Jak wiadomo, aktywacja czynnika Hsf-1 prowadzi do indukcji ekspresji genów kodujących Hsp90. Wykazano, że Hsp90 stabilizuje i utrzymuje w stanie aktywnym kinazę MAP- Slt2p. Umożliwia to oddziaływanie tego enzymu z czynnikami Rlm1p i SBF, a w konsekwencji - ekspresję odpowiednich genów i wzmocnienie ściany komórkowej. Mutant w C-końcowej domenie transaktywacyjnej Hsf-1, wykazujący znacznie niższy poziom Hsp90 w szoku cieplnym, jest termowrażliwy wskutek zahamowania indukcji genów zależnych od Rlm1p [103]. W dalszych badaniach wykazano, że oprócz Hsp90 i jego białka pomocniczego Cdc37, w stabilizacji Slt2p biorą również udział Hsp70 (Ssa1p), Hsp110 (Sse1) oraz Sti1p (białko pomocnicze współpracujące z Hsp90 oraz białko stymulujące aktywność GTP-azową Ssa1p). Udział tych białek w aktywacji Rlm1p oraz SBF przez Slt2p jest na tyle ważny, że mutanty defektywne w syntezie Hsp90 lub Sse1p posiadają fenotyp typowy dla mutantów w szlaku spójności komórkowej (PKC). Są mianowicie niezdolne do wzrostu w podwyższonej temperaturze bez osmotycznego stabilizatora [104]. Udział białek szoku cieplnego w regulacji ekspresji genów zależnych od Rlm1i SBF przez szlak PKC jest uwzględniony na Ryc. 6.

Wspomnę jeszcze, że do zwiększenia poziomu fosforylacji Slt2p w szoku cieplnym przyczyniają się dwa impulsy. Po pierwsze, aktywacja szlaku PKC „od góry” prowadząca do aktywacji kolejnych składników, a w końcu - do aktywacji modułu kinaz MAP, i po drugie, sygnał z niewiadomego dotąd źródła, który powoduje dezaktywację fosfataz defosforylujących kinazę Slt2p w szoku cieplnym [8]. Wzrost poziomu fosforylacji Slt2p ma miejsce dopiero po około 20 minutach od podwyższenia temperatury hodowli drożdży i osiąga maksimum po 30 minutach. Sugeruje to, że szlak PKC nie rozpoznaje bezpośrednio wysokiej temperatury, ale sygnał wtórny. Może nim być znaczny wzrost stężenia trehalozy w cytoplazmie (dochodzący niekiedy do 0.5 M) skutkujący wzrostem ciśnienia osmotycznego wewnątrz komórki. Powoduje to nacisk na błonę komórkową drożdży i aktywację receptorów szlaku PKC.

Podwyższona temperatura nie jest jedynym czynnikiem aktywującym szlak spójności komórkowej drożdży. Fosforylację kinazy Slt2p obserwuje się także w innych warunkach, które wymagają przebudowy ściany komórkowej, to jest w szoku hiposmotycznym, w procesie pączkowania, w obecności feromonów (skutkiem czego jest wzrost filamentacyjny w kierunku partnera) oraz po działaniu czynników bezpośrednio uszkodzających ścianę komórkową (np. ko-feina, calcofluor). Szlaki kinaz MAP u *Saccharomyces cerevisiae* są ze sobą funkcjonalnie powiązane [105]. Po pierwsze należy zwrócić uwagę, że szlak HOG jest aktywowany w warunkach hiperosmolarnych i jego zadaniem jest zwiększenie ciśnienia osmotycznego wewnątrz komórki, podczas gdy szlak PKC jest aktywowany w warunkach m.in. hiposmolarnych - jego zadaniem jest zmniejszenie ciśnienia osmotycznego komórki lub wzmocnienie ściany komórkowej. Kinaza MAP - Slt2p jest intensywnie fosforylowana w warunkach szoku cieplnego. Fosforylacja ta jest jednak hamowana w warunkach podwyższonego ciśnienia osmotycznego, pomimo ciągłego działania wysokiej temperatury [105,106]. Warto również wspomnieć, że w warunkach izosmolarnych szlak HOG odpowiada za prawidłowe funkcjonowanie ściany komórkowej drożdży. Mutanty defektywne w tym szlaku (*pbs2*, *hog1*) są nadmiernie wrażliwe na działanie zymolizy (preparat enzymatyczny degradujący glukan). Fenotyp ten może być odwrócony przez nadekspresję genów kodujących białka ściany komórkowej [105].

Ponadto wiadomo, że szlak HOG jest również przejściowo aktywowany w szoku cieplnym. Aktywacja ta prowadzi do kilkukrotnego wzrostu aktywności kinazy Hog1p, podczas gdy stres osmotyczny prowadzi do ponad dwudziestokrotnego wzrostu aktywności tego enzymu. Nieznana jest rola fosforylacji Hog1p w szoku cieplnym. Wykazano, że mutanty delecyjne *hog1* mają opóźniony czas powrotu do wzrostu po ustąpieniu szoku cieplnego w porównaniu ze szczepem dzikim. Aktywacja Hog1p w tych warunkach nie prowadzi do jego translokacji do jądra komórkowego, jak to ma miejsce w stresie osmotycznym. Być może aktywny Hog1p fosforyluje jakiś cytoplazmatyczny substrat, istotny w szoku cieplnym. Fosfatazy białkowe Ptp2p i Ptp3p chronią Hog1p przed hiperfosforylacją w danych warunkach oraz przed „przeciekaniem” sygnału ze szlaku PKC aktywowanego w szoku cieplnym, a konkretnie przed fosforylacją Hog1p przez Mkk1/2p, czyli kinazy MAPKK w szlaku spójności komórkowej. Mutanty z delecją fosfataz Ptp2p i Ptp3p są niezdolne do wzrostu w 37°C [107].

SZOK CIEPLNY A ODPORNOŚĆ DROŻDŻY NA STRES

Poddanie drożdży działaniu szoku cieplnego może wpływać korzystnie na ich odporność na inny rodzaj niekorzystnych zmian. Wiąże się to z aktywacją ogólnej odpowiedzi na stres, o czym wspomniano wcześniej, ale nie tylko. Mutanty w szlaku HOG (patrz Ryc. 5) są niezdolne do wzrostu w warunkach podwyższonego ciśnienia osmotycznego. Ich osmowrażliwość jest jednak znacznie zredukowana kiedy drożdże rosną w podwyższonej temperaturze [105,108]. Różnicę w odpowiedzi *Saccharomyces cerevisiae* na stres hiperosmotyczny w różnych temperaturach wyraźnie widać śledząc kinetykę fosforylacji kinazy Hog1p. Ta kinaza MAP jest intensywnie fosforylowana już po 1 minucie od zwiększenia ciśnienia osmotycznego podłoża, a poziom

jej fosforylacji utrzymuje się przez około 10-20 min w zależności od wielkości stresu. Jednak w warunkach umiarkowanego szoku cieplnego, przy tym samym ciśnieniu osmotycznym podłoża, fosforylację Hog1p obserwuje się tylko po 1 minucie! [105,106]. Poza tym kinetyka gromadzenia glicerolu w warunkach hiperosmolarnych jest odmienna w zależności od temperatury wzrostu komórek [106]. Glicerol jest bowiem głównym osmolitem u drożdży, gromadzonym w celu zrekompensowania ciśnienia osmotycznego z zewnątrz. Jego rola wydaje się być jednak bardziej intrygująca. Mutanty defektywne w szlaku produkcji glicerolu mają fenotyp wykazujący nieprawidłowe funkcjonowanie ściany komórkowej i są nadmiernie wrażliwe nie tylko na stres osmotyczny, ale również cieplny [108,109]. Do tej pory nie udało się wyjaśnić szczegółowo tych obserwacji. Wykazano, że istotną rolę w utrzymaniu spójności komórkowej w stresie hiperosmotycznym w podwyższonej temperaturze odgrywa białko Ste11p (MAPKKK), będące wspólnym składnikiem kilku szlaków przekazywania sygnałów komórkowych (patrz Ryc. 5) [105,106]. Warto również zaznaczyć, że drożdże są także mniej wrażliwe na działanie enzymów uszkodzających ścianę komórkową, kiedy rosną w warunkach umiarkowanego szoku cieplnego [106].

PODSUMOWANIE

Białka szoku cieplnego biorą udział nie tylko w procesach prawidłowego zwijania białek. Odgrywają one także ważną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Działają jak adiuwanty, wzmacniając immunogenność cząsteczek zwanych PAMPs, czyli tych związków chemicznych, które są charakterystyczne dla patogenu, a rozpoznawane przez układ immunologiczny gospodarza jako obce. Poza tym białka Hsp pełnią istotną funkcję w mechanizmach przekazywania sygnałów komórkowych, a tym samym w regulacji ekspresji genów. Szczególnie doceniana jest rola białek szoku cieplnego w indukcji aktywności przeciwnowotworowej u ludzi, co daje nadzieję na skuteczną terapię tych chorób w przyszłości. Umiarkowany szok cieplny zwiększa odporność bezkręgowców i sprzyja ich przeżyciu w czasie zakażeń. Zakażone organizmy zmiennocieplne migrują w kierunku środowiska o wyższej temperaturze, zwiększając swoją odporność. Jest to tak zwana gorączka behawioralna [110]. Owady żyjące w grupach, jak np. *Galleria mellonella*, gdzie temperatura ciała każdego z nich jest wyższa niż osobnika odizolowanego, są bardziej odporne na zakażenie. Być może właśnie dlatego owady żyjące w koloniach uzyskały dominującą pozycję w wielu niszach ekologicznych. Umiarkowany szok cieplny indukuje mechanizmy ogólnej odpowiedzi na stres, w tym ekspresję białek Hsp, dzięki czemu komórka staje się bardziej odporna na innego rodzaju niekorzystne warunki środowiska zewnętrznego czy wewnętrznego. W przypadku drożdży zmiany w komórkach, wywołane działaniem podwyższonej temperatury, mogą determinować reakcję komórek na inny rodzaj stresu, między innymi poprzez wzajemne oddziaływanie na siebie szlaków kinaz MAP.

PIŚMIENNICTWO

1. Gash AP (2003) "The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses" w *Yeast Stress Responses* Eds Hohmann S, Mager WH. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003

2. Estruch F, Carlson M (1993) Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a *SNF1* protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 13: 3872-3881
3. Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schuller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2 and Msn4 are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* 15: 2227-2235
4. Kobayashi N, Mc Entee K (1993) Identification of *cis* and *trans* components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 13: 248-256
5. Treger JM, Schmitt AP, Simon JR, Mc Entee K (1998) Transcriptional factor mutations reveal regulatory complexities of heat shock and newly identified stress genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 26875-26879
6. Marchler G, Schuller C, Adam G, Ruis H (1993) A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J* 12: 1997-2003
7. Gorner W, Durchschlag E, Martinez - Pastor MT, Estruch F, Ammerer C, Hamilton B, Ruis H, Schuller C (1998) Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* 12: 586-597
8. Hohmann S, Mager WH (2003) *Yeast Stress Response*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
9. Burton V, Mitchell HK, Young P, Petersen NS (1988) Heat shock protection against cold stress of *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 8: 3550-3552
10. Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (1994) *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
11. Trott A, Morano KA (2003) "The yeast response to heat shock" w *Yeast Stress Responses* Eds Hohmann S, MagerWH. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2003
12. Hoffmann AA, Sorensen JG, Loeschcke V (2003) Adaptation of *Drosophila* to temperature stress: bringing together quantitative and molecular approaches. *J Therm Biol* 28: 175-216
13. Riezman H (2004) Why do cells require heat shock proteins to survive heat stress? *Cell Cycle* 3: 61-63
14. Ritossa FA (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573
15. Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84: 389-398
16. Baler R, Dahl G, Voellmy R (1993) Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Mol Cell Biol* 13: 2486-2496
17. Wu C (1995) Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 441-469
18. Morimoto RI (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross-talk between a family of heat shock factors molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Develop* 12: 3788-3796
19. Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L (2001) Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* 15: 1118-1131
20. Westwood JT, Wu C (1993) Activation of *Drosophila* heat shock factor: conformational change associated with a monomer- to-trimer transition. *Mol Cell Biol* 13: 3481-3486
21. Pockley AG (2003) Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet* 362: 469-476
22. Fincato G, Polentarutti N, Sica A, Mantovani A, Colliotti F (1991) Expression of a heat inducible gene of the Hsp70 family in human myelomonocytic cells: regulation by bacterial products and cytokines. *Blood* 77: 579-586
23. Imai J, Yashiroda H, Maruya M, Yahara I, Tanaka K (2003) Proteasomes and molecular chaperones. Cellular machinery responsible for folding and destruction of unfolding proteins. *Cell Cycle* 2: 585-589
24. Kędzierska S (2005) Rola białek opiekuńczych *Escherichia coli* w ochronie komórki bakteryjnej przed nieodwracalną agregacją białek indukowaną termicznie. *Postepy Biochem* 51: 146-153
25. Singer MA, Lindquist S (1998) Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. The Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol* 16: 460-468
26. Burton BM, Baker TA (2005) Remodeling protein complexes: Insights from the AAA+ unfoldase ClpX and Mu transposase. *Protein Science* 14: 1945-1954
27. Liberek K, Lewandowska A, Ziętkiewicz S (2008) Focus Quality Control. Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J* 27: 328-335
28. Welch WJ, Feramisco JR (1982) Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J Biol Chem* 257: 14949-14959
29. Grammatikakis N, Vultur A, Ramana CV, Siganou A, Schweinfest CW, Watson DK, Raptis L (2002) The role of Hsp90N, a new member of the Hsp90 family, in signal transduction and neoplastic transformation. *J Biol Chem* 277: 8312-8320
30. Sreedhar AS, Csermely P (2004) Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy. *Pharmacol Ther* 101: 227-257
31. Borkowich KA, Farrelly FW, Finkelstein DB, Taulien J, Lindquist S (1989) Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol Cell Biol* 9: 3919-3930
32. Blackman RK, Meselson M (1986) Interspecific nucleotide sequence comparisons used to identify regulatory and structural features of the *Drosophila hsp82* gene. *J Mol Biol* 188: 499-515
33. Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI (1993) Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA- binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol* 13: 1392-1407
34. Zuo J, Baler R, Dahl G, Voellmy R (1994) Activation of DNA- binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular triple- stranded coiled- coil structure. *Mol Cell Biol* 14: 7447-7468
35. Yahara I (1999) The role of HSP90 in evolution. *Genes to Cells* 4: 375-379
36. Wong KSK, Houry WA (2006) Hsp90 at the crossroads of genetics and epigenetics. *Cell Research* 16: 742-749
37. Vos MJ, Hageman J, Carra S, Kampinga HH (2008) Structural and functional diversities between members of the human HSBP, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry* 47: 7001-7011
38. Arndt V, Rogon C, Hohfeld J (2007) To be or not to be- molecular chaperones in protein degradation. *Cell Mol Life Sci* 64: 2525-2541
39. Krawczyk Z, Lisowska K (2000) Regulacja ekspresji genów szoku termicznego hsp70i. *Postepy Biochem* 46: 24-37
40. Żylicz M, Wawrzynow A (2001) Insights into the function of Hsp70 chaperones. *IUBMB* 51: 283-287
41. Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 62: 670-684
42. Genevaux P, Georgopoulos C, Kelley WL (2007) The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. *Mol Microbiol* 66: 840-857
43. Meimaridou E, Gooljar SB, Chapple JP (2009) From hatching to dispatching: the multiple cellular roles of the Hsp70 molecular chaperone machinery. *J Mol Endocrinol* 42: 1-9
44. Horwich AL, Fenton WA, Chapman E, Farr GW (2007) Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Ann Rev Cell Dev Biol* 23: 115-154
45. Farr GW, Furtak K, Rowland MB, Ranson NA, Saibil HR, Kirchhausen T, Horwich AL (2000) Multivalent binding of nonnative substrate proteins by the chaperonins GroEL. *Cell* 100: 561-573
46. Lin Z, Rye HS (2006) GroEL- mediated protein folding: making the impossible, possible. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41: 211-239
47. Bregier C, Kupikowska B, Fabczak H, Fabczak S (2008) Chaperoniny CCT oraz białka współdziałające. *Postepy Biochem* 54: 64-70

48. Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H (1999) Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 162: 3212-3219
49. Osipiuk J (2002) Eukariotyczne i archebakteryjne białka opiekuńcze Cpn60 typu II. *Postępy Biochem* 48: 94-100
50. 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
51. Caspers GJ, Leunissen JA, de Jong WW (1995) The expanding small heat shock protein family, and structure prediction of the conserved " α -crystallin domain". *J Mol Evol* 40: 238-248
52. Haslbeck M (2002) sHsps and their role in the chaperone network. *Cell Mol Life Sci* 59: 1649-1657
53. Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* 268: 1517-1520
54. Baneyx F, Mujacic M (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 22: 1399-1408
55. Laskowska E (2007) Małe białka szoku termicznego - rola w apoptozie, kancerogenezie i chorobach związanych z agregacją białek. *Postępy Biochemii* 53: 19-26
56. Han MJ, Yun H, Lee SY (2008) Microbial small heat shock proteins and their use in biotechnology. *Biotechnol Adv* 26: 591-609
57. Nicchitta CV (2003) Re-evaluating the role of heat-shock protein-peptide interactions in tumor immunity. *Nature Rev* 3: 427-432
58. Pockley AG, Muthana M, Calderwood SK (2008) The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends Biochem Sci* 33: 71-79
59. Srivastava PK, Udono H (1994) Heat shock protein-peptide complexes in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 6: 728-732
60. Murshid A, Gong J, Calderwood SK (2008) Heat-shock proteins in cancer vaccines: agents of antigen cross-presentation. *Vaccines* 7: 1019-1030
61. Srivastava PK, DeLeo AB, Old LJ (1986) Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3407-3411
62. Basu S, Srivastava P (1999) Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. *J Exp Med* 189: 797-802
63. Wang X-Y, Kazim L, Repasky EA, Subjeck JR (2001) Characterization of heat shock protein 110 and glucose-regulated protein 170 as cancer vaccines and the effect of fever-range hyperthermia on vaccine activity. *J Immunol* 165: 490-497
64. Janetzki S, Palla D, Rosenhauer V, Lochs H, Lewis JJ, Srivastava PK (2000) Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparations: a pilot study. *Int J Cancer* 88: 232-238
65. Rivoltini L, Castelli C, Carabba M, Mazzaferro V, Pilla L, Huber V, Coppa J, Gallino G, Scheibenbogen C, Squarcina P, Cova A, Camerini R, Lewis JJ, Srivastava PK, Parmiani G (2003) Human tumor-derived heat shock protein 96 mediates *in vitro* activation and *in vivo* expansion of melanoma- and colon carcinoma-specific T cells. *J Immunol* 171: 3467-3474
66. Anthony LS, Wu H, Sweet H, Turnnir C, Boux LJ, Mizzen LA (1999) Priming of CD8+ CTL effector cells in mice by immunization with a stress protein-influenza virus nucleoprotein fusion molecule. *Vaccine* 17: 373-383
67. Chu NR, Wu HB, Wu T, Boux LJ, Siegel MI, Mizzen LA (2000) Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16E7-expressing tumor by administration of fusion protein comprising *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV16E7. *Clin Exp Immunol* 121: 216-225
68. SenGupta D, Norris PJ, Suscovich TJ, Hassan-Zahraee M, Moffett HF, Trocha A, Draenert R, Goulder PJ, Binder RJ, Levey DL, Walker BD, Srivastava PK, Brander C. (2004) Heat shock protein-mediated cross-presentation of exogenous HIV antigen on HLA class I and II. *J Immunol* 173: 1987-1993
69. Zhu FG, Pisetsky DS (2001) Role of the heat shock protein 90 in immune response stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides. *Infect Immun* 69: 5546-5552
70. Bandholtz L, Guo Y, Palmberg C, Mattsson K, Ohlsson B, High A, Shabanowitz J, Hunt DF, Jomvall H, Wigzell H, Agerberth B, Gudmundsson GH (2003) Hsp90 binds CpG oligonucleotides directly: implications for hsp90 a missing link in CpG signaling and recognitions. *Cell Mol Life Sci* 60: 422-429
71. Reed RC, Berwin B, Baker JP, Nicchitta CV (2003) GRP94/gp96 elicits ERK activation in murine macrophages: a role for endotoxin contamination in NF- κ B activation and nitric oxide production. *J Biol Chem* 278: 31853-31860
72. Salminen A, Paimela T, Suuronen T, Kaamiranta K (2008) Innate meets with cellular stress at the IKK complex: Regulation of the IKK complex by Hsp70 and Hsp90. *Immunol Lett* 117: 9-15
73. Nardo DD, Masendycz P, Ho S, Cross M, Fleetwood AJ, Reynolds EC, Hamilton JA, Scholtz GM (2005) A central role for the Hsp90-Cdc37 molecular chaperone module in interleukin-1 receptor-associated-dependent signaling by Toll-like receptors. *J Biol Chem* 280: 9813-9822
74. Asea A, Kraeft SK, KurtJones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK (2000) HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nature Med* 6: 435-442
75. Gaston JSH (2002) Heat shock proteins and innate immunity. *Clin Exp Immunol* 127: 1-3
76. SinghJasua H, Scherer HU, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee HC, Toes RE, Schild H (2000) The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol* 30: 2211-2215
77. Płytycz B, Seljelid R (2002) Stress and immunity: minireview. *Folia Biol (Krakow)*. 50: 181-189
78. Quintana FJ, Cohen IR (2005) Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. *J Immunol* 175: 2777-2782
79. Płytycz B (2008) Convergent evolution of acquired immunity. *Cent Europ J Immunol* 32: 83-86
80. Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K (2002) Correlation between virulence of *Candida albicans* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34: 153-157
81. Reeves EP, Messina CGM, Doyle S, Kavanagh K (2004) Correlation of gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia* 158: 73-79
82. Mylonakis E, Moreno R, Kohoury J, Idnurm A, Heitmann S, Calderwood S, Ausbel F, Diener A (2005) *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun* 73: 3842-3850
83. Kavanagh K, Reeves EP (2004) Exploiting the potential of insects for the *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28: 101-112
84. Scully LR, Bidochka M (2006) Developing insect models for the study of current and emerging human pathogens. *FEMS Microbiol Lett* 263: 1-9
85. Cytryńska M (2009) O odporności bez przeciwciał.... *Postępy Biol Kom* 36: 309-324
86. Singh V, Aballay A (2006) Heat-shock transcription factor (HSF)-1 pathway required for *Caenorhabditis elegans*. *Proc Nat Acad Sci USA* 103: 13092-13097
87. Singh V, Aballay A (2006) Heat shock and genetic activation of Hsf-1 enhance immunity to bacteria. *Cell Cycle* 5: 2443-2446
88. Wojda I, Kowalski P, Jakubowicz T (2004) JNK MAP kinase is involved in the humoral immune response of the greater wax moth larvae *Galleria mellonella*. *Arch Insect Biochem Physiol* 56: 143-154
89. Wojda I, Jakubowicz T (2007) Humoral immune response upon mild heat-shock conditions in *Galleria mellonella* larvae. *J Insect Physiol* 53: 1134-1144
90. Molds P, Kavanagh K (2007) Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Mycopathologia* 165: 5-12

91. Wojda I, Kowalski P, Jakubowicz T (2009) Humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae after infection by *Beauveria bassiana* under optimal and heat-shock conditions. *J Insect Physiol* 55: 525-531
92. Boutros T, Chevet E, Metrakos P (2008) Mitogen-activated protein (MAP) kinase/ MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev* 6: 261-310
93. Han SI, Oh SY, Jeon WJ, Kim JM, Lee JH, Chung HY, Choi YA, Yoo MA, Kim HD, Kang HS (2002) Mild heat shock induces cyclin D1 synthesis through multiple Ras signal pathways. *FEBS Lett* 515: 141-145
94. Park HG, Han SI, Oh SY, Kang HS (2005) Cellular responses to mild heat stress. *Cell Mol Life Sci* 62: 10-23
95. Kyosseva SV (2004) Mitogen-activated protein kinase signaling. *Int Rev Neurobiol* 59: 201-220
96. Wada T, Penninger JM (2004) Mitogen-activated protein kinase signaling in apoptosis regulation. *Oncogene* 23: 2838-2849
97. Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259: 1760-1763
98. Truman AW, Millson SH, Nuttall JM, King V, Mollapour M, Prodromou C, Pearl LH, Piper PW (2006) Expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, human ERK5 is a client of the Hsp90 chaperone that complements loss of the Slt2p (Mpk1p) cell integrity stress-activated protein kinase. *Eukaryot Cell* 5: 1914-924
99. Levin DE (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol and Mol Biol Rev* 69: 262-291
100. Levin DE, Fields FO, Kunisawa R, Bishop JM, Thorer J (1990) A candidate protein kinase C gene, *PKC1*, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* 62: 213-224
101. Heinisch JJ (2005) Baker's yeast as a tool for the development of antifungal kinase inhibitor - targeting protein kinase C and the cell integrity pathway. *Biochim Biophys Acta* 1754: 171-182
102. Martin H, Castellanos MC, Cenamor R, Sanchez M, Molina M, Nombela C (1996) Molecular and functional characterization of a mutant allele of the mitogen-activated protein-kinase gene *SLT2 (MPK1)* rescued from yeast autolytic mutants. *Curr Genet* 29: 516-522
103. Truman AW, Millson SH, Nuttall JM, Mollapour M, Prodromou C, Piper PW (2007) In the yeast heat shock response, Hsf1- directed induction of Hsp90 facilitates the activation of the Slt2 (Mpk1) mitogen-activated protein kinase required for cell integrity. *Eucaryotic Cell* 6: 744-752
104. Shaner L, Gibney PA, Morano KA (2008) The Hsp110 protein chaperone Sse1 is required for yeast cell wall integrity and morphogenesis. *Curr Genet* 54: 1-11
105. Alonso-Monge R, Real E, Wojda I, Bebelman JP, Mager WH, Siderius M (2001) Hyperosmotic stress response and regulation of cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae* share common functional aspects. *Mol Microbiol* 41: 717-370
106. Wojda I, Alonso-Monge R, Bebelman JP, Mager WH, Siderius M (2003) Response to high osmotic conditions and elevated temperature in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by intracellular glycerol and involves coordinate activity of MAP kinase pathways. *Microbiology* 149: 1193-1204
107. Winkler A, Arkind C, Mattison CP, Burkholder A, Knoche K, Ota I (2002) Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eucaryotic Cell* 1: 163-173
108. Siderius M, Van Wuytswinkel O, Reijenga KA, Kelders M, Mager WH (2000) The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. *Mol Microbiol* 36: 1381-1390
109. Wojda I, Bebelman JP, Jakubowicz T, Siderius M (2007) Thermosensitivity of the *Saccharomyces cerevisiae gpp1gpp2* double deletion strain can be reduced by overexpression of genes involved in cell wall maintenance. *Arch Microbiol* 188: 175-184
110. Elliot SL, Blanford S, Thomas MB (2002) Host-pathogen interaction in a varying environment: temperature, behavioural fever and fitness. *Proc R Soc Lond B* 269: 1599-1607

Heat shock and the susceptibility of organisms to infection and osmotic challenge

Iwona Wojda 

Department of Invertebrate Immunology, Institute of Biology, Faculty of Biology and Earth Sciences, Maria Curie-Skłodowska University, 19 Akademicka St., 20-033 Lublin, Poland

e-mail: wojda@hektor.umcs.lublin.pl

Key words: heat shock, innate immunity, osmotic stress, MAP kinases, mammals, insects, yeast *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Heat shock causes many physiological changes in every living cell. The detection of higher temperature and activation of signal-transduction pathways lead to the activation of transcription factors, belonging to Hsf family. In consequence, an increased expression of stress proteins takes place. The main role of heat-shock proteins is widely understood protection of proteins e.g. prevention of misfolded or unfolded proteins against aggregation and re-folding of denatured chains. In the case of highly damaged proteins, they are directed to proteolytic degradation. The article highlights the special role of heat-shock proteins in the immune response of mammals and insects. Apart from offering a general characteristic of the heat-shock response of a cell, the article describes the positive effects of the exposition of living organisms to a mild heat shock. It also notes how the experience of heat shock may affect the response of mammals and insects to infection and in the adaptation of yeast to hyperosmotic conditions. The interplay of signaling pathways activated in different stressful conditions has also been taken into consideration.

STRESZCZENIE

Zbadano, że U-TubeTM Concentrator 15H-30, zgodnie z deklaracją producenta, jest bardzo skutecznym urządzeniem do zagęszczania białek, zwłaszcza tych, które mają tendencję do wiązania się z półprzepuszczalną błoną w koncentratorze.

WPROWADZENIE

W codziennej praktyce laboratoryjnej często spotykamy się z problemem zbyt dużego rozcieńczenia próbek. Można go rozwiązać na wiele sposobów, w zależności od późniejszego zastosowania próbki. Do najpopularniejszych należą: wysalanie za pomocą siarczanu amonu, wytrącanie z zastosowaniem kwasu trójchlorooctowego (TCA) lub acetonu, dializa, elektroelucja i zagęszczanie z wykorzystaniem specjalnych urządzeń do zagęszczania zwanych koncentratorami.

WYTRĄCANIE (WYSALANIE) BIAŁEK

Wytrącanie (wysalanie) białek jest metodą pozwalającą na frakcjonowanie białek o różnej rozpuszczalności oraz pozwalającą na zwiększenie stężenia próbki. Proces ten jest ściśle związany z rozpuszczalnością białek, o której decyduje zdolność do hydratacji, budowa chemiczna, obecność soli w roztworze oraz pH roztworu. W procesie wysalania maleje rozpuszczalność białka wraz ze wzrostem stężenia soli. Białko ma najmniejszą rozpuszczalność w pH roztworu równej wartości punktu izoelektrycznego (pI), charakterystycznej dla danego białka (wypadkowy ładunek powierzchniowy białka jest równy zero). Powyżej pI rozpuszczalność białka wzrasta wraz z dodaniem jonów soli, aż do osiągnięcia maksimum, a następnie gwałtownie spada. Im większe jest wyjściowe stężenie białka, tym większa skuteczność wytrącania. Jest kilka sposobów zmniejszenia rozpuszczalności białek: wytrącanie solami (siarczanem amonu, chlorkiem sodu), zmiana temperatury, zmiana pH, obecność jonów metali (np. ołowiu, srebra, rtęci), kwasów nieorganicznych, kwasów organicznych (np. kwasu trójchlorooctowego - TCA) lub rozpuszczalników organicznych (np. etanolu, acetonu).

Niestety zastosowanie większości wspomnianych wyżej metod może powodować denaturację lub spadek aktywności biologicznej białek. W celu otrzymania stabilnego, zachowującego właściwą konformację białka najpowszechniej stosuje się wysalanie siarczanem amonu, którego roztwór nasycony ma wystarczająco wysoką molarność, by spowodować wypadnięcie z roztworu większości białek. Rozpuszczanie związku nie powoduje zbyt dużego wzrostu temperatury, a gęstość nasyconego roztworu nie utrudnia sedymentacji białka w czasie wirowania. Ponadto stężony roztwór siarczanu amonu jest bakteriostatyczny i chroni większość białek przed denaturacją. Stężenie siarczanu amonu potrzebne do wysolenia jest różne dla różnych białek i określane doświadczalnie. Podobny efekt można uzyskać stosując inne sole np. chlorek sodu, siarczan magnezu, fosforanu potasu lub sodu i octanu potasu lub sodu. Zastosowanie innych soli, w odróżnieniu od zastosowania siarczanu amonu, nie jest tak wydajne i może prowadzić do denaturacji białka [1].

ULTRAFILTRACJA

Prostszą a zarazem bardziej efektywną metodą jest zagęszczanie próbek z wykorzystaniem dostępnych w sprzedaży koncentratorów. Metoda ta okazała się równie wydajna, jak wytrącanie białek z zastosowaniem TCA lub acetonu, a bardziej wydajna niż wytrącanie siarczanem amonu w przypadku białek osocza krwi. Natomiast siarczan amonu okazał się efektywny w przypadku albuminy. Niestety jego zastosowaniu towarzyszyły duże straty w ilości pozostałych białek [2].

Koncentratory są to zwykle próbki z wbudowaną półprzepuszczalną błoną o określonej wielkości porów. Przy wyborze rodzaju koncentratora należy kierować się wielkością MWCO (ang. *molecular weight cut-off*) czyli molekularną granicą rozdziału (zwaną punktem odcięcia). Wartość MWCO określa minimalną masę

Monika Żochowska

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pańskiego 5A, 02-106 Warszawa; tel.: (22) 592 24 18; e-mail: m.zochowska@ibb.waw.pl

Słowa kluczowe: zagęszczanie, wytrącanie, wysalanie białek, dializa, elektroelucja

Wykaz skrótów: TCA – kwas trójchlorooctowy; pI – punkt izoelektryczny; MWCO (ang. *molecular weight cut off*) – molekularna granica rozdziału; Dd – dodekahedron (dwunastokąt), cząsteczka pseudowirusowa

Podziękowanie: Autorka pragnie podziękować firmie Merck za udostępnienie materiałów do napisania niniejszej pracy.



makrocząsteczki, która może być zatrzymana na błonie. Ze względu na fakt, że na skuteczność zagęszczania wpływają również inne czynniki, m.in. kształt i stan zatężanej próbki, najlepiej wybierać koncentratory charakteryzujące się wartością MWCO o połowę niższą od masy białka, które chcemy zagęścić [3]. Próbkę wystarczy nanieść na błonę i zwirować, a następnie zebrać roztwór nad błoną. Niestety zdarza się, że wydajność zagęszczania z zastosowaniem koncentratorów nie jest zgodna z oczekiwaniami, gdyż część białek może wiązać się z błoną.

Obecnie firma Merck (katalog Novagen) opracowała i wprowadziła na rynek wirówkowe próbówki ultrafiltracyjne (koncentratory) nowej generacji o nazwie U-Tube™ Concentrator (Ryc. 1), przeznaczone do zagęszczania materiału biologicznego, w szczególności białek i kwasów nukleinowych. Koncentratory są dostępne w różnych zakresach pojemności (od 0,5 ml do 20 ml) oraz wartości punktu odcięcia (od 3 kDa do 30 kDa). Są wyposażone w błonę polieterosulfonową (PES), charakteryzującą się niską podatnością na wiązanie białek. Niektóre koncentratory są wyposażone w błonę typu Hydrosart®, charakteryzującą się bardzo niską podatnością na wiązania białek; koncentratory te stosowane są w doświadczeniach wymagających wysokiego odzysku próbki.

Koncentratory są wyposażone w błonę odporną na działanie różnorodnych substancji chemicznych (Tabela 1). Błona jest ustawiona w pozycji pionowej, dlatego koncentratory należy umieszczać w wirówce tak, błona znajdowała się na kręwdzi spływu, za próbką w stosunku do kierunku wirowania rotora. Dodatkowo koncentratory posiadają zabezpieczenie przed wyschnięciem błony w czasie zagęszczania; jest to tzw. objętość graniczna (ang. *dead-stop-volume*), poniżej której nie następuje dalsze zagęszczanie próbki. Czas zagęszczania wynosi 10-30 min, a wydajność sięga 95% [4].

DIALIZA

Dializa jest najprostszą metodą wstępnego oczyszczania



Rycina 1. Koncentratory U-Tube™ o różnych objętościach.

białek. Dzięki zastosowaniu tej metody można oddzielić białka o niskiej masie cząsteczkowej od białek o wysokiej masie cząsteczkowej. Cząsteczki o średnicy większej niż pory pozostają w woreczku dializacyjnym, natomiast małe cząsteczki i jony przechodzą do roztworu, przenikając przez pory półprzepuszczalnej błony celulozowej. Odpowiednio manipulując składem roztworu wewnątrz woreczka i na zewnątrz, można doprowadzić do rozcieńczenia i w niewielkim stopniu zagęszczenia próbki. Dializa najczęściej służy do wymiany składu buforu [5].

Nowe możliwości daje zastosowanie dializerów D-Tube™ oferowanych przez firmę Merck (katalog Novagen), dostęp-

Tabela 1. Odporność chemiczna koncentratorów U-Tube™. PES, błona polieterosulfonowa; Hy, błona Hydrosart®; + bardzo dobra odporność chemiczna; X brak odporności; nd nie sprawdzano.

Roztwór	PES	Hy
zakres pH	1-9	1-9
kwasy octowy (25%)	+	+
aceton (10%)	X	X
DMSO (5%)	+	X
etanol (70%)	+	+
glicerol (70%)	+	+
guanidyny HCl (6 M)	+	+
HCl (1 M)	+	+
imidazol (0.3 M)	+	nd
isopropanol (70%)	+	+
merkaptotanol (1 M)	X	+
metanol (60%)	nd	+
bufor fosforanowy (1 M)	+	+
PEG (10%)	+	nd
deoksycholany sodu (5%)	+	nd
SDS (0.1 M)	+	+
NaOH (2.5 M)	X	X
podchloryn (200 ppm)	+	X
TFA (10%)	+	+
Tween® 20 (0.1%)	+	+
Triton® X-100 (0.1%)	+	+
mocznik (8 M)	+	+

nych w różnych zakresach punktu odcięcia (od 3,5 kDa do 14 kDa) i o sześciu różnych pojemnościach: mini (10–250 µl), midi (50–800 µl), maxi (500–3000 µl) oraz mega (3–10 ml, 10–15 ml lub 15–20 ml) (Ryc. 2). Są to łatwe i proste w użyciu zakręcane próbówki, pozbawione proteaz, RNaz i DNaz. Zawierają okienka z ultra czystą błoną dializacyjną, pozbawioną siarki i metali ciężkich, wykonaną z regenerowanej celulozy wstępnie potraktowanej EDTA. Przez okienka z błoną dializacyjną zachodzi wymiana buforu oraz usuwanie mocznika i detergentów z badanego materiału. Dializery D-Tube™ zapewniają wysoki wskaźnik odzysku próbek po dializie (> 97%). Nadają się również do elektroelucji materiału biologicznego z jedno- i dwukierunkowych żeli poliakryloamidowych oraz żeli agarozowych. Ciekawą propozycją są dializery D-Tube96™ (Ryc. 3) idealne do dializy małych objętości. Ich zastosowanie pozwala na przeprowadzenie jednoczesnej dializy 96 próbek do buforu o określonym składzie, co znacznie ułatwia pracę i skraca czas przeprowadzenia doświadczeń [6].

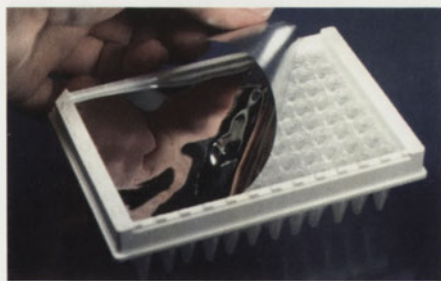
ELEKTROELUCJA

Elektroelucja jest jedną z metod odzyskiwania kwasów nukleinowych z żeli po rozdiale elektroforetycznym, w której odzyskiwanie materiału biologicznego z fragmentu wyciętego żelu zostaje wymuszone przez przepływ prądu elektrycznego. Zastosowanie



Rycina 2. Dializery D-Tube™ o różnych objętościach. A) D-Tube™ mini (10–250 µl), midi (50–800 µl), maxi (500–3000 µl). B) Dializery D-Tube™ mega.

woreczków dializacyjnych do odzyskiwania DNA z żelu jest mało wygodne w porównaniu do innych metod. Jest jednak najbardziej efektywne w odzyskiwaniu dużych fragmentów DNA, powyżej 5 kb [7].



Rycina 3. D-Tube96™ Dialyzer.

Wysoką wydajność odzysku nie tylko DNA, ale również białek, kompleksów białko-białko lub białko-DNA, oligonukleotydów oraz RNA po elektroelucji z żeli PAGE (1D i 2D) i agarozowych można osiągnąć stosując dializery D-Tube™ o pojemnościach od 10 µl do 3 ml (Ryc. 2). W czasie krótszym niż 2 godziny można w 60% odzyskać białka i w 90% oligonukleotydy, RNA i DNA o długościach łańcucha od 15 nt do 80 kbp. W celu przeprowadzenia elektroelucji fragment żelu z badaną próbką przenosi się do dializera D-Tube™, dodaje odpowiedniego buforu do elucji i umieszcza w specjalnych sankach w aparacie elektroforetycznym. Zapewniają one ustawienie okienek dializacyjnych w próbkach dializerów, prostopadłe do kierunku przepływu prądu. Pod wpływem pola elektrycznego, badany materiał migruje z żelu i zatrzymuje się przy wewnętrznych ściankach błony dializacyjnej, skąd może być łatwo przeniesiony z użyciem pipety do nowej próbki. Oczyszczone w ten sposób próbki mogą być używane do dalszych analiz z wykorzystaniem np. MALDI-MS i HPLC.

PORÓWNANIE KONCENTRATORÓW U-TUBE™ I AMICON ULTRA-4

W doświadczeniu przeprowadzonym na potrzeby publikacji niniejszego artykułu informującego użyto preparat dodekahedronu (Dd). Jest to cząsteczka pseudowirusowa złożona z 12 pentamerów białka (podstawa pentonu). Białko to wchodzi w skład otoczki adenowirusa serotypu 3. Dd oczyszczono przy użyciu chromatografii jonowymiennej, zgodnie z wcześniej opracowaną procedurą [8]. W doświadczeniu zastosowano U-Tube™ Concentrator 15H-30 (zawierający błonę typu Hydrosart®) oraz koncentrator Amicon Ultra-4. Próbkę białka podzielono na dwie równe części po 4 ml każda, a następnie nałożono na oba rodzaje koncentra-

torów. Tak przygotowane próby wirowano przez 10 min, 3000 x g w temperaturze 25°C. Skład zebranych próbek analizowano z zastosowaniem elektroforezy na 12,5% żelu poliakrylamidowym. Jak wynika z przeprowadzonego doświadczenia U-Tube™ Concentrator 15H-30 jest bardziej skuteczny niż koncentrator Amicon Ultra-4 (Ryc. 4). Pozwala na uzyskanie białka o większej gęstości z tej samej objętości materiału wyjściowego. Gęstość uzyskanego w ten sposób materiału jest odpowiednia do dalszych badań.

Podsumowując wykazano, że U-Tube™ Concentrator, 15H-30 jest użytecznym urządzeniem, które można wykorzystać w celu uzyskania preparatu białka o dobrej jakości i dużej gęstości, przy jednoczesnym zachowaniu pełnej aktywności biologicznej. Potwierdzają to wyniki doświadczeń *in vitro* i *in vivo*, w których zastosowano preparat Dd zagęszczony z zastosowaniem koncentratora U-Tube™ (dane niepublikowane).



Rycina 4. Rozdział elektroforetyczny obrazujący skuteczność zagęszczania białka z wykorzystaniem dwóch rodzajów koncentratorów: 1) białko Dd nie zagęszczone; 2) białko Dd po zagęszczeniu z wykorzystaniem koncentratora Amicon Ultra-4; 3) białko Dd zagęszczone z wykorzystaniem U-Tube™ Concentrator 15H-30; 4) standardy białkowe.

PIŚMIENNICTWO

1. Ślosarek G (1996) Wstęp do pracowni biofizyki molekularnej. Wydawnictwo Naukowe Poznań
2. Jiang L, He L, Michael Fountoulakis M (2004) Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J chromat* 1023: 317-320
3. Ultrafiltration handbook. Tools and Techniques for Life Science Research. (2004) Millipore Corporation
4. www.merckbio.eu/UTUBE
5. Stryer, Lubert 2003, cop. 1997 Biochemia.
6. www.merckbio.eu/DTUBE
7. Jerzmanowski A, Brzeski J, Przewłoka M, Calikowski T, Koźbial P, Sarnowski T, Olczak K, Kiliańczyk B (1999) Skrypt do ćwiczeń Biologia/ Biotechnologia Molekularna Roślin. Pracownia Biologii Molekularnej Roślin UW/IBB PAN, Warszawa
8. Zochowska M, Paca A, Szolajska E (2009) Adenovirus dodecahedron, as a drug delivery vector. *PLoS one* 4: e5569, doi: 10.1371/journal.pone.0005569

Possibility of practical application of U-Tube™ and D-Tube™ for proteins concentration

Monika Żochowska[✉]

Institute of Biochemistry and Biophysics, PAS, 5a Pawinskiego St., 02-106 Warszawa, Poland

✉e-mail: m.zochowska@ibb.waw.pl

Key words: concentration, proteins precipitation, desalting, dialysis, electroelution

ABSTRACT

It was considered in practice that the U-Tube™ Concentrators, 15H-30 according to the manufacturer's statement, show a lower susceptibility to the binding of proteins to the membrane. Therefore, they are effective tools for proteins concentration, especially these proteins that tend to bind to the membrane.



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia || **bmz**

Projekt PO IG 2.1 **Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia** (BMZ) jest realizowany na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego (WBBiB UJ). Projekt współfinansuje Unia Europejska w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. Na nowe inwestycje WBBiB UJ przyznano ponad 28 830 000 zł. Do końca grudnia 2009 roku zakupiono aparaturę o łącznej wartości ponad 8 milionów zł.

W ramach projektu powstanie nowoczesna zwierzętarnia, a zakupiona aparatura znajdzie zastosowanie w nowych pracowniach:

- Cytometrii Obrazowej,
- Proteomiki i Transkryptomiki,
- Inżynierii Komórkowej i Tkankowej,
- Wirusologicznej Diagnostyki Molekularnej,
- Biotechnologii Roślin,
- Banku Komórek.



System do mikroskopowej laserowej mikropreparatyki zakupiony do Pracowni Proteomiki i Transkryptomiki

www.wbbib.uj.edu.pl/bmz



INNOWACYJNA
GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

<http://rcin.org.pl>

UNIA
EUROPEJSKA



Restriction Enzymes Choose Green!

Save Time - Digest DNA in FastDigest® Green Buffer and load directly on a gel

- 100% activity of all FastDigest® enzymes in the new green universal digestion buffer.
- 100% buffer compatibility with all downstream applications.
- Complete digestion in 5-15 minutes.
- Direct loading of a reaction mixture on gels.



M – GeneRuler™ Express DNA Ladder (#SM1551).

C – Undigested plasmid DNA control.

1 – Plasmid DNA triple digested with FastDigest® EcoRI, FastDigest® KpnI and FastDigest® SmaI in FastDigest® Buffer.

2 – The reaction mixture after ligation in FastDigest® Buffer.

3 – Plasmid DNA triple digested with FastDigest® EcoRI, FastDigest® KpnI and FastDigest® SmaI in FastDigest® Green Buffer.

4 – The reaction mixture after ligation in FastDigest® Green Buffer.



1 – Reaction mixture containing FastDigest® Green Buffer before electrophoresis.

2 – Reaction mixture containing FastDigest® Green Buffer after electrophoresis.



Czy firma Merck może poprawić
proces zatężania próbek?

U-Tube™ koncentratory

poprawiają odzysk białek,
koncentrację, szybkość otrzymania wyników,
oraz redukują ryzyko wysuszenia próbek.

That's what's in it for you. Merck Chemicals

Cechy i korzyści:

- Membrana polietersulfonowa (PES) lub Hydrosart® (typ „Ultra-low protein binding”)
- Niewielka podatność do wiązania białek i wysoki wskaźnik odzysku
- Wysoki przepływ umożliwia szybką koncentrację próbek
- Ustalony punkt końcowy zapobiega wysychaniu próbek
- Różne pojemności koncentratorów - od 0,5 ml do 20 ml
- Różne wartości punktu odcięcia - od 3 kDa do 30 kDa
- Łatwe i wygodne w użyciu

www.merck-chemicals.pl

