

# POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
WARSZAWA 2006  
TOM 52  
NUMER 2



Podwójne oblicze cytochromu c  
Mitochondrialne kanały jonowe  
Reaktywne formy tlenu i mitochondria

80-lecie urodzin  
Pana Profesora Lecha Wojtczaka



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

[www.postepybiochemii.pl](http://www.postepybiochemii.pl)

<http://rcin.org.pl>

BioMEDIA ASSOCIATES

# Oferujemy odczynniki i wyposażenie laboratoryjne



Enzymy restrykcyjne, PCR,  
odwrotna transkrypcja,  
markery DNA, RNA  
i białkowe zestawy  
do biologii molekularnej;



Aparaty do elektroforezy  
poziomej i pionowej, do  
blottingu, zasilacze, ochrona  
przed promieniowaniem  
gamma i beta, drobne  
wyposażenie laboratoryjne;



Transfekcja, elektroforeza,  
pożywki bakteryjne,  
drożdżowe, roślinne, PCR,  
izolacja i oczyszczanie DNA  
i RNA, ekspresja genów;



Podstawowe odczynniki,  
immunologia, apoptoza,  
biologia komórki,  
elektroforeza;



Agarozy;



Biologia komórki, genomika,  
proteomika, przeciwciała,  
chromatografia;



Przeciwciała, modulatory,  
neurotoksyny i odczynniki  
do neurobiologii;



Latent bloodstain reagent  
Odczynnik do wykrywania  
niewidocznych śladów krwi.

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





## W NASTĘPNYM NUMERZE:

## ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

**Struktura DNA od A do Z. Różnorodność DNA i jej biologiczne implikacje funkcjonalne**

Małgorzata Bukowiecka-Matusiak, Lucyna Woźniak

**Roślinne ABC transportery – rodzina z tradycjami**

Michał Jasiński, Marek Figlerowicz

**Badania struktury i funkcji prokariotycznych topoizomeraz klasy II szansą dla poszukiwania i syntezy nowych leków przeciwbakteryjnych**

Michał Pietrusiński, Paweł Stączek

## Rysunek na okładce:

Front cover image „Mitochondrion Revealed” by Eric Robert Russell, www.eBioMEDIA.com, with permission.

## MAPA POLSKIEJ BIOCHEMII

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego to tradycja i nowoczesność 109

## WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

Odpowiedź Polskiej Federacji Biotechnologii na stanowisko Komitetu Ochrony Przyrody PAN w sprawie upraw GMO i żywności z GMO 114

Wiadomości krajowe 116

## TEMAT NUMERU – MITOCHONDRIA

Dwa oblicza cytochromu *c* - z historii biochemii 122

Lech Wojtczak

Kanał VDAC jako regulator funkcji mitochondriów 129

Hanna Kmita, Olgierd Stobienia

Mitochondrialne kanały jonowe 137

Jolanta Skalska, Grażyna Dębska-Vielhaber, Marta Głąb, Bogusz Kulawiak, Dominika Malińska, Izabela Koszela-Piotrowska, Piotr Bednarczyk, Krzysztof Dołowy, Adam Szewczyk

Rola mitochondriów w wytwarzaniu i usuwaniu reaktywnych form tlenu; związek z przesyłaniem sygnałów i programowaną śmiercią komórki 145

Małgorzata Czarna, Wiesława Jarmuszkiewicz

Mechanizmy i regulacja programowanej śmierci komórek 157

Iwona Grądzka

## ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Kontrowersje wokół mechanizmu syntezy wiązania peptydowego w rybosomie 166

Kamilla Bąkowska-Żywicka, Agata Tyczewska, Tomasz Twardowski

Współczesne spojrzenie na peroksydację lipidów 173

Wojciech Łuczaj, Elżbieta Skrzydlewska

Naprawa DNA przez rekombinację homologiczną w komórkach ssaków 180

Tomasz Popławski, Janusz Błasiak

Rola kompleksu IL-6/sIL-6R oraz jego naturalnego inhibitora sgp130 w modulowaniu procesu zapalnego 194

Daria Augustyniak, Grażyna Majkowska-Skrobek, Barbara Basiewicz-Worsztynowicz, Adam Jankowski

Adiuwanty – niezbędne składniki szczepionek nowej generacji 204

Krystyna Dzierzbicka, Aleksander M. Kołodziejczyk

Subwirusowe cząsteczki RNA związane z wirusami roślinnymi typu ss(+)RNA 212

Marta Pelczyk, Aleksandra Obrępańska-Stęplowska, Henryk Pospieszny



## ADVANCES IN BIOCHEMISTRY VOL. 52, NO. 2, 2006

Warsaw Agriculture University – tradition and modernity	109
Events/Opinions/Comments	114

## REVIEWS

Two faces of cytochrome <i>c</i>	122
The VDAC channel as regulator of mitochondrial function	129
Mitochondrial ion channels	137
Role of mitochondria in generation and removal of reactive oxygen species; relevance to signaling and programmed cell death	145
Mechanisms and regulation of the programmed cell death	157
Mechanism of peptide bond formation on the ribosome – controversies	166
The present-day look at lipid peroxidation	173
DNA homologous recombination repair in mammalian cells	180
The role of IL-6/sIL-6R complex and its natural inhibitor sgp130 in modulation of inflammatory process	194
Adjuvants – essential components of new generation vaccines	204
Subviral molecules of RNA associated with plant ss(+)RNA viruses	212

## W TYM NUMERZE „POSTĘPÓW BIOCHEMII” – MITOCHONDRIA

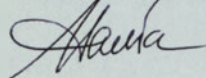
Od pewnego czasu redakcja nosiła się z pomysłem przygotowania numeru specjalnego naszego czasopisma i taka okazja nadarzyła się sama. Hasło „MITOCHONDRIUM” pojawiło się w orbicie zainteresowań naszego kolegium z dwóch powodów – z okazji organizacji w Warszawie w czerwcu 2006 roku kursu specjalnego FEBS poświęconego mitochondriom, ale przede wszystkim z okazji mijającej w tym roku osiemdziesiątej rocznicy urodzin Pana profesora Lecha Wojtczaka, członka Polskiej Akademii Nauk, profesora Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, wybitnego bioenergetyka, wychowawcy wielu pokoleń badaczy mitochondriów i prawdziwego autorytetu w tej dziedzinie, o licznych kontaktach naukowych w kraju i zagranicą. Z tej okazji Redakcja składa Szanownemu Jubilatowi serdeczne życzenia dalszych sukcesów naukowych i dużo zdrowia.

Serdecznie zapraszam także do lektury części numeru poświęconej różnym aspektom biologii mitochondriów – począwszy od właściwości kanałów jonowych zlokalizowanych w błonach mitochondrialnych, a skończywszy na udziale mitochondriów w procesie programowanej śmierci komórki – apoptozy. Będzie odrobina historii odkryć dotyczących funkcjonowania mitochondriów, bo bez takiej wiedzy nie można w pełni zrozumieć roli, jaką ogrywają mitochondria w komórce, będzie też wiele na temat najnowszych osiągnięć mitochondriologii i współczesnych kierunków, w których zmierza ta dynamicznie rozwijająca się dziedzina naszej wiedzy.

Na koniec niech mi wolno podziękować wszystkim Czytelnikom za miłe słowa pod adresem naszej redakcji, za bardzo pozytywne opinie na temat naszej pracy, których Państwo nie szczędzicie, a wytrwałym Autorom i Recenzentom ich artykułów, za trud, jaki wkładają w przygotowanie interesujących materiałów i za wspólną pracę przyczyniającą się do utrzymywania wysokiej rangi nadanej czasopismu za czasów kierowania pracami redakcji przez Panią profesor Zofię Zielińską. Bez zainteresowanych Czytelników i pełnych zapału Autorów czasopismo nie miałoby racji bytu i żadnego szans istnienia. Przekształciłoby się w sensie dosłownym w czasopismo wirtualne. Jakkolwiek nie będę ukrywał przed Państwem, że przekształcenie się kwartalnika w przyszłości w czasopismo dostępne „on-line”, a więc funkcjonujące w przestrzeni wirtualnej, jest marzeniem obecnego redaktora naczelnego.

Dziękuję za uwagę i zapraszam jak zwykle do lektury naszego czasopisma oraz do częstego odwiedzania naszej strony internetowej pod adresem [www.postepybiochemii.pl](http://www.postepybiochemii.pl).

Sławomir Pikula



## PARTNER POSTĘPÓW BIOCHEMII



Your Vision, Our Future

Redaktor naczelny: Sławomir Pikula; e-mail: [s.pikula@nencki.gov.pl](mailto:s.pikula@nencki.gov.pl), tel. (022) 5892347, Redaktor senior: Zofia ZielińskaRedaktor działu krajowego: Teresa Wesolowska; e-mail: [redbioch@sci.pam.szczecin.pl](mailto:redbioch@sci.pam.szczecin.pl), Redaktor działu „Forum Młodych Biochemików”: Grzegorz Bartosz; e-mail: [gbartosz@biol.uni.lodz.pl](mailto:gbartosz@biol.uni.lodz.pl)  
Redaktorzy: Joanna Bandorowicz-Pikula, Jolanta Barańska, Andrzej Dzugaj, Krystyna Grzelak, Lilla Hryniewiecka, Danuta Hulanička, Andrzej Jerzmanowski, Andrzej Kasprzak, Wanda Kłopotka, Liliana Konarska, Paweł Pomorski, Aleksander F. Sikorski, Anna Szakiel, Adam Szewczyk, Tomasz Twardowski, Marek Zembala, Krzysztof Zabłocki, Alicja ŻyliczSekretarz redakcja: Hanna Laskowska; e-mail: [h.laskowska@nencki.gov.pl](mailto:h.laskowska@nencki.gov.pl),Skład i łamanie: Małgorzata Basaj; e-mail: [biochem@nencki.gov.pl](mailto:biochem@nencki.gov.pl)Adres redakcji: „Postępy Biochemii”, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: [postepy@nencki.gov.pl](mailto:postepy@nencki.gov.pl); <http://www.postepybiochemii.pl>Wydawca: Polskie Towarzystwo Biochemiczne; ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel/fax (022) 6582099; e-mail: [ptbioch@nencki.gov.pl](mailto:ptbioch@nencki.gov.pl); <http://www.ptbioch.edu.pl>

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

# APARATY DO ELEKTROFOREZY POZIOMEJ

- Szeroka oferta – dziesięć aparatów od rozmiaru żelu 6 x 7,5 cm do 25 x 30 cm.
- Możliwość wylewania żelu bezpośrednio w aparacie lub poza nim przy użyciu estetycznych silikonowych ograniczników.
- Tacka przepuszczająca promienie UV umożliwia oglądanie żeli bez ich przenoszenia.
- Widoczny rozdział dzięki białemu stolikowi, na którym umieszcza się tackę.
- Dostępne poziomnice, a do aparatów Mini i Midi zestawy do wylewania 3 żeli na raz.
- Bardzo duży wybór grzebieni specjalnie oznakowanych kodem kolorów ułatwiającym ich wybór – czarne 0,75 mm, białe 1 mm, czerwone 1,5 mm, niebieskie 2 mm.
- Dostępne są też grzebienie dwustronne, kompatybilne z pipetą wielokanałową.

## MINI

- Fast Mini (10 x 8 cm)
- Battery Mini (10 x 8 cm)
- Mini Horizontal (6 x 7,5 cm)
- Mini-Plus Horizontal (10 x 11,5 cm)
- Wide Format Mini-Plus Horizontal (14,4 x 10,2 cm)

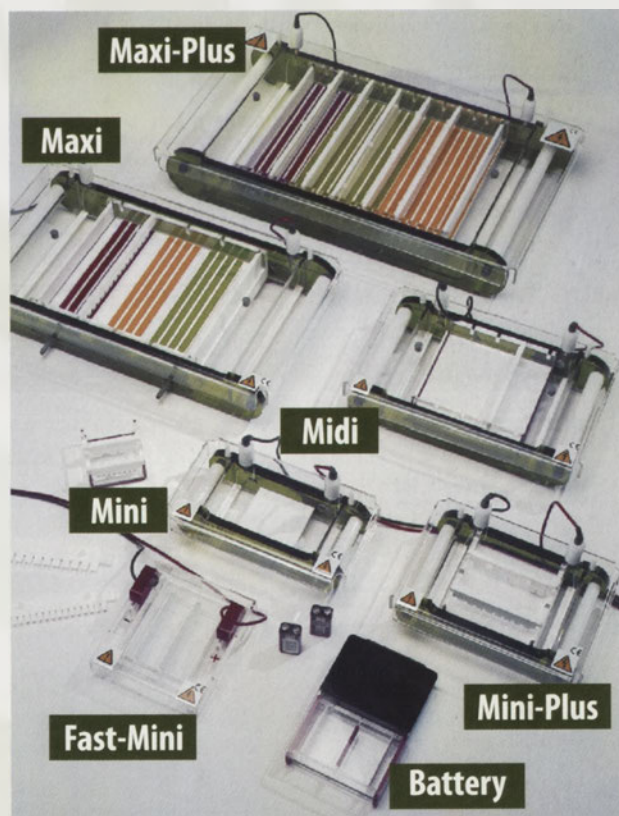
## MIDI

- Midi Horizontal (12,8 x 15 cm)
- Wide Format Midi Horizontal (23 x 14/10 cm)
- Long Format Midi Horizontal (13 x 25 cm)

## MAXI (dostępne także wersje z chłodzeniem)

- Maxi Horizontal (20 x 20 cm)
- Maxi-Plus Horizontal (25 x 30 cm)

Oprócz tego firma Scie-Plas posiada w swej ofercie: aparaty do elektroforezy pionowej, blottingu, izoelektroogniskowania oraz elektroelucji, zasilacze (Consort), suszarki do żeli, przesłony i pudełka do pracy z materiałami radioaktywnymi, stojaki na probówki i pipety, pływaki, dyspensery.



# TRAWIENIE W 5 MINUT! INNOWACYJNE ENZYMY FastDigest™

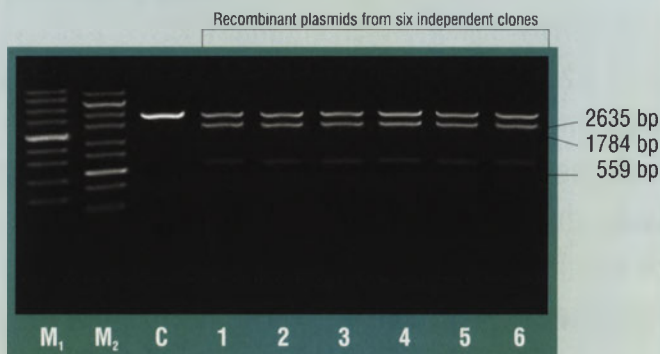
**Cechy:**

- Pojedyncze i podwójne trawienie plazmidowego DNA już w 5 min.!
- Wzmocniony efekt przy godzinnej inkubacji.
- Jeden bufor reakcyjny dla wszystkich enzymów.

**Zastosowanie:**

- Szybka analiza klonów.
- Szybkie przygotowywanie wektorów do klonowania.
- Standardowe trawienie enzymami restrykcyjnymi.

**Fast Clone Analysis**



M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> – ZipRuler™ Express DNA Ladder Set (#SM1373)  
 C – Control pUC19, DNA double digested with FastDigest™ EcoRI and FastDigest™ HindIII in 5 minutes  
 1-6 – Miniprep DNA from recombinant clones. Double digested with FastDigest™ EcoRI and FastDigest™ HindIII in 5 minutes

**PORÓWNANIE TRADYCYJNEGO PROTOKOŁU TRAWIENIA Z SZYBKIM – FastDigest™**

Etap	Szybki Protokół	Tradycyjny Protokół	Produkty Fermentas do szybkiego Protokołu
Oczyszczanie i pipetowanie DNA	15 min.	40 min.	GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (#K0501/2/3) <b>NOWOŚĆ</b>
Przygotowywanie Master Mix	6 min.	6 min.	FastDigest™ enzymy restrykcyjne (ApaI, BamHI, BcuI, BglII, BstXI, Bsu15I, Eco32I, EcoRI, HindIII, KpnI, NcoI, NdeI, NotI, PaeI, PstI, SacI, SmaI) <b>NOWOŚĆ</b>
Trawienie	5 min.	60 min.	
Elektroforeza	17 min.	40 min.	ZipRuler™ Express DNA Ladder Set (#SM1373) GeneRuler™ Express DNA Ladder (#SM1151/2/3, SM1163) FastRuler™ DNA Ladder Middle Range (#Sm1113) <b>NOWOŚĆ</b>
<b>Całkowity czas</b>	<b>43 min.</b>	<b>146 min.</b>	

## Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego to Tradycja i Nowoczesność <http://www.sggw.pl>



**Dr inż. Krzysztof Szwejk**

Rzecznik prasowy SGGW  
ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa  
tel: (48 22) 58-31-000  
e-mail: rzecznik@sggw.waw.pl

SGGW bierze swoje początki od Instytutu Agronomicznego w Marymoncie, powołanego 23 września 1816 roku, m.in. przez Stanisława Staszica i Stanisława Kostkę Potockiego. Pierw-



Fotografia 1. Pałac Rektorski SGGW.

szym dyrektorem Instytutu był Jerzy Beniamin Flatt, jeden z najlepszych znawców stosunków gospodarczych w Królestwie Polskim. Instytut w Marymoncie, protoplasta SGGW, był pierwszą uczelnią rolniczą w Polsce i czwartą w Europie. Mimo burzliwych losów, jego działalność przyczyniła się w znaczący sposób do rozwoju polskiego rolnictwa i polskiego szkolnictwa rolniczego.

Tradycje i idee Instytutu Marymonckiego stały się inspiracją do utworzenia w 1906 roku Wydziału Rolniczego przy Towarzystwie Kursów Naukowych, w 1911 roku Kursów Przemysłowo-Rolniczych, w 1916 roku Wyższej Szkoły Rolniczej oraz Królewsko-Polskiej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, w której pierwsza

inauguracja roku akademickiego odbyła się 12 października 1918 roku.

W czasie II wojny światowej, mimo zamknięcia przez niemieckiego okupanta, Uczelnia nadal prowadziła nauczanie. W czasie okupacji, w trakcie okresu tajnej działalności, wydano 130 dyplomów ukończenia studiów, a w 1945 roku zgłoszono i zatwierdzono 66 dyplomów i 3 doktoraty. Na ruinach bestialsko zniszczonej stolicy, tuż po odzyskaniu niepodległości, 15 maja 1945 roku, SGGW jako pierwsza Uczelnia w Warszawie zainaugurowała pierwszy powojenny rok akademicki.

Dzisiejsza Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego to nie tylko tradycja ale także nowoczesność (Fot. 1). W XXI wiek SGGW wkroczyła z imponującą liczbą 24 tys. studentów oraz wspaniałym nowoczesnym zapleczem naukowo-dydak-

tycznym. Dla wszystkich działających w Uczelni wydziałów, wybudowano i wyremontowano wspaniałe obiekty dydaktyczne, które swym poziomem i wyposażeniem równają do najlepszych w Europie i na świecie (Fot. 2).

Na terenie Uczelni znajdują się nowoczesne obiekty sportowe – korty tenisowe, siłownia, pływalnia, hale sportowe – wspierane przez Studium Wychowania Fizycznego i Sportu, które organizuje dla

studentów zajęcia: gry zespołowe – siatkówka, koszykówka, piłka nożna, tenis stołowy i ziemny; aerobic; siłownia; pływanie; judo, samoobrona oraz rehabilitacja ruchowa.

SGGW zapewnia swoim studentom bardzo dobre warunki mieszkaniowe – dysponuje blisko 4 tysiącami miejsc w czternastu akademikach o 1, 2 i 3 osobowych pokojach. Najnowszy z nich posiada wyłącznie pokoje 1 i 2 osobowe, każdy z łazienką i aneksem kuchennym. Zdecydowana większość domów studenckich podłączona jest do wewnętrznej sieci internetowej.

Zainteresowanie kształceniem w SGGW jest wciąż bardzo duże - liczba kandydatów na 1 miejsce przekracza 6 osób, a na kierunkach najbardziej popularnych nawet 20. Dlatego dla przyszłych studentów Uczelnia organizuje wiosenne kursy przygotowujące do matury oraz egzaminów wstępnych.

Przy Uczelni działa szereg organizacji studenckich: Agrokadra, Akademicki Klub Turystyczny, Akademickie Stowarzyszenie Katolickie Soli Deo, Biuro Spraw Studenckich, Grupa BUDDY – ESN, Chór Akademicki, Studenckie Stowarzyszenie Weterynaryjne, Ludowy Zespół Ar-



Fotografia 2. Nowoczesny budynek dydaktyczny – Wydział Technologii Żywności.

tystyczny „Promni” im. Zofii Sola-  
rzowej, Program wymiennego kształ-  
cenia studentów MostAR, wydzia-  
łowe Samorzady Studentów i Koła  
Naukowe, Akademicki Klub Sporto-  
wy, Zrzeszenie Studentów Polskich,  
IAAS-Polska – Międzynarodowa  
Organizacja Studentów Kierunków  
Rolniczych i Nauk Pokrewnych, NA-  
PIS – Niezależny Akademicki Por-  
tal Informacyjny SGGW, Studencki  
Klub Wspinaczkowy oraz Akade-  
micki Inkubator Przedsiębiorców.  
Działające w Uczelni wydawnictwo  
publikuje corocznie blisko 120 tytu-  
łów, proponując swoim studentom  
duży wybór podręczników akade-  
mickich, skryptów, przewodników  
do ćwiczeń, monografii i publikacji  
popularno-naukowych.

Studia w SGGW odbywają się  
w systemie stacjonarnym, wie-  
czorowym i zaocznym. Uczelnia  
kształci swoich studentów na 23.  
kierunkach – sześć z nich: *biotech-  
nologia, informatyka i ekonometria,  
gospodarka przestrzenna, ochrona śro-  
dowiska, towaroznawstwo oraz tury-  
styka i rekreacja*, realizowanych jest  
na studiach międzywydziałowych.  
Kształcenie na pozostałych 17 kie-  
runkach: *architektura krajobrazu, bio-  
logia, budownictwo, ekonomia, finanse  
i bankowość, inżynieria środowiska, leś-  
nictwo, ogrodnictwo, rolnictwo, socjolo-  
gia, technika rolnicza i leśna, technologia  
drewna, technologia żywności i żywienie  
człowieka, weterynaria, zarządzanie i in-  
żynieria produkcji, zarządzanie i marke-  
ting oraz zootechnika*, SGGW realizuje  
w 11. wydziałach: *Rolnictwa i Biologii,  
Medycyny Weterynaryjnej, Leśnym,  
Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu,  
Inżynierii i Kształtowania Środowiska,  
Technologii Drewna, Nauk o Zwierzę-  
tach, Technologii Żywności, Nauk o  
Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, In-  
żynierii Produkcji oraz Ekonomiczno-  
Rolniczym*.

Uczelnia kształci także w 7. zamiej-  
scowych, specjalistycznych, ośrodkach  
dydaktycznych, w: Leśnej Pod-  
laskiej, Sierpcu, Radomiu, Lubiejewie,  
Łowiczu, Widzewie i Przasnyszu.  
SGGW posiada własne zakłady do-  
świadczalne do prowadzenia ćwiczeń  
terenowych i odbywania praktyk z  
zakresu rolnictwa, leśnictwa, ogrod-  
nictwa i hodowli zwierząt. Studenci

korzystają również z atrakcyjnych  
praktyk zagranicznych.

W 2000 roku wdrożono w Uczel-  
ni – ułatwiający studiowanie i pro-  
cedury związane z uznawaniem  
studiów realizowanych za grani-  
cą – Europejski System Transferu  
Punktów (ECTS). Systematycznie  
wzrasta liczba studentów SGGW  
wyjeżdżających na uczelnie europej-  
skie w ramach programów TEMPUS  
i SOCRATES. Od 1998 roku SGGW  
bierze czynny udział w programie  
SOCRATES/ERASMUS, który jest  
największym programem edukacyj-  
nym. W ramach programu ERASMUS  
studenci uczelni utworzyli tzw. gru-  
pę BUDDY – ESN-SGGW, która jest  
kontynuacją ich pobytu za granicą  
lub dobrym wstępem do takiego wy-  
jazdu. Członkowie grupy pomagają  
swoim zagranicznym kolegom bio-  
rącym udział w programie w zaakli-  
matyzowaniu się w nowych polskich  
warunkach. Od 2000 roku zaczęła w  
Uczelni działać nowa edycja progra-  
mu LEONARDO DA VINCI II, po-  
święconego kształceniu i szkoleniu  
zawodowemu. Wspieranie wymiany  
akademickiej w zakresie kształcenia  
i doskonalenia zawodowego stu-  
dentów i nauczycieli akademickich  
odbywa się również poprzez reali-  
zację międzynarodowego programu  
CEEPUS. Ważnym elementem poli-  
tyki Uczelni jest internacjonalizacja,  
realizowana przez prowadzenie wy-  
kładów w języku angielskim, wspo-  
maganych przez uczelniane Studium  
Praktycznej Nauki Języków Obcych.  
W murach Uczelni studiuje młodzież  
z całego świata, m.in. z Austrii, Bel-  
gii, Białorusi, Chin, Francji, Holandii,  
Korei Południowej, Litwy, Niemiec,  
Republiki Czech, Republiki Słowacji,  
Ukrainy, USA, a także z innych kra-  
jów Afryki i Azji.

Uczelnia jest członkiem wielu  
światowych organizacji. Międzynaro-  
dową działalność aktywnie wspierają  
kompetentne jednostki SGGW: Biuro  
Współpracy Międzynarodowej, Cen-  
trum Programów Europejskich, Bran-  
żowy Punkt Kontaktowy Programów  
Ramowych UE. Szkoła Główna Go-  
spodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
jest uznanym w świecie nowoczes-  
nym uniwersytetem przyrodniczym  
oferującym szerokie możliwości edu-

kacyjne w przyjaznej akademickiej at-  
mosferze.

SGGW to między innymi:

- **Nr 1 w rankingach:** rankingi we-  
dług Rzeczpospolitej, Perspek-  
tyw, Przekroju i Magazynu Stu-  
denckiego SEMESTR
- **Uczelnia Przyjazna Studentom:**  
konkurs „PROstudent 2004”
- **Najbardziej oblegana uczelnia w  
Polsce:** od kilku lat 6-7 kandyda-  
tów na jedno miejsce, rekrutacja  
na studia przez Internet
- **24 000 studentów**
- **1 200 wykładowców**
- **23 kierunki studiów**
- **60 specjalności**
- **11 wydziałów**
- **Wspólne badania naukowe i dy-  
daktyczne** z 214 zagranicznymi  
uczelniami z 44 państw świata
- **Nowoczesny Kampus:** ponad 70  
hektarów powierzchni, podziem-  
ny parking
- **Doskonałe warunki dydaktycz-  
ne:** możliwość jednoczesnego  
studiowania na innych uczel-  
niach rolniczych – Program MO-  
STAR, 1 500 pomieszczeń dydak-  
tycznych, 60 pracowni kompute-  
rowych, 300 sal wykładowych i  
ćwiczeniowych, 24 aule, nowo-  
czesna biblioteka, Klinika Małych  
Zwierząt, Klinika Koni, Zwierzę-  
tarnia, kilka zakładów doświad-  
czalnych i gospodarstw rolnych  
w całym kraju
- **4 000 miejsc w 14-tu doskonale  
wyposażonych Domach Stu-  
denckich:** Internet przy każdym  
łóżku, kilkanaście stołówek stu-  
denckich
- **Nowoczesne obiekty sportowe:**  
kryta pływalnia, hale sportowe,  
kryte korty tenisowe, siłownia,  
boiska sportowe, ośrodek hipo-  
terapii

**KATEDRA BIOCHEMII (WYDZIAŁ  
ROLNICTWA I BIOLOGII SGGW)**

**prof. dr hab. Wiesław Bielawski  
– kierownik Katedry**

Katedra Biochemii została utwo-  
rzona w 1949 roku i była wówczas  
pierwszą placówką biochemiczną  
wśród polskich uczelni rolniczych. Jej  
organizatorem i pierwszym kierow-





Fotografia 3. Pracownicy i doktoranci Katedry Biochemii.

nikiem był prof. I. Reifer. W okresie 57 lat istnienia przeszła wiele zmian organizacyjnych i strukturalnych. Obecnie Katedra Biochemii wchodzi w skład Wydziału Rolnictwa i Biologii, zatrudniając 14. nauczycieli akademickich, w tym 3. profesorów i 11. doktorów (Fot. 3). Realizuje dydaktykę dla studentów studiów stacjonarnych, wieczorowych i zaocznych 9.

fizjologia roślin i zwierząt, genetyka, hodowla, biologia komórki. Umożliwiają także zrozumienie powiązań między mechanizmami biochemicznymi a wysokością i jakością plonów roślin uprawnych, efektywnością produkcji zwierzęcej i przetwórstwem surowców roślinnych i zwierzęcych.

Poza podstawowym kursem biochemii, w którym uczestniczy rocznie około 1700 studentów, pracownicy katedry prowadzą również zajęcia fakultatywne z biochemii ekologicznej, enzymologii, bioenergetyki,

biochemii klinicznej, biologii molekularnej, metabolizmu związków azotowych w roślinach i glebie, wykorzystania mikroorganizmów w ochronie środowiska i przemyśle. W ramach działalności dydaktycznej w katedrze opracowano szereg podręczników i skryptów

akademickich, monografii oraz dokonano kilku tłumaczeń książek. Opracowania te przez wiele lat służyły studentom różnorodnych kierunków studiów SGGW i pozostałych uczelni rolniczych oraz studentom biologii i biotechnologii niektórych uniwersytetów i politechnik. Działalność naukowa katedry aktualnie obejmuje zagadnienia dotyczące: biochemicznych mechanizmów odporności zbóż na porastanie, funkcji proteaz i ich inhibitorów w procesie wykształcania się i kielkowania ziarniaków zbóż, roli proteolizy w tolerancji odwodnienia, charakterystyki funkcjonalnej i molekularnej enzymów szlaku syntezy ABA, znaczenia fosforylacji skrobi tranzytowej w czasie jej rozkładu. Ponadto, od wielu lat rozwijane są badania nad asymilacją azotu nieorganicznego oraz przemianami aminokwasów u roślin o różnych typach fotosyntezy i w zmieniających się warunkach fizjologicznych. Na szczególną uwagę zasługują badania związane z metabolizmem bakterii



Fotografia 4. Pracownia biologii molekularnej.

kierunków studiów SGGW (biologia, biotechnologia, ochrona środowiska, ogrodnictwo, rolnictwo, technologia żywności, towaroznawstwo, zootechnika, żywienie człowieka). Głównym celem nauczania biochemii jest zapoznanie studentów z molekularnymi podstawami funkcjonowania żywych organizmów. Omawiane zagadnienia stanowią podstawę do lepszego zrozumienia takich przedmiotów jak



Fotografia 5. Sala ćwiczeń.



Fotografia 6. Sala ćwiczeń.

glebowych z rodzaju *Pseudomonas*, gdyż realizowane są niemal od początku istnienia katedry. Ostatnio dotyczą one zdolności tych bakterii do syntezy i wydzielania do podłoża wielu enzymów oraz sideroforów. Badania naukowe prowadzone są przy zastosowaniu najnowszych technik biochemicznych, metod biologii molekularnej i bioinformatyki. Laboratoria Katedry Biochemii wyposażone są w nowoczesną aparaturę naukową zakupioną w ramach grantów aparaturowych lub ze środków inwestycyjnych uczelni (Fot. 4). Niektóre z wyżej wymienionych tematów badawczych realizowane są w ramach współpracy z zagranicznymi instytucjami naukowymi, m.in. Uniwersytetem w Poczdamie, Uniwersytetem Benguriona w Izraelu, Uniwersytetem Walijskim w Aberystwyth. W wymianie doświadczeń naukowych z zagranicą uczestniczą zarówno pracownicy, doktoranci, jak i studenci starszych lat studiów (Fot. 5, 6).

**KATEDRA NAUK  
FIZJOLOGICZNYCH  
(WYDZIAŁ MEDYCYNY  
WETERYNARYJNEJ SGGW)**

**prof. dr hab. Tomasz Motyl –  
kierownik Katedry**

Katedra Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej jest jednostką SGGW, w której poza działalnością dydaktyczną jako priorytetowe uznaje się badania naukowe oraz kształcenie kadry naukowej. W skład Katedry wchodzi 3 zakłady: Biochemii, Dietetyki i Fizjologii, w których zatrudnionych jest łącznie 15 nauczycieli (5 profesorów, 3 doktorów habilitowanych, profesorów SGGW, 7 adiunktów) i 10 pracowników technicznych. Wieloletnim kierownikiem Katedry (1969–2000 r.) był prof. dr hab. Wiesław Barej, a od 2000 r. pełni tę funkcję prof. dr hab. Tomasz Motyl, profesor zwyczajny. Pracownicy Katedry prowadzą bardzo szeroką działalność dydaktyczną, łącznie 4925 godzin realizowanych w ramach 15 przedmiotów na kilku wydziałach SGGW. Przy Katedrze Nauk Fizjologicznych funkcjonuje jedno z najstarszych w SGGW stacjonarnych studiów doktoranckich: „Regulacja wzrostu i metabolizmu zwierząt oraz utrzymania ich zdro-

wia”, kształcąca absolwentów biologii, biotechnologii, weterynarii, zootechniki, rolnictwa i farmacji. W 2005 r. w Katedrze Nauk Fizjologicznych wypromowano 9 doktorów. W Katedrze prowadzone są badania naukowe z zakresu biochemii, biologii molekularnej, funkcjonalnej genomiki, cytofizjologii, dietetyki i klasycznej fizjologii. W 2005 r. realizowano 22 granty badawcze. Wymiernym efektem tej działalności było 109 publikacji, w tym 57 prac recenzowanych (z czego 41 w czasopiśmie z tzw. listy filadelfijskiej), 6 monografii i podręczników, 10 prac popularno-naukowych i 36 komunikatów naukowych prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych. Katedra posiada wiele, bardzo dobrze wyposażonych laboratoriów, m.in. pracownię cytometryczną z mikroskopem konfokalnym, laserowym cytometrem skaningowym i systemem MicroImage, pracownię funkcjonalnej genomiki ze skanerem mikromacierzy DNA i białka (Fot. 7), automatycznym hybrydyzátorem (Fot. 8) i zestawem do Real-time PCR, pracowni chromatografii wysokosprawnościowej i gazowej, laboratorium spektrometrii atomowej, 4 pracownie kultur komórkowych i 3 biologii molekularnej, a także w pełni wyposażoną zwierzętarnię.

Działalność naukowa Zakładu Biochemii aktualnie obejmuje zagadnienia wpływu makro- i mikroele-

mentów i innych składników diety (chrom, bor, karnityna, kwasy tłuszczowe, aminokwasy itd.) na ekspresję genów (nutrigenomika), procesy energetyczne, stan zdrowia zwierząt, a pośrednio i ludzi oraz wyjaśnienie mechanizmów na poziomie komórkowym, przez które te związki dzia-

łają. Działalność naukowa Zakładu Dietetyki koncentruje się na badaniach dotyczących bioaktywnych czynników pokarmowych zawartych w owocach, warzywach oraz grzybach i ich wpływu na metabolizm i zdrowotność. Badania prowadzone

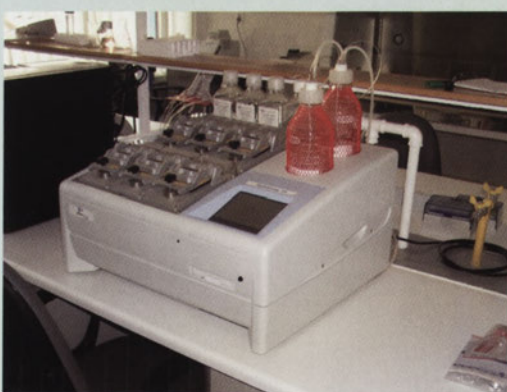
w współpracy z Hebrew University of Jerusalem wykazały, m.in., że naringina (flawon obecny w grejpfrutach) oraz inne bioaktywne czynniki zawarte w tych owocach, a także w jabłkach, pieczarkach i czosnku wywierają działanie hipolipidemiczne i przeciwutleniające u zwierząt karmionych dietami aterogennymi. Od wielu lat prowadzone są badania nad ochronnym wpływem kwasu 3-hydroksy-3-metylomasłowego (HMB), ketokwasowej pochodnej leucyny, na

organizm ludzi i zwierząt. Badania te zainicjowane w latach 90-ych ubiegłego wieku w USA w Iowa State University są obecnie kontynuowane w Polsce. Badania te udowodniły, że HMB pełni ważną fizjologiczną funkcję w pobudzeniu systemu

odpornościowego i zapobieganiu chorobom wyniszczającym, związanych z nasilonym katabolizmem białek. Świadczą o tym wyniki doświadczeń, w których podawanie HMB w połączeniu z glutaminą i



Fotografia 7. Skaner do mikromacierzy DNA.



Fotografia 8. Hybrydyzator mikromacierzy DNA.

argininą osobom chorym na AIDS zahamowało utratę masy ciała. Podobny efekt zaobserwowano u osób chorych na raka. Bardzo obiecujące są wyniki stosowania HMB u dzieci chorych na dystrofię mięśniową typu Duchanne'a. We współpracy z poznańską kliniką pediatrii związek ten jest podawany młodym chłopcom cierpiącym na ten typ choroby. We wszystkich przypadkach obserwujemy poprawę stanu zdrowia pacjentów z jednoczesnym zmniejszeniem bądź całkowitym wyeliminowaniem konieczności podawania steroidów. Obecnie w końcowej fazie są badania nad wpływem HMB na organizm myszy MDX z genetycznie uwarunkowaną dystrofią mięśniową. Inspiracją tego typu badań były korzystne efekty podawania HMB u dzieci.

W Zakładzie Fizjologii od wielu lat prowadzone są badania nad molekularnymi mechanizmami programowanej śmierci komórki (apoptozy, autofagii) na modelu komórek zdrowych oraz stransformowanych nowotworowo. Opracowana w Katedrze metoda homeostatycznej mikroskopii konfokalnej umożliwia ocenę ilościową dynamiki zmian zachodzących w żywej komórce w układzie czterowymiarowym (3D w czasie). Została ona wykorzystana do zobrazowania kinetyki redystrybucji białek zaangażowanych w proces regulacji i w fazę wykonawczą apoptozy i autofagii w doświadczeniu na żywych komórkach. Modelem fizjologicznym w badaniach apoptozy i autofagii jest gruczoł sutkowy w warunkach inwolucji oraz przewód pokarmowy podczas przebudowy we wczesnym okresie postnatalnym. Najczęściej eksplorowanymi modelami patologicznymi są rak sutka i gruczolakorak okrężnicy oraz linie komórkowe wyprowadzone z tych nowotworów, np. MCF-7, MDA-MB231, COLO205. Badania nad programowaną śmiercią komórek w gruczole sutkowym i raku sutka prowadzone są we współpracy z laboratoriami europejskimi w ramach Akcji COST B20 „Mammary gland development function and cancer”.

Inne badania dotyczą rozwoju morfologicznego i czynnościowego przewodu pokarmowego głównie prosiąt, szczurów i cieląt w okresie od urodzenia do pierwszych dni po

odsadzeniu. Obejmują one głównie problematykę wpływu bioaktywnych peptydów siary, mleka, pokarmów pochodzenia roślinnego oraz endogennych czynników troficznych (EGF, IGF), peptydów regulacyjnych (CCK) i hormonów (insuliny, leptyny, greliny) na procesy przebudowy nabłonka we wczesnym okresie rozwoju postnatalnego z użyciem komórkowych markerów dojrzewania nabłonka jelitowego. Jednym z istotnych celów perspektywicznych jest badanie na ile okres intensywnego rozwoju przewodu pokarmowego u noworodków może mieć wpływ na jego funkcję w wieku dojrzałym. Użycie nowo narodzonych prosiąt, z uwagi na występujące podobieństwa w budowie i funkcji do przewodu pokarmowego noworodków człowieka (o wiele większe niż tradycyjnych zwierząt laboratoryjnych), poza możliwością bezpośredniego wykorzystania wyników badań w produkcji zwierzęcej, dostarczy także niezbędnej wiedzy medycynie ludzkiej. Badania są prowadzone w ścisłej współpracy z placówkami PAN (Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt w Jabłonie, Instytut Biochemii i Biofizyki w Warszawie), uniwersyteckimi (Collegium Medium UJ, AR w Lublinie, KUL) oraz za granicą.

Kolejną wiodącą tematyką badawczą jest regulacja miogenezy i metabolizmu mięśni szkieletowych, w ramach którego realizowane są takie cele jak: ocena transkryptomu komórek mięśniowych u bydła i myszy z polimorfizmem genu miostatyny, porównanie transkryptomu mięśni szkieletowych u ras bydła wolno- i szybko-rosnących oraz opracowanie wzorca ekspresyjnego charakterystycznego dla szybkiego wzrostu masy mięśniowej, znaczenie zaburzeń homeostazy prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w rozwoju mięśnia szkieletowego, znaczenie mitochondrium w molekularnym mechanizmie miogenezy indukowanej insuliną, molekularne podstawy oporności na insulinę w mięśniach szkieletowych zwierząt z cukrzycą doświadczalną, transplantacje komórek miogennych do zwieracza cewki moczowej jako narzędzie inżynierii tkankowej w leczeniu stanów nietrzymania moczu. Powyższe badania realizowane są we współpracy z In-

stytutem Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, Agricultural Biotechnology Center, Gödöllő oraz innymi ośrodkami europejskimi w ramach Akcji COST 925 i COST 927.

#### **KATEDRA BIOTECHNOLOGII, MIKROBIOLOGII I OCENY ŻYWNOŚCI (WYDZIAŁ TECHNOLOGII ŻYWNOŚCI SGGW)**

**dr inż. Rafał Wołosiak – adiunkt  
w Katedrze**

Elementy biochemii stosowanej obecne są także w działalności naukowej i dydaktycznej Wydziału Technologii Żywności SGGW. Pracownicy Zakładu Oceny Jakości Żywności, jednostki należącej do Katedry Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności wykorzystują metody biochemiczne do badania zarówno zawartości wybranych składników żywności (np. enzymatyczne oznaczanie zawartości witaminy C, inhibitorów proteaz), jak i przede wszystkim do badania specyficznych właściwości i przemian składników żywności. Obejmuje to monitorowanie stopnia hydrolizy preparatów białkowych pod działaniem różnych proteaz oraz badania strawności preparatów białkowych i skrobiowych metodami wieloenzymatycznymi. Metody te znalazły m.in. zastosowanie przy charakterystyce białek krystalicznych o ciekawych właściwościach uzyskanych z frakcji globulin fasoli, preparatów białek roślin strączkowych stosowanych jako naturalne inhibitory reakcji oksydacyjnych oraz preparatów skrobi uzyskanych z nowych, niewykorzystywanych dotąd przemysłowo źródeł. Ponadto badania obejmują zakres modyfikacji oksydacyjnej białek roślinnych i zwierzęcych pod wpływem rodników hydroksylowych i kompleksu produktów autoksydacji kwasów tłuszczowych, monitorowane są zarówno straty labilnych aminokwasów, tworzenie wybranych pochodnych aminokwasów o charakterze antyżywnościowym, jak i przemiany strukturalne białek (polimeryzacja, fragmentacja) oraz ich strawność. Uzyskane w ten sposób doświadczenia wykorzystane zostały w dydaktyce podczas realizacji przedmiotu fakultatywnego „Biochemia żywności”.

## Odpowiedź Polskiej Federacji Biotechnologii na Stanowisko Komitetu Ochrony Przyrody PAN w sprawie upraw GMO i żywności z GMO z dnia 25. 11. 2005 r.



Tomasz Twardowski

Polska Federacja Biotechnologii, Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź

Z dużą przykrością zapoznaliśmy się ze „Stanowiskiem KOP” z dnia 25.11.2005 r., bowiem jest to rzadki przypadek polemiki wewnątrz środowiska naukowego, w którym naukowcy, przedstawiciele KOP, przedstawiają merytorycznie błędne informacje dotyczące zarówno danych naukowych, jak i prawnych czy też administracyjnych. Znamienne jest również, że KOP przesłał swoje stanowiska do PFB dopiero 20 stycznia 2006 r., aczkolwiek polemizuje z opiniami wcześniej prezentowanymi przez Federację. W swej odpowiedzi przedstawiamy jedynie najbardziej elementarne wyjaśnienia:

### 1. KOP PODAJE:

„(...) Dla przypomnienia KOP PAN wskazuje na uchwały samorządów 15 województw, sprzeciwiające się wprowadzaniu żywności, pasz i upraw genetycznie zmodyfikowanych roślin na obszar swoich województw, protesty licznych organizacji pozarządowych wskazujące na zagrożenia powodowane wprowadzaniem GMO, a także najnowsze wyniki badań i obserwacji, również dotyczące Polski, wskazujące na niedopuszczalne lekceważenie zasad bezpieczeństwa konsumentów, zwierząt hodowlanych i zabezpieczenia środowiska przed nielegalnym i/lub nieświadomym wprowadzaniem do obrotu i uprawy roślin genetycznie zmodyfikowanych (...)”

### WYJAŚNIENIE:

W opinii Biura Prawnego Sejmu projekt uchwały w sprawie ustanowienia obszaru Rzeczypospolitej Polskiej strefą wolną od GMO:

– jest niezgodny z art. 87 Konstytucji, ponieważ wkracza w materię zastrzeżoną dla ustawy, naruszając obowiązujący system źródeł prawa,

- jest niezgodny z art. 69 Regulaminu Sejmu, ponieważ nie mieści się w żadnej z kategorii uchwał w tym spisie,
- w sposób nieuprawniony ingeruje w rozgraniczenie kompetencji władz: Sejmu i rządu (art. 10 Konstytucji) oraz rządu i samorządu terytorialnego (art. 148 pkt 6, art. 94 i art. 87 ust. 2 Konstytucji),
- jest sprzeczny z ustawą o organizmach genetycznie zmodyfikowanych i narusza konstytucyjną zasadę praw nabytych (art. 2 Konstytucji),
- jest niezgodny z dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2001/18/WE oraz dyrektywą Rady 2002/53/WE w zakresie, w jakim wprowadza generalny zakaz upraw GMO.

Negatywna decyzja Sądu UE I Instancji (Luksemburg, 3 IX 2005):

„The European Union (EU) Court of First Instance dampened the draft law set by the Upper Austria Region to ban the planting of genetically modified crops. The Court said Austria failed to present science-based data to justify their case and arguments invoking the precautionary principle lacked merit.” (The EuropaBio website at <http://www.europabio.org> provides a link to the court order).

W ocenie Komisji Europejskiej, na podstawie wykonanych 81 projektów badawczych z udziałem GMO w zakresie biobezpieczeństwa Komisja oświadczyła, że prace z GMO nie tylko nie są zagrożeniem, ale w realnych warunkach są wręcz bezpieczniejsze niż standardowe rośliny (Firoz AMI-JEE, Pioneer Overseas Corporation and European Network of GMO Laboratories, United Kingdom, Brussels, 11-13.11.2002).

International Life Sciences Institute, 26-28.06.2000 r., Limelette, Belgia.

Konkluzje dotyczące żywności (pasz) GM:

- DNA, włączając rekombinowany DNA, składa się z tych samych czterech nukleotydów;
- obecnie stosowane techniki rekombinacji w łańcuchu żywnościowym nie powodują zmian w chemicznej charakterystyce DNA (biorąc pod uwagę naturalne zróżnicowanie sekwencji DNA),
- nie ma różnic w podatności rekombinowanego DNA i pozostałego DNA na hydrolizę chemiczną lub enzymatyczną,
- przemiany produktów trawienia DNA nie zależą od pochodzenia DNA,
- DNA nie jest toksyczne przy zwykłych poziomach spożycia,
- nie ma dowodów potwierdzających alergenne lub inne immunogenne właściwości DNA z konsumowanej żywności modyfikowanej genetycznie,
- nie wyklucza się możliwości obecności, łączenia, ekspresji pozostałych zewnątrzkomórkowych fragmentów DNA z żywności przez mikroflorę przewodu pokarmowego,
- nie ma dowodów na wbudowywanie DNA ze źródeł pokarmowych w genom ssaków,
- spożycie żywności modyfikowanej genetycznie nie powoduje mierzalnych zmian w całkowitej ilości spożytego DNA.

### 2. W OCENIE KOP:

„(...) Tworzymy dopiero system prawny (spóźniona nowelizacja ustawy o GMO), system administracyjny (odpowiednie organy kontrolne) i system monitoringu (laboratoria referencyjne (...)”

### WYJAŚNIENIE:

Nie można zgodzić się z takim stanowiskiem, bowiem od kilku lat obowiązują uregulowania prawne zbieżne z normami Unii Europejskiej.

Zasadnicze polskie uregulowania prawne w zakresie biotechnologii są następujące:

- 22.06.2001, ustawa „O GMO” (Dz. U., 25.07.2001, nr 76, poz. 811);
- 23.08.2001, ustawa „O Paszach” (Dz. U., 25.10.2001, nr 123, poz. 1350);
- 11.05.2001, ustawa „O żywności i żywieniu” (Dz. U., 22.06.2001, nr 63, poz. 634);
- 16.03.2001, ustawa „O rolnictwie ekologicznym” (Dz. U., 22.06.2001, nr 63 poz. 634).

Ustawa „O GMO”, która ma zasadnicze znaczenie, jest zgodna i powstała na podstawie następujących dyrektyw Wspólnot Europejskich:

1) 90/219/EWG z 23 kwietnia 1990 r. w sprawie ograniczonego stosowania mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie (Dz. Urz. WE L 117 z 08.05.1990);

2) 98/81/WE z 26 października 1998 r. zmieniającej dyrektywę 90/219/EWG w sprawie ograniczonego stosowania mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie (Dz. Urz. WE L 330 z 5.12.1998);

3) 2001/18/WE z 12 marca 2001 r. w sprawie zamierzonego uwalniania do środowiska organizmów zmodyfikowanych genetycznie i uchylenia dyrektywy 90/220/EWG (Dz. Urz. WE L 106 z 17.04.2001).

Ustawa o organizmach genetycznie zmodyfikowanych transponuje również zagadnienia przewidziane

w **Protokole kartageńskim o bezpieczeństwie biologicznym**, w tym **zasadę przezorności** [„ (...) Kto podejmuje działalność, której negatywne oddziaływanie na środowisko nie jest jeszcze w pełni rozpoznane, jest obowiązany, kierując się przezornością, podjąć wszelkie możliwe środki zapobiegawcze (...)”].

Do zasadniczej ustawy „O GMO” opracowane zostały rozporządzenia wykonawcze dotyczące:

- „Oceny zagrożeń dla zdrowia ludzi i środowisk” (Dz. U., 2002, nr 107, poz. 944);
- „Funkcjonowania Komisji ds. GMO” (Dz. U., 2002, nr 19, poz. 196);
- „Badań i wydawanie opinii w dziedzinie GMO” (Dz. U., 2002, nr 73, poz. 674);
- „Listy organizmów patogennych oraz ich klasyfikacji” (Dz. U., 2002, nr 212, poz. 1798);
- „Wzorów wniosków dotyczących zgód i zezwoleń” (Dz. U., 2002, nr 87, poz. 797).
- Szczególne znaczenie dla rozwoju biotechnologii ma ustawa regulująca zagadnienia własności intelektualnej: Dz. U., z 17.07.2002 r., nr 108, poz. 945.

### 3. SZCZEGÓLNIIE SMUTNY JEST FAKT ZNANY KOP:

„(...) wprowadzenia w mało przemyślny sposób eksperymentalnego uwalniania GMO do środowiska, a także nielegalnego (i prawdopodobnie nieświadomego) wprowadzania żywności z domieszką GMO na rynek krajowy. Istnieją również poważne

obawy, że Polska staje się krajem nielegalnego tranzytu żywności i upraw GMO do państw poza Unią Europejską (...)”

### WYJAŚNIENIE:

Zgodnie z obowiązującym polskim prawem należy informować o znanych faktach popełnienia przestępstwa. Kto nie dopełnia tego obowiązku staje się współwinnym popełnienia przestępstwa.

### 4. CYTAT KOLEJNY:

„(...) Kolejnym argumentem przeciw wprowadzaniu GMO jest ukryte bezrobocie na polskiej wsi, które może przejść w jawne, w wyniku bankructwa polskich rolników, nie mogących sprzedać swoich produktów wobec konkurencji z GMO. (...)”

### WYJAŚNIENIE:

Trudno uznać za godne podejmowania jakiegokolwiek dyskusji założenie, że produkcja ekologiczna bezrobotnych polskich rolników uratuje kogokolwiek przed bankructwem.

### KONKLUDUJĄC:

Należy z bólem stwierdzić, że argumenty błędne merytorycznie mają tak silne poparcie w środowisku, które z definicji winno opierać się w polemice na faktach. Dyskusja jest podstawą rozwoju, ale musi opierać się na danych prawdziwych i możliwych do zweryfikowania w sposób obiektywny, a nie na hasłach demagogicznych i populistycznych.

Łódź 8.02.2006 r.

## JUBILEUSZ 70-LECIA URODZIN PROFESOR IRENY SZUMIEL



W dniu 14 lutego 2006 w Sali Seminaryjnej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej odbyło się spotkanie z okazji jubileuszu 70-lecia urodzin Prof.

Ireny „Izy” Szumiel. Sylwetkę dostojnej Jubilatki przedstawił Dyrektor ds. naukowych IChTJ prof. dr hab. Jacek Michalik. Gratulacje i życzenia długiej i owocnej dalszej pracy naukowej złożyli Dyrektor IChTJ doc. Lech Waliś i Przewodniczący Rady Naukowej prof. dr hab. Krzysztof Bobrowski, a wychowanek Pani Profesor, doc. Marcin Kruszewski wygłosił laudację. Obchody uświetnił wykład okolicznościowy wygłoszony przez prof. Marię Kapiszewską z Uniwersytetu Jagiellońskiego, wieloletnią współpracowniczkę Prof. Szumiel.

Kariera naukowa Prof. Szumiel rozpoczęła się w 1960 roku, kiedy po ukończeniu studiów podjęła pracę na Uniwersytecie Warszawskim w Katedrze Biochemii. W 1965 roku Pani Profesor obroniła doktorat, a Jej działalność naukowa nabrała rozpędu. W latach 1963, 1966, 1970 zdobyła nagrodę im. B. Skarżyńskiego za najlepszy artykuł przeglądowy w Postępkach Biochemii, a w roku 1970 nagrodę Ministra Szkolnictwa Wyższego za współautorstwo podręcznika „Praktikum z biochemii”. W 1968 roku podjęła pracę w Instytucie Badań Jądrowych.

Po przyjeździe do IBJ Pani Iza zaczęła pracować w Pracowni Radiobiologii komórkowej. W latach 1974–1975 Pani Iza wyjechała na stypendium Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej do Medical Radiobiology Laboratory, Institute of Radiotherapeutics and Oncology, Glasgow, W. Brytania. Tam razem z prof. A.H.W. Niasem prowadziła badania *in vitro* na komórkach chomika chińskiego nad interakcją cisplatyny i promieniowania jonizującego. Badania te przyniosły Pani Izie dwie nagrody (1973, 1979) Rady d/s Atomistyki za badania w dziedzinie radiobiologii i jedną (1976) nagrodę Polskiego Towarzystwa Badań Radiacyjnych za badania w dziedzinie radiobiologii komórkowej. Po uzyskaniu stopnia dra habilitowanego, Pani Iza kontynuowała badania nad odpowiedzią komórek ssaków na promieniowanie jonizujące. W latach 80-tych pomimo ogólnego marazmu i zastoju Pani Iza nie próżnowała. Działała w Komitecie Polskiej Nomenklatury Biochemicznej, 1972–1987, Radzie Redakcyjnej kwartalnika „Postępy Biochemii” 1973–1990, Radzie Redakcyj-

nej miesięcznika International Journal of Radiation Biology, 1987–1991, była Przewodniczącą Komisji Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii Komitetu Fizyki Medycznej PAN – 1988–1991, a członkiem Komisji do 2003. Jest też Kierownikiem Pracowni Radiobiologii Komórkowej i prowadzi badania nad procesami biochemicznymi związanymi z wrażliwością komórek ssaków na promieniowanie jonizujące.

W 1990 roku Pani Iza otrzymała tytuł profesora i objęła kierownictwo Zakładu X. Pod Jej czujnym okiem wypromowało się 9 doktorów i 2 doktorów hab. W 1998 w uznaniu zasług w dziedzinie radiobiologii Pani Iza została uhonorowana medalem M. Skłodowkiej-Curie przyznawanym przez Polskie Towarzystwo Badań Radiacyjnych im. M. Skłodowskiej-Curie, a w roku 2000 została nagrodzona medalem Hannsa Langendorffa przyznawanym przez Niemieckie Towarzystwo Medyczne Ochrony Radiologicznej. W 2001 roku Pani Iza została zaproszona do napisania artykułu do bardzo prestiżowego numeru Radia-

tion Research “Women in science”. Zainteresowania Pani Profesor nie ograniczają się tylko do badań naukowych. Nie wszystkim pewnie wiadomo, że Pani Iza jest zapalonym ornitologiem amatorem i często wybiera się na wyprawy obserwować ptaki, maluje akwarele i klei kwiatowe kolaże. Jej działalność poza naukową została uhonorowana dyplomem Ruchu Piękniejsza Polska, przyznawanym za tworzenie piękna, którym możemy szczerzyć się przed światem.

Przedstawiona sylwetka ukazuje wybitnego naukowca i wyjątkowego człowieka, który poza osobistym istotnym wkładem do nauki poświęcił wiele miejsca w swoim życiu na organizację działalności naukowej i dydaktycznej w kraju i za granicą. Jej związki z IChTJ i Jej udział w tworzeniu środowiska naukowego w Warszawie są bezsporne i zaowocowały utworzeniem zespołu naukowego mogącego szczerzyć się obecnie istotnymi osiągnięciami naukowymi.

**Marcin Kruszewski**

## WIADOMOŚCI KRAJOWE

**TEORIA ODDYCHANIA ROŚLIN ZWERYFIKOWANA** przez międzynarodowe badania z udziałem Polaka, prof. **Jacka Oleksyna** z Pracowni Ekofizjologii Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku. Badania prowadzili Amerykanie: Peter B. Reich z Uniwersytetu Minnesota, Mark G. Tjoelker z Uniwersytetu w Teksasie i Jose-Lois Machado ze Swarthmore College w Pensylwanii. Naukowcy udowodnili, że metabolizm oddechowy, wytwarzający energię, jest uzależniony od ilości azotu zawartego w roślinie, a nie od jej rozmiarów. Przebadali więcej niż 500 roślin z ponad 40 gatunków. Dotychczas obowiązywała teoria fizyka Geoffreya Westa i dwóch ekologów, Jamesa Browna i Briana Enquista, według której natężenie procesów metabolicznych, w tym oddechowego, w organizmach żywych, zmniejsza się wraz ze wzrostem masy organizmu. Zespół badaczy, z prof. Jackiem Oleksynem, wykazał, że w organizmach roślinnych o różnej masie mogą zachodzić procesy metaboliczne w takim samym natężeniu w przeliczeniu na jednostkę masy, ale w roślinach o jednakowej masie, lecz o

różnej zawartości azotu, będą toczyły się procesy metaboliczne o różnej intensywności. Tak było w badaniu stokrotki i sosny masztowej, wg wypowiedzi prof. Oleksyna. Prof. Oleksyn uważa, że odkrycie, iż to azot reguluje metabolizm oddechowy, może umożliwić dokładniejsze badania globalnych zmian klimatycznych. Ponieważ rośliny wydzielają dwutlenek węgla w procesie oddychania, zapewniają energię niezbędną do wzrostu i funkcjonowania, to odkrycie zależności metabolizmu oddechowego i zawartości azotu w roślinach sugeruje, że będzie można udoskonalać techniki opisywania obiegu węgla w ekosystemach, a tym samym badania globalnych zmian klimatycznych. Wyniki badań opublikowano w *Nature* 2006 Jan 26: 439(7075): 399–400 w pracy pt. *Universal scaling of respiratory metabolism, size and nitrogen in plants* (wg PAP-Nauka w Polsce).

**WIADOMOŚCI Z INSTYTUTU BIOCHEMII TECHNICZNEJ POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ. Centrum Doskonałości Biotechnologia Przemysłowa (CD BIOP).** Na mocy

Uchwały nr 47/2004 Komitetu Badań Naukowych z dn. 16.09.2004 roku w sprawie przyznania środków finansowych na dofinansowanie działań koordynacyjnych i organizacyjnych Centrów Doskonałości na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności powstało **Centrum Doskonałości Biotechnologia Przemysłowa (CD BIOP)**. Głównym inicjatorem utworzenia CD BIOP był **prof. dr hab. Stanisław Bielecki**, dyrektor Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej, mając na uwadze oczekiwania UE (jak poniżej).

Zainteresowanie biotechnologią przemysłową, która opiera się głównie na biokatalizie i bioprocessach nabiera w ostatnim okresie szczególnego znaczenia w Unii Europejskiej. Zwiększenie konkurencyjności i innowacyjności swej gospodarki Europa widzi w biotechnologii przemysłowej, czego wyrazem jest wprowadzenie w 2004 r., w 6 Programie Ramowym hasła „Biotechnologia Przemysłowa” jako tematyki dla grupy projektów zintegrowanych o najwyższym priorytecie. Uznano, że biotechnologia przemy-

słowa (tzw. „biała” biotechnologia) uczyni aktywność przemysłową bardziej przyjazną dla środowiska i jednocześnie obniży koszty wytwarzania poprzez zmniejszenie zużycia surowców i energii, redukcję odpadów, czy też bioremediację skażonego środowiska. Istotną rolę w rozwoju biotechnologii przemysłowej przypisuje się krajom akcesyjnym jako miejscu wytwarzania cennych produktów z surowców odnawialnych. Aby wyjść naprzeciw oczekiwaniom rynku we wrześniu 2004 r. utworzono Centrum Doskonałości Biotechnologia Przemysłowa, które z kolei było głównym uczestnikiem w procesie tworzenia Polskiej Platformy Technologicznej Biotechnologii zainicjowanej podpisaniem, w styczniu 2005 roku, porozumienia między 19 przedsiębiorstwami, 5 Centrami Zaawansowanych Technologii, 6 Centrami Doskonałości oraz instytutami naukowymi i Polską Federacją Biotechnologii.

Do misji utworzonego Centrum Doskonałości Biotechnologia Przemysłowa należy:

- koncentracja wiedzy specjalistycznej z zakresu biokatalizy stosowanej;
- utworzenie sieci jednostek naukowych, wdrożeniowych i przedsiębiorstw pracujących w obszarze biokatalizy stosowanej oraz ich wspieranie;
- udostępnienie nowej wiedzy z tej dziedziny dla jednostek współpracujących z Centrum;
- skracanie czasu badań wdrożeniowych;
- stworzenie długoterminowej strategii badawczo-wdrożeniowej biotechnologii przemysłowej;
- promowanie innowacji w zakresie biokatalizy stosowanej;
- pozytywne oddziaływanie na rynek pracy;
- uczynienie Polski atrakcyjnym partnerem dla współpracy międzynarodowej w zakresie biotechnologii przemysłowej.

Ministerstwo Nauki i Informatyzacji odznaczyło w 2005 roku Politechnikę Łódzką dyplomem za projekt pod nazwą „CELULOZOWY MATERIAŁ OPATRUNKOWY” realizowany w Instytucie Biochemii Technicznej pod kierownictwem prof. dr hab. **Stanisława Bieleckiego** (Fot. 1).

**Nagroda za międzynarodowe osiągnięcia wynalazcze** przyznana została przez ministra MNiI, prof. Michała Kleibera twórcom: Celulozowego Materiału Opatrunkowego – prof. **Stanisławowi Bieleckiemu** i dr Alinie Krystynowicz, naukowcom z Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej.

Podczas Ogólnopolskiego Seminarium *Biotechnologia Molekularna* (BioMillennium 2005, Gdańsk, 14–15 października 2005 r.) dr inż. **Aneta Białkowska** (Fot. 2) otrzymała I nagrodę ufundowaną przez prof. **Wacława Szybalskiego** dla **najlepszego młodego biotechnologa**, biorącego udział w konferencji. Nagrodę przyznano za pracę zatytułowaną „Antarctic  $\beta$ -galactosidase from *Pseudomonas sp.22b*: kinetic and molecular adaptation to cold”. Nagrodzony referat stanowił trzon pracy doktorskiej laureatki, wykonanej w Instytucie Biochemii Technicznej na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. Wśród ponad stu uczestników z całej Polski istotny był udział przedstawicieli IBT PŁ, w tym prof. **Marianny Turkiewicz** (Fot. 2), która od lat prowadzi badania nad enzymami organizmów antarktycznych i ich praktycznym wykorzystaniem, a na konferencji przewodniczyła sesji



Fotografia 2. Profesor dr hab. Marianna Turkiewicz i doktor inż. Aneta Białkowska.

tematycznej dotyczącej ekstremofili, sama rozpoczynając ją referatem pt. „Drobnoustroje ekstremofilne jako źródło użytecznych biomolekuł”.

Projekty badawcze realizowane w Instytucie Biochemii Technicznej (OBT) Politechniki Łódzkiej:

– Zintegrowany projekt europejski w ramach VI Programu Ramowego: „Advanced interactive materials by design” (AIMS) (Projektowanie zaawansowanych materiałów interaktywnych), o numerze rejestracyjnym FP62002-NMP, jest kierowany przez prof. A. Górkę z Uniwersytetu w Dortmundzie. Współkonawcą grantu jest prof. **dr hab. Grzegorz Bujacz**, kierujący Pracownią Krystalograficzną Instytutu Biochemii Technicznej PŁ. Badania są realizowane od 2004 r. i

będą kontynuowane do 2009 r. Celem tego grantu jest zaprojektowanie materiałów stanowiących wypełnienie kolumn chromatograficznych w celu obniżenia kosztów produkcji przeciwciał monoklonalnych. Zadaniem grupy z IBT są badania strukturalne domeny Fc przeciwciał monoklonalnych z ligandami peptydomimicznymi stanowiącymi aktywny składnik kolumn chromatograficznych.

– Granty zamawiane celowe: 1. pt. „Technologia produkcji materiałów opatrunkowych z celulozy bakteryjnej” kierowany przez prof. **dr hab. S. Bieleckiego**, a realizowany wspólnie z Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich (dr n. med. M. Kawecki), w okresie 14.11.2003–13.11.2006 r. 2. pt. „Technologia otrzymywania preparatu wieloenzymowego z *Aspergillus niger* IBT-90, przydatnego w procesach obróbki wyrobów włókienniczych” realizowany wspólnie z Instytutem Włókiennictwa w Łodzi i z Zakładem PEKTOWIN w Jaśle, a kierowany przez **dr hab. T Antczaka**. Okres realizacji: 14.11.2003–13.11.2006 r.

– Grant własny: pt. „W poszukiwaniu nowych zimnolubnych enzymów lipolitycznych o dużym potencjale biotechnologicznym” realizowany wspólnie z Katedrą Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej, a kierowany przez prof. **dr hab. Mariannę Turkiewicz**. Okres realizacji: marzec 2006–luty 2009 r. Celem tego grantu jest utworzenie biblioteki metageno-

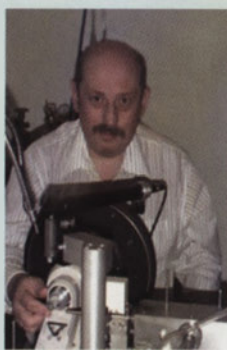
mowego DNA (DNA środowiskowy, eDNA), pochodzącego z wybranej próby gleby antarktycznej, znalezienie w niej genów enzymów lipolitycznych, analiza ich sekwencji metodami bioinformatycznymi, ekspresja wytypowanych genów w *E. coli*, izolacja lipaz i ocena ich właściwości pod kątem praktycznego wykorzystania w reakcjach syntezy. Autorzy spodziewają się znaleźć w ten sposób unikatowe lipazy, pochodzące z mikroorganizmów nie dających się hodować w warunkach laboratoryjnych

– Granty zamawiane: 1. pt. „Wyjaśnienie wpływu 5-tiofosforanów nukleozydów (dNMPs) na proliferację ludzkich komórek śródbłonna naczyń oraz ich migrację i angiogenezę. Próba identyfikacji receptora nukleotydowego aktywowanego przez dNMPs” Kierownik projektu: **prof. dr hab. Maria Koziolkiewicz**, (IBT PŁ). Koordynatorem projektu jest Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych. Okres realizacji: 1.09.2002–31.08.2005 r. 2. pt. „Zmiany aktywności biologicznej składników prozdrowotnych warzyw kapustnych w czasie przetwarzania i składowania” Kierownik grantu: **dr inż. Anna Podśędek** (IBT PŁ). Okres realizacji: 18.12.2003–18.12.2006 r.

– Granty promotorskie: 1. pt. „Cbl (ang. *CysB-like protein*)- regulatorowe białko transkrypcyjne – krystalizacja i określenie struktury białka”, autorstwa mgr inż. Emilii Stec; promotor **prof. dr hab. Grzegorz Bujacz**. Celem tego grantu są badania biochemiczne i strukturalne czynnika transkrypcyjnego z rodziny Lys-R odpowiedzialnego za ekspresję białek związanych z syntezą cysteiny w komórkach bakteryjnych. Synteza tego aminokwasu związana jest z dwoma czynnikami transkrypcyjnymi Cys-B i Cbl. Pierwszy z nich reguluje syntezę cysteiny, gdy dostępne są nieorganiczne źródła siarki, natomiast drugi w warunkach niedoboru siarczanów. 2. pt. „Metodologiczne aspekty badań krystalograficznych białek klasy PR10 z łubinu żółtego związanych z patogenizacją roślin”, autorstwa mgr inż. Rafała Dolota; promotor **prof. dr hab. Grzegorz Bujacz**. Białka PR10 biorą

udział w systemie obronnym roślin i są wydzielane w zwiększonych ilościach w warunkach infekcji patogenem. Ich funkcja nie jest dokładnie poznana, sugerowane są dwa mechanizmy ich działania: hydroliza RNA lub wiązanie roślinnych hormonów z grupy cytokinin. W podejmowanych badaniach strukturalnych ma być określony sposób wiązania cytokinin przez białka PR10. Dodatkowo badany jest wpływ sposobu krioprotekcji na jakość struktury (wg informacji od p. prof. Mirosławy Szczęsnej-Anctzak).

Prof. **MINOR i OTWINOWSKI** autorami drugiej najczęściej cytowanej



Fotografia 3. Profesor Włodek Minor.

pracy ostatniej dekady. Czasopismo *The Scientist* sporządziło listę najczęściej cytowanych publikacji naukowych ostatniej dekady. Pozycję drugą tego rankingu zajmuje praca profesorów Władysława Minora (Fot. 3) i Zbigniewa Otwinowskiego (Fot. 4), pt. *Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode*, opublikowana w 1997 r. Naukowcy z laboratoriów zajmujących się krystalografią publikując swoje prace cytowali metodę opisaną przez prof. Minora i Otwinowskiego aż 11,5 tysięcy razy. Obecnie prof. Włodek (tak brzmi Jego imię na stronie www. Zakładu, w którym pracuje) Minor jest profesorem Wydziału Fizjologii Molekularnej i Biofizyki Uniwersytetu Wirginia w Charlottesville, a prof. Zbyszek Otwinowski kieruje zespołem badawczym w uniwersyteckim Southwestern Medical Center w Dallas. Po studiach na Uniwersytecie Warszawskim (prof. Minor w 1969 r., prof. Otwinowski w 1979 r.) obaj młodzi naukowcy pracowali naukowo na UW, lecz nie współpracowali ze sobą. Niezależnie od siebie wyjechali w latach 80. do Stanów Zjednoczonych. Tam zainteresowali się rentgenowską krystalografią białek. W 1993 roku wspólnie rozpoczęli pracę nad własnym oprogramowaniem służącym do ustalania struktur białkowych. Technika krystalografii

rentgenowskiej jest obecnie najlepszą ze stosowanych metod uzyskania struktury białek. Opiera się na zjawisku rozpraszania wiązki promieni rentgenowskich na kryształach białka, a to umożliwia ustalenie przestrzennego położenia większości atomów w cząsteczce białka. Jednym z kluczowych etapów tego procesu jest zredukowanie ogromnej ilości uzyskiwanych danych – milionów plamek dyfrakcyjnych pozostawionych na filmie rentgenowskim przez rozproszone promienie. Jest to etap niezbędny do ustalenia pełnego obrazu struktury białka. Na nim skoncentrowały się badania obu profesorów, zakończone stworzeniem programu komputerowego pozwalającym na skrócenie etapu redukcji danych dyfrakcyjnych, i tym samym całego procesu wyznaczania struktury białka. Dzięki programowi komputerowemu czas trwania tego etapu badania wynosi 10 minut (a nie miesiące czy lata). Laboratoria badawcze na świecie najchętniej korzystają z tego efektywnego i wiarygodnego programu. W latach 2004–2005 był on zastosowany w blisko 80% badań ustalających struktury białek według ich kryształów (PAP, Nauka w Polsce).

**WARSZAWSKIE KONSORCJUM NAUKOWE.** W

sierpniu 2005 r. prof. Michał Kleiber, ówczesny Minister Nauki i Informatyzacji podpisał z Prezydentem Warszawy, Lechem Kaczyńskim, porozumienie dotyczące utworzenia Warszawskiego Parku Technologicznego (WPT). WPT ma być inicjatywą sprzyjającą przepływowi wiedzy i technologii pomiędzy jednostkami naukowymi o przedsiębiorstwami oraz komercjalizacji wyników badań. Aby tego dokonać, w lutym b.r. 10 różnych uczelni wyższych Warszawy podpisało umowę powołującą Warszawskie Konsorcjum Naukowe. W skład Konsorcjum wchodzi: Akademia Medyczna, Ośrodek Przetwarzania Informacji, Politechnika Warszawska, Polska Akademia Nauk, Polsko-Japońska Wyższa Szkoła Technik Komputerowych, Szkoła Główna Handlowa, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Uniwersytet Warszawski, Wojskowa Akade-



Fotografia 4. Profesor Zbyszek Otwinowski.

rentgenowskiej jest obecnie najlepszą ze stosowanych metod uzyskania struktury białek. Opiera się na zjawisku rozpraszania wiązki promieni rentgenowskich na kryształach białka, a to umożliwia ustalenie przestrzennego położenia większości atomów w cząsteczce białka. Jednym z kluczowych etapów tego procesu jest zredukowanie ogromnej ilości uzyskiwanych danych – milionów plamek dyfrakcyjnych pozostawionych na filmie rentgenowskim przez rozproszone promienie. Jest to etap niezbędny do ustalenia pełnego obrazu struktury białka. Na nim skoncentrowały się badania obu profesorów, zakończone stworzeniem programu komputerowego pozwalającym na skrócenie etapu redukcji danych dyfrakcyjnych, i tym samym całego procesu wyznaczania struktury białka. Dzięki programowi komputerowemu czas trwania tego etapu badania wynosi 10 minut (a nie miesiące czy lata). Laboratoria badawcze na świecie najchętniej korzystają z tego efektywnego i wiarygodnego programu. W latach 2004–2005 był on zastosowany w blisko 80% badań ustalających struktury białek według ich kryształów (PAP, Nauka w Polsce).



nia Techniczna oraz Wyższa Szkoła Przedsiębiorczości i Zarządzania im. Leona Koźmińskiego. Umowa została zawarta na czas nieokreślony. Konsorcjum jest otwarte na przyjęcie nowych członków za zgodą dotychczasowych członków Umowy. Celem Konsorcjum jest integracja warszawskiego środowiska naukowego w pracach nad rozwojem nowoczesnych technologii oraz ich aplikacji, wspierając poprzez te działania poprawę konkurencyjności gospodarki Warszawy. Do zadań Konsorcjum należy: stworzenie platformy współpracy dla członków Konsorcjum dla realizacji wspólnych projektów; opracowanie „Programu działania Warszawskiego Konsorcjum Naukowego na lata 2007-2013”; współudział w opracowaniu koncepcji funkcjonowania WPT. Konsorcjum stanowi platformę do realizacji i pozyskiwania finansowania wspólnych projektów członków Konsorcjum w zakresie: badań naukowych, prac rozwojowych, projektów inwestycyjnych zgodnie z celami Konsorcjum (wg [www.mein.gov.pl](http://www.mein.gov.pl)).

**NAGRODY NAUKOWE COPERNICUS** zostały przyznane po raz pierwszy. Nagrody Copernicus zostały ustalone przez organizatorów konkursu polsko-niemieckiego, Fundację Nauki Polskiej i Deutsche Forschungsgemeinschaft. Nagrody te mają wyróżniać dwóch wybitnych i współpracujących ze sobą naukowców – polskiego i niemieckiego i będą przyznawane co dwa lata naukowcom co najmniej w stopniu doktora. Laureatami zostali: **prof. Barbara Malinowska** z Wydziału Farmaceutycznego AM w Białymstoku oraz **prof. Eberhardt Schlicker** z Wydziału Farmakologii i Toksykologii Uniwersytetu w Bonn. Naukowcy współpracują ze sobą w dziedzinie farmakologii i fizjologii od ponad 15 lat i zapraszają do udziału w badaniach wielu młodych polskich i niemieckich naukowców. Nagroda jest w części przeznaczona na podtrzymanie polsko-niemieckiej współpracy, a w części jest imienną nagrodą dla laureatów. Pani prof. Barbara Malinowska jest absolwentką Wydziału Biologii UW, a stopień doktora uzyskała w białostockiej AM. Była stypendystką Fundacji von Humboldta. Kieruje Zakładem Fizjologii Do-

świadczalnej AM w Białymstoku od 1986 r. Polskie Towarzystwo Farmakologiczne nagrodiło w 1995 r. Jej rozprawę habilitacyjną, jako najlepszą w dziedzinie farmakologii. Prof. Eberhardt Schlicker jest lekarzem po studiach we Fryburgu i Heidelbergu. Jest związany z Uniwersytetem w Bonn od 1986 r. Był laureatem nagrody Rottendorf Prize w roku 1993, przyznawanej przez Fundację Rottendorfa. Kandydatów do Nagrody mogą zgłaszać zarówno polscy, jak i niemieccy naukowcy (wg PAP, Nauka w Polsce).

Prof. **ANNA JADWIGA PODHAJSKA** (Fot. 5) – inicjatorka i orędowniczka utworzenia w Gdańsku jednostki kształcącej w zakresie biotechnologii, NIE ŻYJE; zmarła w Gdańsku, 5 lutego 2006 r. Życie prywatne i zawodowe Pani Profesor związane było z Trójmiastem. Ukończyła studia medyczne na wydziale lekarskim AMG i pracę zawodową rozpoczęła w Katedrze Mikrobiologii tejże Akademii, pod kierunkiem prof. Stefana Kryńskiego. Tu, w roku 1968 uzyskała stopień doktora i specjalizację z zakresu mikrobiologii lekarskiej. W roku 1987 habilitowała się, też w AMG, a tytuł profesora otrzymała w 1996 r. Włączyła się aktywnie w pracę naukową na Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii, w Katedrze Biochemii kierowanej przez prof. Karola Taylora. Staraniem Pani Profesor najpierw został utworzony na tym Wydziale Zakład, a następnie Katedra Mikrobiologii, którą kierowała do 1996 r. W tym czasie szczególnie znaczenie miała dla Niej współpraca z Laboratorium Badań nad Rakiem na Uniwersytecie Wisconsin, kierowanym przez prof. Wacława Szybalskiego. Właśnie praca naukowo-badawcza w tym laboratorium i współpraca z tą jednostką w latach 1981-1993 przyniosły znaczące osiągnięcia naukowe, cytowane powszechnie publikacje, a przede wszystkim idee utworzenia w Gdańsku nowoczesnej jednostki kształcącej w zakresie biotechnologii. Jej entuzjazm i wiara w

celowość przedsięwzięcia, doprowadziły do zjednoczenia środowisk naukowych Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku. Prof. Anna Podhajska, jako pełnomocnik Konferencji Rektorów Uczelni Trójmiasta doprowadziła w 1993 r. do powołania Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-AMG, i podjęła obowiązki prodziekana na nowo utworzonym Wydziale. Organizowała w nim od podstaw Katedrę Biotechnologii, którą kierowała do końca swojej aktywności zawodowej. Pani Profesor Anna Podhajska nigdy nie ograniczała się do wzorowego wypełniania obowiązków nauczyciela akademickiego. Jej pasją było jak najlepsze kształcenie młodzieży w zakresie nowoczesnych metod badawczych, opartych na technikach biologii molekularnej i inżynierii genetycznej. Z tej pasji zrodziła się myśl organizowania od 1994 r. Letnich Szkół Biotechnologii, gdzie wykładowcami byli najwybitniejsi naukowcy ze światowych laboratoriów.



Fotografia 5. Profesor Anna Jadwiga Podhajska.

Profesor starała się jak najszerzej rozpowszechnić, komercjalizować osiągnięcia naukowe i transferować je do firm biotechnologicznych. Dzięki Jej staraniom powstało w Gdańsku Centrum Transferu Technologii, a w Gdyni – Pomorski Park Naukowo-Technologiczny.

Prof. Anna Jadwiga Podhajska była bardzo zaangażowana w pracach Stowarzyszenia ScanBalt, powołanego przez uczelnie wyższe, szpitale i firmy biotechnologiczne, zlokalizowane w 11 krajach basenu Bałtyku, dla prowadzenia wspólnych badań i wdrażania nowoczesnych technologii. Była wiceprezydentem tego Stowarzyszenia.

Rodzinę kochała i pielęgnowała serdeczne więzy, młodzież rozumiała i swoich partnerów naukowych szanowała; efekty Jej znakomitej pracy pozostały, ale Ci, którzy mieli zaszczyt z Nią pracować i uczyć się od Niej – stracili Bliską Osobę. Na zawsze. (wg wspomnienia w Gazecie Uniwersyteckiej *on line* autorstwa

prof. Ewy Łojkowskiej i prof. Wiesława Makarewicza).

**CENTRALNE ARCHIWUM ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH.** W lutym b.r. w Bibliotece Uniwersytetu Warszawskiego odbyło się seminarium: Projekt budowy ogólnopolskiego repozytorium tekstów naukowych. Tworzone archiwum ma być drugą częścią trwającego od kilku lat projektu Biblioteki Wirtualnej Nauki, w której naukowcy mogą korzystać z czołowych zasobów światowej literatury naukowej. Platforma zawierająca archiwum polskich tekstów naukowych jest obecnie wdrażana, a uruchomiona ma być w ciągu kilku miesięcy. Głównymi partnerami tworzonego systemu są polskie biblioteki i wydawnictwa uniwersyteckie, które będą udostępniać powstałe u nich teksty, publikacje i raporty (wg [www.naukawpolsce.pap.pl](http://www.naukawpolsce.pap.pl)).

**EUROPEJSKIE KOLEGIUM POLSKICH I UKRAIŃSKICH UNIWERSYTETÓW (EKPiUV)** jest instytucją edukacyjną powołaną przez uniwersytety polskie i ukraińskie, tj. Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Katolicki Uniwersytet Lubelski oraz Narodowy Uniwersytet im. Tarasa Szewczeni w Kijowie, Narodowy Uniwersytet im. Iwana Franka we Lwowie oraz Narodowy Uniwersytet „Akademia Kijowska-Mohylańska. Celem Kolegium jest kształcenie przyszłych elit

polskich i ukraińskich, działających na rzecz współpracy między oboma krajami oraz znających, i co ważne rozumiejących wrażliwość i specyfikę sąsiada. Kolegium chce aktywnie kształtować świadomość europejską młodych Polaków i Ukraińców oraz młodzieży akademickiej innych krajów Europy Środkowo-Wschodniej, aby pracowali na rzecz integracji europejskiej. Kolegium ma wprowadzać problematykę Europy Środkowo-Wschodniej, w tym polsko-ukraińskiej, w obszar europejskich badań naukowych. Kolegium sprzyja rozwojowi polsko-ukraińskiej współpracy naukowej. Jest to ważne w momencie, gdy granica Unii Europejskiej przebiega wzdłuż granicy polsko-ukraińskiej. Zatem absolwenci Kolegium powinni stać się rzecznikami problematyki ukraińskiej i szerzej środkowoeuropejskiej w integrującej się Europie. Honorowym Przewodniczącym Konwentu EKPiUV jest prof. Jerzy Kłoczkowski, a zastępcą Przewodniczącego jest prof. Mykoła Żułyński, dyrektor Instytutu Literatury Narodowej Akademii Nauk Ukrainy (wg [www.ekpu.lublin.pl](http://www.ekpu.lublin.pl)).

**OBRONA DOKTORATU SŁUCHACZKI EKPiUV** odbyła się 13 marca 2006 r. w Collegium Novum AM w Lublinie. Natalia Tkaczenko przedstawiła rozprawę pt. *Ocena wybranych cytokin krwi obwodowej i płynu stawowego dzieci chorych na młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów.*

Promotorem doktorantki był prof. Jacek Roliński, a recenzentami prof. Ewa Tuszkiewicz-Misztal z AM w Lublinie i prof. Walentyna Czopjak z Narodowego Uniwersytetu Medycznego we Lwowie.

**PRACA DLA ABSOLWENTÓW.** Zachęcam do odwiedzenia strony internetowej [www.kariera.com.pl](http://www.kariera.com.pl), aby poznać oferty pracodawców. W wielu uczelniach funkcjonują Biura Karier, starając się pomóc absolwentom w znalezieniu pracy, odbycia staży czy praktyk zawodowych. Biura Karier nawiązują ścisłe kontakty z pracodawcami, proponują także prezentacje firm, targi pracy i sesje rekrutacyjne. W Uczelniach są dostępne informatory pt. *Magazyn Kariera*, z każdorazowo bogatą informacją o pracy, z różnych dziedzin.

**OFERTY WYDAWNICZE.** Wydawnictwo UJ proponuje podręczniki, monografie i różne pozycje z zakresu nauk przyrodniczych i humanistycznych. Koszt wysyłki 4,99 zł. Pełne informacje na stronie: [www.wuj.pl](http://www.wuj.pl). **Uniwersytet Gdański** oferuje różne wydawnictwa, interesujące pracowników z wykształceniem przyrodniczym. Warto odwiedzić witrynę: [www.wyd.bg.univ.gda.pl/oferta/](http://www.wyd.bg.univ.gda.pl/oferta/)

**Teresa Wesółowska**

## KOMUNIKAT

### KOMITET ORGANIZACYJNY XXII ZJAZDU POLSKIEGO TOWARZYSTWA HEMATOLOGÓW I TRANSFUZJOLOGÓW 6-9 WRZEŚNIA 2007 WARSZAWA

adres Komitetu:  
Instytut Hematologii i Transfuzjologii  
ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa, tel/fax. (022) 849-85-07  
[zjazd-pthit@ihit.waw.pl](mailto:zjazd-pthit@ihit.waw.pl)

Warszawa, 6 stycznia 2006

Komitet Organizacyjny XXII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów uprzejmie informuje o organizowanym w dniach 6-9 września 2007 r. w Warszawie, XXII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów.

**Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Warzocha**  
Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego XXII Zjazdu PTHiT

**Santa Cruz Biotechnology Inc.**  
**Światowy lider w produkcji odczynników**  
**do biologii molekularnej**

- W katalogu 2006 możecie Państwo znaleźć**
- 18300 I-rzędowych przeciwciał  
( w tym ponad 900 fosfospecyficznych)
  - ponad 5800 siRNA w nowej formule
  - nowy system detekcji ExactaCruz  
oraz AmpliCruz
  - ponad 2000 przeciwciał do ChIP
  - bogaty zestaw odczynników

**santa cruz biotechnology, inc**  
**2006** research antibodies catalog  
www.scbt.com

**Dystrybutor w Polsce**  
**"AMX" PUH, 93-362 Łódź, Bułgarska 12a**  
**tel/fax 042-6450064**  
**www.amx.pl.pl, e-mail: amx@amx.pl.pl**



*The Power to Question*

<http://rcin.org.pl>

# Dwa oblicza cytochromu *c*

Z historii biochemii

## Lech Wojtczak

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, Warszawa

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: l.wojtczak@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 1 kwietnia 2006 r.

Artykuł zaakceptowano 6 kwietnia 2006 r.

**Słowa kluczowe:** cytochrom *c*, oddychanie komórkowe, łańcuch oddechowy, apoptoza, ewolucja biochemiczna, MacMunn C.A., Keilin D.

## STRESZCZENIE

Artykuł opisuje historię badań nad cytochromem *c*. Przedstawiono okoliczności odkrycia cytochromów przez Charlesa MacMunna (1886) i ich ponownego odkrycia przez Davida Keilina (1925). Dalsze badania Keilina i innych autorów wykazały, że cytochrom *c* pełni podstawową rolę w oddychaniu komórkowym jako przenośnik elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym. W latach 90. ubiegłego stulecia wykazano, że – oprócz tej prożyciowej funkcji – cytochrom *c* może służyć jako cząsteczka sygnalizująca programowaną śmierć komórki, apoptozę. Przedstawiono niektóre hipotezy mechanizmów uwalniania cytochromu *c* z mitochondriów do cytosolu, zapoczątkowujących apoptozę. Badania nad zmiennością składu aminokwasowego cząsteczki cytochromu *c* posłużyły jako jeden z wyznaczników ewolucji świata żywego. Na koniec zarysowano sylwetkę Davida Keilina, odkrywcy cytochromów.

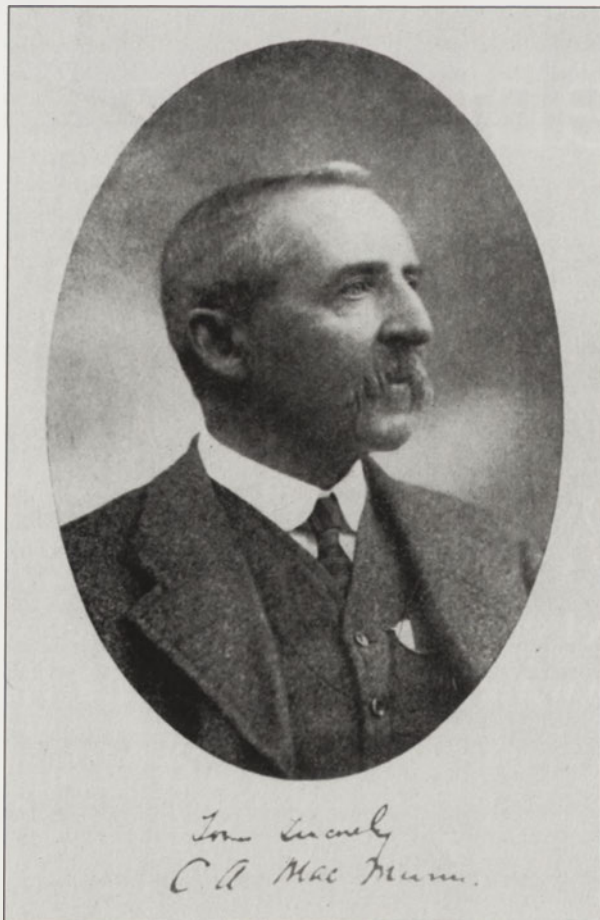
## WPROWADZENIE

Cytochromy należą do najszerzej rozpowszechnionych hemoprotein. Występują u wszystkich organizmów o tlenowym metabolizmie, zarówno u prokariotów jak i eukariotów. Ich najprostszym a zarazem najlepiej i najwcześniej poznanym przedstawicielem jest cytochrom *c*. W ubiegłym roku minęło 80 lat od powtórnego odkrycia cytochromów przez Davida Keilina.

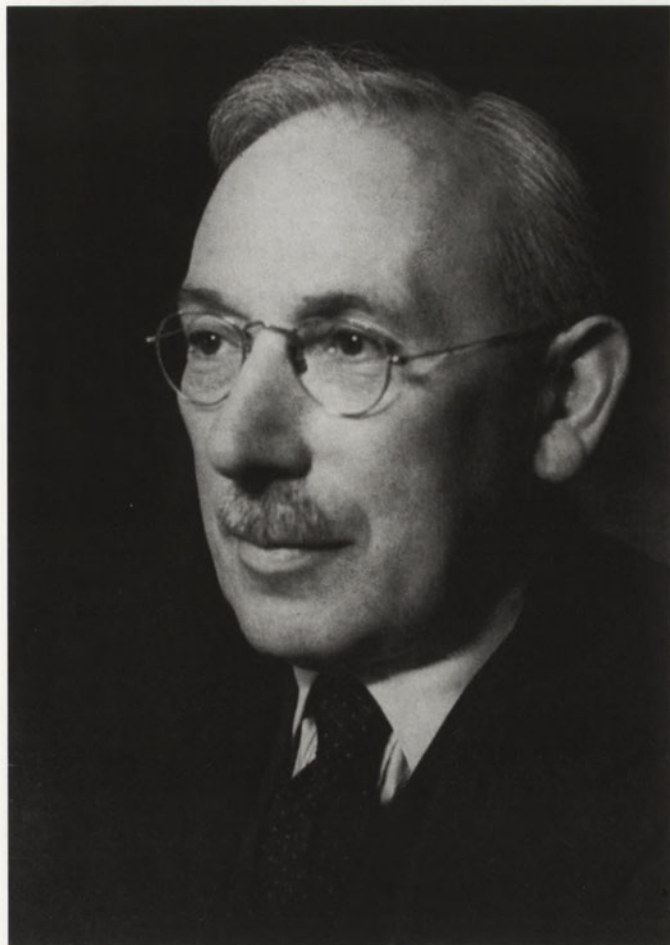
## ODKRYTY DWUKROTNIE

Zdziwiająca są dzieje badań nad cytochromami, a nad cytochromem *c* w szczególności. A zaczęło się od tego, że cytochromy zostały odkryte dwukrotnie.

Pierwszym odkrywcą tych barwników oddechowych był Charles MacMunn (1852–1911), brytyjski lekarz i przyrodnik (Ryc. 1). Badając przy pomocy spektroskopu własnej konstrukcji różne tkanki, stwierdzał występowanie w nich charakterystycznych prążków absorpcyjnych, odmiennych niż te, jakie dawały znane już wówczas hemoglobina i mioglobina. Prążki te przypisywał MacMunn substancji lub substancjom podobnym do hemoglobiny, którym nadawał, w zależności od materiału gdzie się znajdowały, nazwy miohematyna, histohematyna, aktynohematyna, itp. Co więcej, zauważył, że prążki te znikają pod wpływem nadtlenu wodoru, a po jakimś czasie pojawiały się na nowo. Już wówczas (1886) zdał



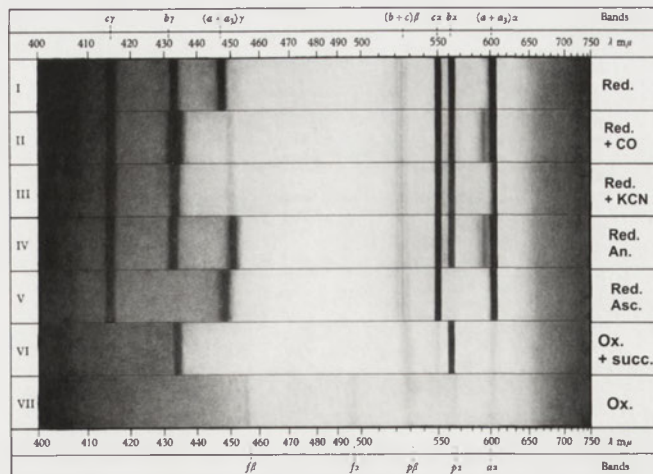
Rycina 1. Charles Alexander MacMunn (1852–1911). Według [1].



Rycina 2. David Keilin (1887–1963). Według [4].

sobie sprawę, że jest na tropie odkrycia substancji, biorącej udział w oddychaniu tkankowym, czemu dał wyraz w znamienym stwierdzeniu: "... they appear to be capable of oxidation and reduction and are therefore respiratory" („... okazały się podlegać utlenianiu i redukcji, w związku z czym [pełnią] funkcję oddechowe”, tłum. L.W.) [2]. MacMunn wyprzedził swą epokę. Inni badacze nie docenili wagi tego odkrycia i obserwowane przez MacMunna prążki absorpcyjne przypisali produktom rozpadu hemoglobiny lub mioglobiny. A ponieważ wśród tych krytyków był autorytet tej miary co słynny chemik niemiecki, Felix Hoppe-Seyler (1825–1895), odkrycie MacMunna poszło w zapomnienie, a sam odkrywca zmarł nie doczekawszy się uznania.

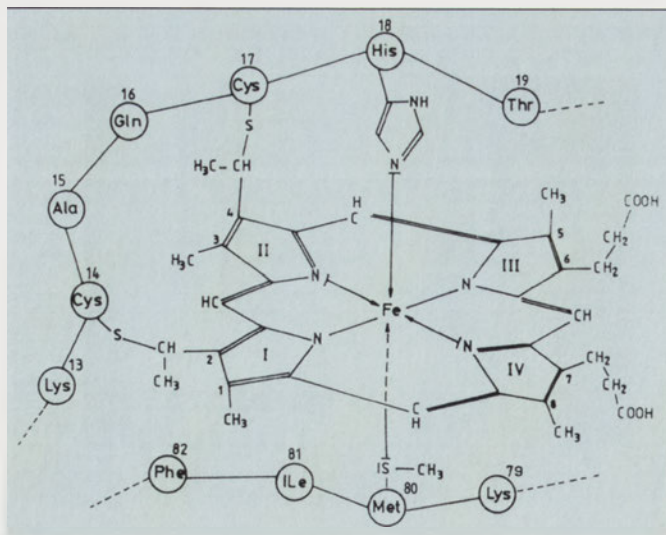
Cytochromy zostały ponownie odkryte przez Davida Keilina (Ryc. 2) w 1925 roku [3] (sylwetce tego badacza poświęcona jest ostatnia część niniejszego artykułu). Keilin badał tkanki również przy pomocy spektroskopu sprzężonego z mikroskopem. Jako entomolog z wykształcenia, oglądał między innymi tkanki owadów, a wśród nich mięśnie mola woskowego (*Galleria mellonella*) i muchy plujki (*Calliphora erythrocephala*) ściśnięte pomiędzy dwoma szkiełkami mikroskopowymi. I wówczas spostrzegł te same prążki absorpcyjne, jakie 40 lat wcześniej obserwował MacMunn. Identyczne prążki zaobserwował w przypadku zawiesiny drożdży. Trzeba jednak dodać, że Keilin nie znał prac MacMunna. Było to więc rzeczywiście odkrycie tych samych związków na nowo. Keilin również zauważył znikanie prążków po ekspozycji drożdży lub tkanek owa-



Rycina 3. Widma absorpcyjne cytochromów w preparacie z mięśnia sercowego według oryginalnych obserwacji Davida Keilina [1]. Objasnienie skrótów: Red. – zredukowane; Red. + CO – zredukowane w obecności tlenku węgla; Red. + KCN – zredukowane w obecności KCN, lub H<sub>2</sub>S, lub NaN<sub>3</sub>; Red. An. – zredukowane w warunkach beztlenowych + KCN; Red. Asc. – zredukowane kwasem askorbinowym lub hydrochinonem; Ox. + succ. – utlenione w obecności uretanu i bursztynianu; Ox. – utlenione.

dów na działanie powietrza i ponowne ich pojawianie się po zamknięciu pomiędzy szkiełkami lub pod działaniem substancji redukujących. Ponieważ ani drożdże, ani owady, poza nielicznymi przypadkami [5], nie zawierają hemoglobiny, nie ulegało już teraz wątpliwości, że odkryta substancja nie jest produktem rozpadu barwnika krwi. Z powodu uniwersalnego występowania w różnych komórkach Keilin nadał odkrytej przez siebie substancji nazwę cytochromu czyli barwnika komórkowego. Mimo liczby pojedynczej jaką zastosował, Keilin zdawał sobie sprawę, że chodzi tu prawdopodobnie o kilka pokrewnych substancji, ponieważ stosunek intensywności poszczególnych prążków różnił się w zależności od pochodzenia preparatu, a także poszczególne prążki absorpcyjne odmiennie zachowywały się pod wpływem różnych warunków oksydacji i redukcji (Ryc. 3). Keilin tak opisuje swoje odkrycie [1]: "I must admit that this first visual perception of an intracellular respiratory process was one of the most impressive spectacles I have witnessed in the course of my work. Now I have no doubt that cytochrome is not only widely distributed in nature and completely independent of haemoglobin, but that it is an intracellular respiratory pigment which is much more important than haemoglobin" („Muszę przyznać, że to pierwsze naoczne stwierdzenie wewnątrzkomórkowego procesu oddechowego zrobiło na mnie chyba największe wrażenie, jakiego doświadczyłem w czasie mojej pracy. Obecnie nie mam wątpliwości, że cytochrom jest nie tylko szeroko rozpowszechniony w przyrodzie i całkowicie niezależny od hemoglobiny, lecz jest także wewnątrzkomórkowym barwnikiem oddechowym, znacznie ważniejszym niż hemoglobina", tłum. L.W.).

Dalsze badania innych autorów potwierdziły przypuszczenia Keilina o istnieniu wielu cytochromów. W zależności od struktury widma absorpcyjnego podzielono je na trzy główne grupy oznaczone literami *a*, *b* i *c*. W ramach każdej z tych grup poszczególnym jej przedstawicielom nadawano następnie kolejne numery: 1, 2, 3 itd. Ponadto w latach pięćdziesiątych ubiegłego stulecia wyodrębniono dużą grupę cytochromów o odmiennym typie budowy i funkcji, któ-



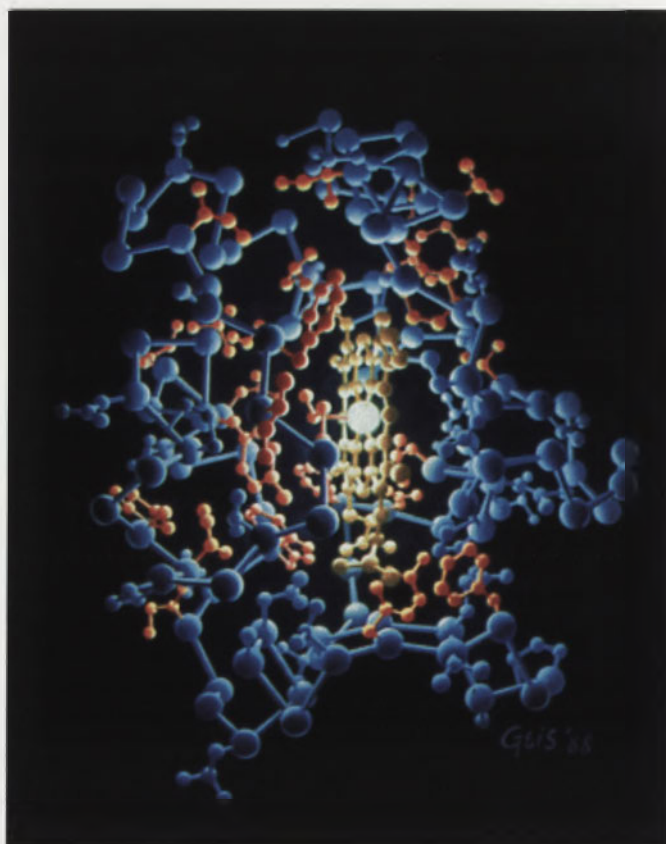
Rycina 4. Struktura kieszeni hemowej cytochromu *c*.

rym zgodnie z absorpcją światła przez kompleks z tlenkiem węgla nadano nazwę cytochromów P450. W dalszym ciągu niniejszego artykułu zajmę się dziejami badań nad najprostszym cytochromem oznaczonym literą *c*, związkiem, który, jak się okazało, jest nie tylko niezbędny dla życia komórki, ale w określonych okolicznościach stanowi sygnał do jej programowanej śmierci. Badania struktury pierwszorzędowej cytochromu *c* pomogły nam również odpowiedzieć na niektóre pytania z zakresu ewolucji świata żywego.

### CYTOCHROM *c* – MOLEKUŁA ŻYCIA

Cytochrom *c* różni się od innych cytochromów kilkoma podstawowymi cechami. Po pierwsze, reszta białkowa, czyli apocytochrom *c*, jest niewielkim peptydem, składającym się najczęściej ze stu czterech reszt aminokwasowych, o masie cząsteczkowej nieco ponad 12000. Reszta hemowa połączona jest z białkiem trwałymi wiązaniami kowalencyjnymi, mianowicie reszty winylowe hemu związane są z resztami cystein białka. Ponadto atom żelaza wiąże się koordynacyjnie z jedną z reszt histydyny i z siarką reszty metioninowej (Ryc. 4). Dzięki temu atom żelaza jest niejako osłaniany i, w przeciwieństwie do hemoglobiny, a także cytochromu *a*, nie ma możliwości reagowania ani z jonami  $\text{CN}^-$ , ani z tlenkiem węgla, ani z tlenem cząsteczkowym. Dzięki swej niewielkiej cząsteczce cytochrom *c* nie ulega denaturacji cieplnej, jak również nie wytrąca się pod wpływem większości substancji odbiałających, co ma znakomite znaczenie w procedurach izolowania i oczyszczania tego barwnika z materiału biologicznego. W pH 7 cząsteczka cytochromu *c* jest polikationem dzięki obecności licznych reszt lizynowych. Przestrzenny model cząsteczki cytochromu *c*, z centralnie usytuowaną resztą hemu, pokazuje rycina 5.

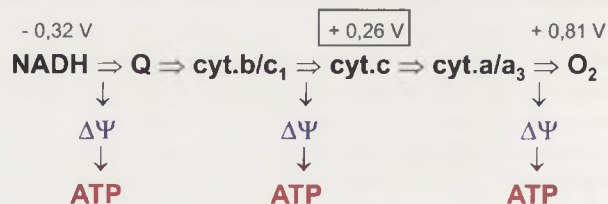
Rola cytochromu *c* jako przENOŚNIKA elektronów w łańcuchu oddechowym mitochondriów została wyjaśniona na przełomie lat 20. i 30. ubiegłego stulecia. Warto w tym miejscu przypomnieć, że był to okres ostrych starć między zwolennikami koncepcji aktywacji wodoru na poziomie substratów oddechowych, Heinrichem Wielandem i Torstem Thunbergiem, a twórcą teorii aktywacji tlenu, Ottonem Warburgiem. Keilin wykazał, że „jego” cytochromy mogły



Rycina 5. Trójwymiarowy model cytochromu *c*. Hydrofobowe łańcuchy boczne aminokwasów zaznaczone są na czerwono (według [6]). Rysował Irving Geis © 2000 Howard Hughes Medical Institute. Reprodukacja za zgodą Sandy Geis.

być zarówno redukowane, jak i utleniane przez żywą komórkę [1,7], a więc zajmowały niejako miejsce pośrednie. Możemy przyjąć, że w ten sposób zostało niejako zapoczątkowane pojęcie łańcucha oddechowego [7]. Obecnie wiemy, że pod względem wartości potencjału oksydoredukcyjnego (około + 0,26 V) cytochrom *c* znajduje się mniej więcej w połowie łańcucha. Co więcej, jest w nim niezbędnym ogniwem, warunkującym prawidłowy przepływ elektronów od substratów oddechowych do tlenu cząsteczkowego i sprzężoną z nim syntezę ATP, głównego źródła energii dla wszelkich procesów biologicznych (Ryc. 6).

Dzięki temu, że znamy dokładnie zarówno sekwencję aminokwasów, jak i konformację tego niewielkiego białka, wiemy, jak wiąże się ono z innymi ogniwami łańcucha oddechowego, a więc z jednej strony z kompleksem reduk-



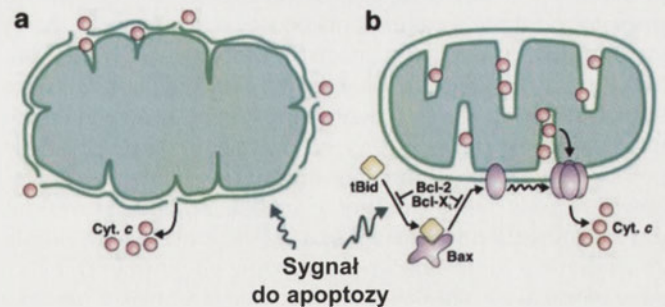
Rycina 6. Usytuowanie cytochromu *c* w łańcuchu oddechowym. Przedstawiono najważniejsze elementy łańcucha oddechowego i miejsca, gdzie dzięki segregacji protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej tworzy się na niej potencjał elektryczny ( $\Delta\Psi$ ), wykorzystywany następnie do syntezy ATP. Na górze pokazano potencjały oksydoredukcyjne początku łańcucha (NADH), jego końca ( $\text{O}_2$ ) oraz cytochromu *c* – w przybliżeniu w połowie tych dwóch wartości.

tazy cytochromu *c*, w skład której wchodzi cytochromy *b* i *c*<sub>1</sub>, jak i oksydazy cytochromowej, czyli cytochromów *a* i *a*<sub>3</sub> [8,9]. Tak więc reakcyjnymi partnerami cytochromu *c* w łańcuchu oddechowym są integralne białka wewnętrznej błony mitochondrialnej, mocno osadzone w lipidowej strukturze błony, podczas gdy sam cytochrom *c* jest białkiem hydrofilnym, które z błoną mitochondrialną wiąże się tylko luźno, głównie na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych. Trwałość takich wiązań zależy od siły jonowej środowiska. Istotnie, przy sile jonowej, jaka panuje w cytosolu, pewna część cytochromu *c* ulega oddysocjowaniu od błony wewnętrznej i znajduje się w formie rozpuszczonej w przestrzeni międzybłonowej. Tak się również dzieje w izolowanych mitochondriach zawieszonych w roztworze KCl o stężeniu 100 mM lub wyższym. Ta międzybłonowa frakcja cytochromu *c* może z jednej strony być redukowana przez obecny w błonie zewnętrznej cytochrom *b<sub>5</sub>*, z drugiej zaś utleniana przez oksydazę cytochromową obecną w błonie wewnętrznej. Dzięki temu, że cytochrom *b<sub>5</sub>* może być redukowany przez NADH, system taki umożliwiłby utlenianie cytosolowego NADH przez mitochondria. Istotnie, proces taki na bardzo niewielką skalę zachodzi w izolowanych mitochondriach [10,11]. Czy proces ten ma znaczenie w komórce, a jeśli tak, to w jaki sposób jest regulowany, pozostaje do dziś niejasne.

## CYTOCHROM *c* – MOLEKUŁA ŚMIERCI

Obecność cytochromu *c* w przestrzeni międzybłonowej budzi obecnie żywe zainteresowanie w związku z jego rolą, jakiej jesteśmy świadomi dopiero od dziesięciu lat, mianowicie z jego funkcją jako cząsteczki sygnałowej programowanej śmierci komórki. A zatem to samo białko, które pełni tak kluczową rolę w pozyskiwaniu przez komórkę energii do jej funkcji życiowych, może sygnalizować, lub wręcz zapoczątkować „samobójcze”, z góry zaplanowane, unicestwienie komórki, czyli apoptozę. Pokazano mianowicie [12-14], że w pierwszym etapie apoptozy następuje masowy wyciek cytochromu *c* z mitochondriów do cytosolu. Wyjaśniono następnie, że cytochrom *c*, wraz z czynnikiem cytosolowym oznaczanym jako Apaf (ang. *apoptosis-activating factor*), aktywuje jedną z kaspaz, wewnątrzkomórkowych proteaz. Ta z kolei aktywuje inne tego rodzaju enzymy, co w efekcie prowadzi do samostrawienia komórki lub ułatwia jej eliminację przez komórki fagocytarne [15,16]. Tak więc decyzja, czy cytochrom *c* pozostanie związany z mitochondriami i będzie tam funkcjonował jako przenośnik elektronów w łańcuchu oddechowym, czy też zostanie uwolniony do cytosolu, stanowi o życiu lub śmierci komórki.

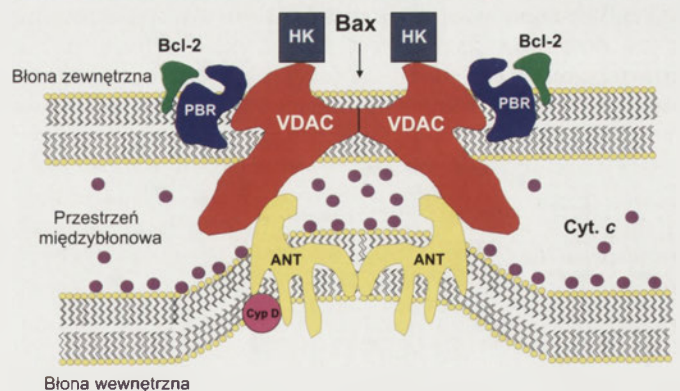
Nie miejsce tu na omawianie mechanizmu apoptozy i jej różnych odmian. Chciałbym natomiast zatrzymać się nad samym procesem uwalniania cytochromu *c* z mitochondriów do cytosolu. Przypomnę, że – jak to między innymi zostało wykazane w naszej pracowni jeszcze na przełomie lat 60. i 70. ubiegłego stulecia [17,18] – zewnętrzna błona mitochondrialna jest nieprzepuszczalna dla cząsteczek tej wielkości co cytochrom *c*. A więc zakładano początkowo, że sygnał proapoptotyczny winien w pierwszym etapie powodować rozerwanie tej błony, co umożliwiłoby wyciek cytochromu *c* z przestrzeni międzybłonowej lub jego oddysocjowanie od błony wewnętrznej i przejście do cytosolu



**Rycina 7.** Dwie koncepcje uwalniania cytochromu *c* z mitochondriów, zapoczątkowujące proces apoptozy. a – Pęcznienie mitochondriów i pęknięcie zewnętrznej błony mitochondrialnej. b – Współczesny pogląd na wybiórcze uprzęszczalanie zewnętrznej błony wobec cytochromu *c* przez proapoptotyczne białka Bid i Bax. Proces ten jest hamowany przez antyapoptotyczne białka Bcl-2 i Bcl-XL. Według [23], reprodukcja za zgodą wydawcy: Macmillan Publishers Ltd.

[19]. Miało by temu sprzyjać pęcznienie mitochondriów. I rzeczywiście, wielokrotnie pokazywano, że izolowane mitochondria, pęczniąc, tracą znaczne ilości cytochromu *c*. Jednakże, tak zwane pęcznienie na wielką skalę, obserwowane na izolowanych mitochondriach, na przykład pod wpływem czynników otwierających niespecyficzny kanał dla jonów i drobnych cząsteczek, w zasadzie nie dotyczy mitochondriów *in situ*, w nienaruszonej komórce. Wówczas to japońscy badacze, Tsujimoto i Shimizu [20], a za nimi i inni autorzy, w Europie głównie grupa Martinou z Genewy [21,22], pokazali, że białka proapoptotyczne Bax i Bid tworzą w zewnętrznej błonie mitochondrialnej kanały umożliwiające wyciek związków wielkocząsteczkowych, a więc cytochromu *c* i białka AIF. Podobne działanie wykazano również dla sztucznych, modelowych, błon fosfolipidowych [22]. Wcześniejszą koncepcję pęknięcia zewnętrznej błony mitochondrialnej i późniejszą, selektywnego uprzęszczalania wobec cytochromu *c*, ilustruje rycina 7.

Dużą rolę w uwalnianiu mitochondrialnego cytochromu *c* przypisuje się obecnie również tak zwanym miejscom kontaktowym między zewnętrzną a wewnętrzną błoną mitochondrialną. Wiadomo na przykład, że białka Bax i Bid

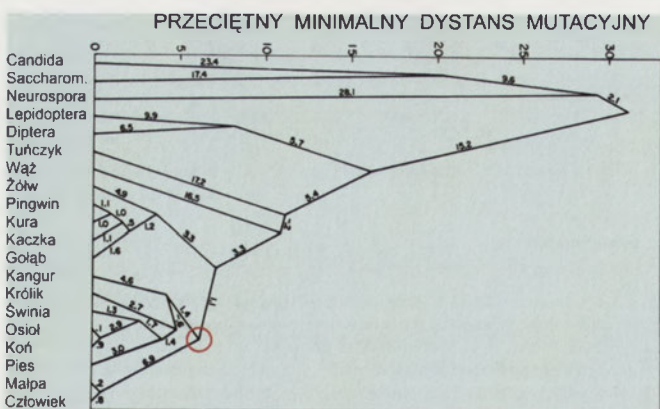


**Rycina 8.** Schemat budowy „miejsca kontaktowego” mitochondriów i koncepcji roli tych miejsc w zapoczątkowaniu uwalniania cytochromu *c* [25]. Objasnienie symboli: VDAC – mitochondrialna poryna czyli zależny od napięcia kanał anionowy (Voltage Dependent Anion Channel), HK – heksokinaza, PBR – peryferyjny receptor benzodiazepinowy, ANT – transporter nukleotydów adeninowych, CypD – cyklofilina. Proapoptotyczne białko Bax powoduje „otwarcie” miejsca kontaktowego (strzałka) i uwolnienie cytochromu *c* w pierwszym rzędzie z tego miejsca. Przeciwdziałają temu antyapoptotyczne białko Bcl-2. (Rysunek wykonany przez M.R. Więckowskiego).

preferencyjnie wiążą się z miejscami kontaktowymi, a to prawdopodobnie na skutek obecności w nich kardiolipiny, fosfolipidu charakterystycznego dla błony wewnętrznej [24]. Przyjrzyjmy się więc tym osobliwym miejscom w strukturze mitochondrionu. Za tworzenie miejsc kontaktowych odpowiedzialna jest nie tylko, jak się wydaje, fuzja dwuwarstw lipidowych obu błon mitochondrialnych, zewnętrznej i wewnętrznej, ale także konkretne białka, przede wszystkim poryna mitochondrialna (białko VDAC) obecna w błonie zewnętrznej i translokaza nukleotydów adeninowych obecna w błonie wewnętrznej. Ponadto, w skład miejsca kontaktowego wchodzi heksokinaza, a w mitochondriach mięśni i mózgu – kinaza kreatynowa [25]. Według naszych danych [26] miejsca kontaktowe zawierają dość znaczne ilości związanego cytochromu *c* (Ryc. 8). To właśnie cytochrom *c* związany w miejscach kontaktowych może być jako pierwszy uwalniany pod wpływem białek proapoptotycznych. Możliwy wydaje się zatem następujący scenariusz. Proapoptotyczne białka, między innymi Bax i Bid, uwalniają cytochrom *c* w pierwszym rzędzie z miejsc kontaktowych. Uwolniony do cytosolu cytochrom *c* aktywuje kaspazy, co z kolei powoduje nadtrawienie błony zewnętrznej mitochondriów i ułatwia uwolnienie, już teraz masowe, pozostałego cytochromu *c*, co jeszcze bardziej aktywuje szlak kaspazowy i prowadzi do apoptotycznej śmierci komórki. Niedawno wykazano, że proapoptotyczne działanie cytochromu *c* może być hamowane przez białka szoku cieplnego, które zarówno przeciwdziałają aktywowaniu przez cytochrom *c* kaspaz, jak również mogą go po prostu wiązać [27].

## CYTOCHROM *c* JAKO WYZNACZNIK EWOLUCJI

Cytochrom *c* występuje niemal w całym świecie żywym, od prokariotów, poprzez grzyby, rośliny, aż do zwierząt. Dzięki niewielkiej, jak na białko, cząsteczce jego struktura pierwszorzędowa została dokładnie poznana u różnych gatunków, przy czym stwierdzono zadziwiającą konserwatywność pewnych rejonów, w szczególności tych, które sąsiadują z resztą hemową, i zmienność innych rejonów cząsteczki. Jest jednak znamienne, że mimo dość znacznych różnic w strukturze pierwszorzędowej tych bardziej odległych rejonów, specyficzność gatunkowa cytochromów *c* jest dość słabo zaznaczona. Na przykład cytochrom *c* z drożdży może być utleniany przez oksydazę cytochromową ssaków i odwrotnie. Natomiast zmienność gatunkowa



Rycina 9. Drzewo genealogiczne *Eukarionta* na podstawie zmienności cytochromu *c*. Według [28]. Miejsce ewolucyjnego oddzielenia się naczelnych od pozostałych ssaków oznaczono czerwonym kółkiem.

cytochromów *c* posłużyła do badań ewolucji świata żywego. W badaniach tych pierwszorzędną rolę odegrał zespół Emanuela Margoliasha na Uniwersytecie stanu Illinois w Chicago począwszy od lat 60. ubiegłego wieku [28,29]. Im więcej różnic w obsadzeniu poszczególnych pozycji w łańcuchu peptydowym cytochromu *c*, tym więcej przypadkowych mutacji musiało zaistnieć od czasu, gdy poszczególne gałęzie filogenezy rozdzieliły się. W ten sposób Margoliash i współpracownicy zbudowali drzewo genealogiczne świata żywego (Ryc. 9). Drzewo to na ogół potwierdza obraz, jaki znamy na podstawie badań anatomicznych, morfologicznych, a także paleontologicznych. Widać z niego, na przykład, jak wcześniej wyodrębniły się królestwa roślin, grzybów i zwierząt. Ale są pewne zastanawiające różnice. Na przykład z przedstawionego schematu wynikałoby, że ssaki dość wcześnie i mniej więcej w tym samym czasie rozdzieliły się na torbacze, naczelną i pozostałe rzędy. A więc, mówiąc obrazowo i w uproszczeniu, mamy – to znaczy człowiek – tyle samo pokrewieństwa, przynajmniej jeśli chodzi o strukturę pierwszorzędową cytochromu *c*, z kangurem, co na przykład z psem lub owcą. Tu wypada jednak dodać, że przedstawione tu drzewo genealogiczne opiera się na założeniu, że wszystkie przypadkowe mutacje, polegające na zamianie pozycji poszczególnych aminokwasów w cząsteczce cytochromu *c*, były jednakowo prawdopodobne i nie podlegały selekcji na skutek doboru naturalnego, co wcale nie musi być prawdą.

## DAVID KEILIN

Przyjrzyjmy się na koniec sylwetce Davida Keilina. Urodzony w Moskwie 21 marca 1887 r. w rosyjsko-żydowskiej rodzinie, dzieciństwo i lata nauki szkolnej spędził w Warszawie. W latach 1897–1904 uczęszczał do założonego przez Wojciecha Górskiego gimnazjum, znanego z wysokiego poziomu nauczania. Po ukończeniu tej szkoły postanowił poświęcić się medycynie i w tym celu w 1904 r. wyjechał do Liège. Ze studiów medycznych musiał jednak szybko zrezygnować z powodu słabego zdrowia – od wczesnej młodości cierpiał na uporczywą astmę. Zainteresował się więc naukami biologicznymi, a konkretnie entomologią. Studia w tym kierunku kontynuował na paryskiej Sorbonie i tamże podjął swą pierwszą pracę naukową w Laboratoire d'Évolution des Êtres Organisés. W 1915 r. przeniósł się do Wielkiej Brytanii i rozpoczął pracę na Uniwersytecie w Cambridge (Ryc. 10). W 1921 r. przyjął zaproszenie do pracy w niedawno utworzonym Molteno Institute of Parasitology w Cambridge, w którym pozostał do końca swych dni, od 1925 r. jako profesor, a w latach 1931–1952 jako dyrektor Instytutu. W 1928 r. został wybrany członkiem Royal Society (brytyjskiego odpowiednika Akademii Nauk). Wśród licznych godności i tytułów, których dostąpił w latach późniejszych, był również wybór na członka zagranicznego Polskiej Akademii Nauk w 1959 r. Zmarł na atak serca 27 lutego 1963 r. Do końca życia był czynny naukowo. Poza licznymi publikacjami w naukowych periodykach, w których przedstawiał swe odkrycia i obserwacje, Keilin zamierzał napisać obszerny przegląd na temat historii badań nad metaloproteinami i ich funkcją w oddychaniu komórkowym. Dzieło to tworzył latami, począwszy od końca lat czterdziestych ubiegłego stulecia i niemal doprowadził





Rycina 10. David Keilin w swojej pracowni w Quick Laboratory w Cambridge (1916). Obok mikroskop połączony ze spektroskopem. Według [30] za zgodą autora.

do końca przed swą nagłą śmiercią. Pozostawiony rękopis uporządkowała, uzupełniła i wydała w 1966 r. w postaci pokaźnej książki [1] córka, Joan Keilin.

David Keilin znany był z łagodności charakteru oraz przyjaznego i bezpośredniego stosunku do otoczenia. Jego współpracownicy, a nawet studenci, zawsze mieli do niego dostęp, bez potrzeby meldowania się i umawiania przez sekretarkę. Nie lubił tylko, gdy przeszkadzano mu w doświadczeniu. Z powodu wątłego zdrowia nie uprawiał żadnych sportów; nie jeździł nawet na rowerze, powszechnym środkiem lokomocji w Cambridge. Przy dobrej pogodzie z niezbyt odległego domu do pracy chadzał pieszo. W niepogodę podwoziła go samochodem żona, również pochodząca z Polski, rozpoczynając – jako lekarz rodzinny – odwiedzanie szych pacjentów. Państwo Keilinowie mieli jedyną córkę, Joan, po mężu Whitley. Poszła ona w ślady ojca, specjalizując się w biochemii. Przez jakiś czas współpracowała z twórcą „chemiosmotycznej” koncepcji oksydacyjnej fosforylacji, Peterem Mitchellem.

Keilin miał bardzo szerokie zainteresowania naukowe. Choć swe największe odkrycia dokonał w zakresie biochemii, sam uważał się przede wszystkim za parazytologa i entomologa. Od 1934 r. do końca życia pełnił funkcję redaktora czasopisma *Parasitology*. Jego zainteresowania wykrczały

zresztą poza nauki przyrodnicze. Interesował się między innymi historią nauk. Warto także wspomnieć, że zanim zdecydował się ostatecznie poświęcić naukom biologicznym, przez krótki czas próbował studiów na wydziale filozofii i sztuk pięknych Sorbony. Keilin imponował swym kolegom znajomością języków. Większość naukowców brytyjskich władała bowiem wyłącznie swym językiem ojczystym, co było znacznym utrudnieniem w kontaktach międzynarodowych. Trzeba bowiem pamiętać, że w okresie przedwojennym angielski nie był jeszcze tak powszechnym i międzynarodowym środkiem komunikowania się naukowców, jakim jest obecnie. Keilin natomiast swobodnie władał francuskim, niemieckim i rosyjskim i w tych językach prowadził rozległą korespondencję. Za swój język ojczysty uważał jednak polski i, choć biegle mówił po angielsku, jego bliski współpracownik, Max Perutz [31], wspomina, że nigdy nie wyzbył się polskiego akcentu. Wyrazem lingwistycznych zainteresowań Keilina może być krótki, jednostronicowy artykuł w *Nature* [32], w którym odkrywca cytochromów przedstawia, jak na przestrzeni dziejów różne języki zajmowały dominującą rolę w komunikowaniu się ludzi wykształconych, od starożytnej greki, poprzez łacinę, później język francuski i wreszcie angielski. Kończy jednak refleksją, że aby naprawdę zrozumieć kulturę jakiegoś kraju, trzeba poznać jego język.

Otoczenie Keilina, a przede wszystkim jego współpracownicy, uważali, że za swe fundamentalne odkrycie cytochromów i wyjaśnienie ich podstawowej funkcji ze wszech miar zasługuje on na Nagrodę Nobla. Według Maxa Perutza [31], późniejszego laureata Nagrody Nobla za strukturę hemoglobiny w 1962 r., Keilin powinien był ją dostać bądź wspólnie z Ottonem Warburgiem w 1931 r., bądź z Hugonem Theorellem w 1955 r. Obie te nagrody dotyczyły bowiem badań nad enzymami oddechowymi. Sam Keilin jednak z humorem odnosił się do takich spekulacji. Swemu przyjacielowi i współpracownikowi, Tadeuszowi Mannowi, miał powiedzieć: „Kiedy stanę u wrót Nieba, święty Piotr nie zapyta mnie, czy przynoszę Nagrodę Nobla”.

## PIŚMIENNICTWO

1. Keilin D (1966) *The history of cell respiration and cytochrome*. Cambridge University Press
2. MacMunn CA (1886) *Researches on myohaematin and the histohaematin*. *Phil Trans* 177: 267-298
3. Keilin D (1925) *On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants*. *Proc Roy Soc B* 98: 312-339
4. Florin M (1975) *A history of biochemistry. III. History of the identification of the sources of energy in organisms*. W: Florin M, Stotz EH (red) *Comprehensive Biochemistry*, t. 31, Elsevier, Amsterdam
5. Keilin D (1956) *Distribution and diversity of haemoglobin*. *Acta Biochim Polon* 3: 439-457
6. Dickerson RE, Kopka ML, Borders CL jr, Varnum J, Weinzierl JE, Margoliash E (2000) *Cytochrome c – A centrosymmetric projection at 4 Å of horse heart oxidized cytochrome c*. Ilustracja ze strony internetowej <http://www.doe-mbi.ucla.edu/People/Dickerson/Gallery/Cytochrome.html>
7. Keilin D (1929) *Cytochrome and respiratory enzymes*. *Proc Roy Soc B* 104: 206-252
8. Bosshard HR (1984) *Funkcja cytochromu c – wzorzec molekularnego rozpoznawania*. *Postępy Biochem* 30: 225-230
9. Osyczka A, Turyna B (1995) *Konformacje cytochromu c i jego oddziaływanie z oksydazą cytochromową*. *Postępy Biochem* 41: 59-66

10. Matlib MA, O'Brien PJ (1976) Properties of rat liver mitochondria with intermembrane cytochrome *c*. *Arch Biochem Biophys* 173: 27-33
11. Bernardi P, Azzone GF (1981) Cytochrome *c* as an electron shuttle between the outer and inner mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 256: 7187-7192
12. Liu X., Kim, CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome *c*. *Cell* 86: 147-157
13. Yang J, Liu XS, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai JY, Peng TI, Jones DP, Wang XD (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome *c* from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-1132
14. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275: 1132-1136
15. Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776
16. Matsuyama S, Reed JC (2000) Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. *Cell Death Differ* 7: 1155-1165
17. Wojtczak L, Załuska H (1969) On the impermeability of the outer mitochondrial membrane to cytochrome *c*. I. Studies on whole mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 193: 64-72
18. Wojtczak L, Sottocasa GL (1972) On the impermeability of the outer mitochondrial membrane to cytochrome *c*. II. Studies on isolated membrane fragments. *J Membrane Biol* 7: 313-324
19. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB (1997) Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91: 627-637
20. Tsujimoto Y, Shimizu S (2000) VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* 7: 1174-1181
21. Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC, James D (2004) Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene* 23: 2850-2860
22. Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC (2000) Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome *c* release from mitochondria. *Biochem J* 345: 271-278
23. Robertson JD, Zhivotovsky B, Gogvadze V, Orrenius S (2003) Outer mitochondrial membrane permeabilization: an open-and-shut case? *Cell Death Differ* 10: 485-487
24. Liu J, Weiss A, Durrant D, Chi NW, Lee RM (2004) The cardiolipin-binding domain of Bid affects mitochondrial respiration and enhances cytochrome *c* release. *Apoptosis* 9: 533-541
25. Brdiczka DG, Zorov DB, Sheu SS (2006) Mitochondrial contact sites: their role in energy metabolism and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1762: 148-163
26. Więckowski MR, Vyssokikh M, Dymkowska D, Antonsson B, Brdiczka D, Wojtczak L (2001) Oligomeric C-terminal truncated Bax preferentially releases cytochrome *c* but not adenylate kinase from mitochondria, outer membrane vesicles and proteoliposomes. *FEBS Lett* 505: 453-459
27. Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E (1999) HSP27 inhibits cytochrome *c*-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J* 13: 2061-2070
28. Margoliash E, Fitch WM (1968) Evolutionary variability of cytochrome *c* primary structures. *Ann N Y Acad Sci* 151: 359-381
29. Kochman M, Dżugaj A (1973) Wybrane zagadnienia ewolucji i ontogenezy niektórych białek oraz izoenzymów. *Postępy Biochem* 19: 499-531
30. Bendall DS (2004) The unfinished story of cytochrome *f*. *Photosynth Res* 80: 265-276
31. Perutz MF (1997) Keilin and the Molteno. W: Semenza G (red) *Comprehensive Biochemistry*, t. 40, Elsevier, Amsterdam, str. 57-67
32. Keilin D (1960) The problem of language in publications of works in scientific and other fields of learning. *Nature* 186: 912

## Two faces of cytochrome *c*

Lech Wojtczak 

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

e-mail: l.wojtczak@nencki.gov.pl

### ABSTRACT

This is an outline of the history of research on cytochrome *c*. Cytochromes were first discovered by Charles A. MacMunn (1886) and re-discovered by David Keilin (1925) who also identified their function in cell respiration. The role of cytochrome *c* in the mitochondrial electron transport chain has been well established, thus pointing to a vital role of this haemoprotein in cell function. Yet, towards the end of the last century, a novel role of cytochrome *c*, namely as a signal molecule for the programmed cell death (apoptosis), has been described. Differences in aminoacid composition of cytochrome *c* have also been used as markers of biochemical evolution. The article ends with a short biographic note on David Keilin.

# Kanał VDAC jako regulator funkcji mitochondriów

## STRESZCZENIE

Regulacja fizjologii mitochondriów, będąca warunkiem prawidłowego funkcjonowania komórki, wymaga skutecznej wymiany cząsteczek między mitochondriami i cytoplazmą, zachodzącej na poziomie zewnętrznej błony mitochondrialnej. Podstawowym narzędziem wymiany metabolitów między mitochondriami i cytoplazmą jest zależny od potencjału kanał o selektywności anionowej, kanał VDAC, nazywany także poryną mitochondrialną. Kanał ten został odkryty w roku 1976 i przez ostatnie 30 lat był intensywnie badany. Badania te doprowadziły do ustalenia jego kluczowej roli w regulacji metabolicznych i energetycznych funkcji mitochondriów. Niniejszy artykuł przeglądowy podsumowuje aktualny stan wiedzy dotyczący udziału kanału VDAC w dystrybucji ATP, w utrzymaniu homeostazy wapniowej komórki, w ochronie przed stresem oksydacyjnym i uruchomieniu apoptozy.

## WPROWADZENIE

Trzydzieści lat temu podręczniki opisywały mitochondria jako organelle otoczone dwiema błonami – wewnętrzną, odpowiedzialną za przekształcanie energii swobodnej, oraz zewnętrzną, stanowiącą półprzepuszczalną barierę. Organizacja molekularna błony wewnętrznej była już wtedy całkiem dobrze poznana, podczas gdy o błonie zewnętrznej wiedziano niewiele. Przełom nastąpił pod koniec lat siedemdziesiątych, kiedy to w roku 1976 zidentyfikowano białko odpowiedzialne za selektywną przepuszczalność błony zewnętrznej [1]. Białko to tworzy porę dyfuzyjną nazywaną kanałem VDAC czyli zależnym od potencjału kanałem o selektywności anionowej (ang. *voltage dependent anion channel*). Wkrótce kanał ten został wyizolowany z mitochondriów organizmów „wszystkich grup systematycznych” oraz przebadany w układach rekonstruowanych. Stwierdzono, że wykazuje on niezwykłą konserwatywność podstawowych parametrów elektrofizjologicznych, tj. wartości przewodnictwa, selektywności i zależności od potencjału. Wartość przewodnictwa pojedynczego kanału w stanie otwartym, wyznaczana w obecności 1 M KCl, wynosi ok. 4 nS. Wraz ze wzrostem wartości przyłożonego potencjału następuje zamykanie kanałów VDAC, czemu towarzyszy zmniejszenie wartości przewodnictwa i zmiana selektywności z anionowej na kationową. Zatem, poddany rekonstrukcji kanał VDAC może istnieć w różnych stanach funkcjonalnych, mieszczących się między stanem otwartym i całkowicie zamkniętym, różniących się przewodnictwem i selektywnością [2-8]. W mitochondriach obserwuje się zazwyczaj stosunkowo łagodne ograniczenie przewodnictwa kanału VDAC, czemu jednak towarzyszy drastyczna zmiana w jego selektywności na kationową [8]. Badania w układach rekonstruowanych, też na nienaruszonych mitochondriach, doprowadziły także do identyfikacji wielu czynników zdolnych do modulacji działania kanału VDAC. Czynniki te ogólnie można podzielić na zwiększające i zmniejszające podstawową dla kanału VDAC zależność od potencjału [2-5,7-8]. Określono także sekwencję aminokwasów dla białek VDAC izolowanych z różnych organizmów i podjęto próby określenia ich struktury przestrzennej. Do tej pory jednak nie udało się opracować powszechnie akceptowanego modelu struktury przestrzennej białka VDAC. Najnowsze informacje na ten temat czytelnik może znaleźć w pracach przeglądowych M. Colombiniego [8] oraz V. De Pinto i in. [6]. Natomiast podstawowe informacje na temat właściwości fizykochemicznych kanału VDAC zawarte są w pracy przeglądowej H. Kmita i N. Antos [5] oraz w pracach angielskojęzycznych [2-4,6-8].

Już w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku pojawiły się pierwsze doniesienia wskazujące na możliwość oddziaływania kanału VDAC z innymi białkami mitochondrialnymi i cytoplazmatycznymi. Obecnie wiadomo, iż kanał VDAC tworzy kompleksy z różnymi białkami o różnym stopniu komplikacji, w tym z translokazą nukleotydów adeninowych i białkami z rodziny Bcl-2 [4,7,9,11] oraz kompleksy o charakterze homooligomerów [12]. W latach dziewięćdziesią-

Hanna Kmita<sup>✉</sup>

Olgięrd Stobienia

Zakład Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

<sup>✉</sup>Zakład Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań; e-mail: kmita@amu.edu.pl, tel. (061) 829 45 32

Artykuł otrzymano 12 września 2005 r.  
Artykuł zaakceptowano 13 października 2005 r.

**Słowa kluczowe:** mitochondria, kanał VDAC, dystrybucja ATP, homeostaza wapniowa, reaktywne formy tlenu, apoptoza

**Wykaz skrótów:** PTP – kompleks białkowy odpowiedzialny za uprzepuszczelnienie błon mitochondrialnych (ang. *permeability transition pore*); RFT – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*); VDAC – zależny od potencjału kanał o selektywności anionowej (ang. *voltage dependent anion channel*)

tych ubiegłego wieku stwierdzono, iż białko VDAC tworzy funkcjonalny kanał w stanie monomeru, ale może występować w postaci różnych izoform kodowanych przez odrębne geny i tworzących kanały o zróżnicowanej charakterystyce [4,8]. Niewątpliwie, obecność kanału VDAC w kompleksach o różnym składzie i stechiometrii, jak i występowanie jego izoform decyduje o specjalizacji tego kanału w zakresie określonych funkcji.

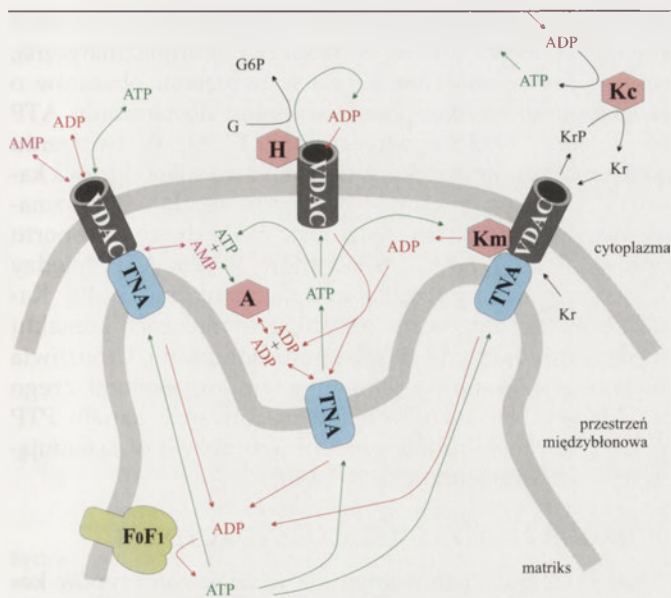
Podobnie jak większość białek mitochondrialnych białka VDAC są kodowane przez genom jądrowy i syntetyzowane na rybosomach cytoplazmatycznych. Dopiero niedawno uzyskano pełniejsze dane dotyczące wbudowania kanału VDAC w błonę zewnętrzną mitochondriów i w istniejące w tej błonie funkcjonalne kompleksy. Podstawową rolę w tych procesach odgrywa kompleks TOM (ang. *translocase of the outer mitochondrial membrane*), który umożliwia wprowadzenie białka VDAC do mitochondriów [13] i następnie kompleks TOB (ang. *topogenesis of  $\beta$ -barrel membrane proteins*), umożliwiający wbudowanie w błonę i w funkcjonalne kompleksy [14-16]. Kompleks TOB nazywany jest również kompleksem SAM (ang. *sorting and assembly machinery*) [17,18], a jego głównym składnikiem jest białko Tob55 (Sam50), które jest zdolne do tworzenia kanału i podobnie jak białko VDAC tworzy w błonie strukturę beczułki  $\beta$ . Białko Tob55 zaliczane jest do rodziny homologów białka Omp85, a białka należące do tej rodziny uznaje się za podstawowy składnik kompleksów uczestniczących w biogenezie błony zewnętrznej bakterii jak i mitochondriów. Prawdopodobnie białka te odegrały także kluczową rolę w przekształceniu endosymbiotycznej bakterii w mitochondria [15]. W tym kontekście pojawia się oczywiście pytanie dotyczące ewolucyjnego pokrewieństwa między kanałem VDAC i porynami bakteryjnymi, uczestniczącymi w transporcie cząsteczek przez błonę zewnętrzną bakterii. W latach 80-tych i 90-tych ubiegłego wieku stosowano powszechnie termin „poryna mitochondrialna”, zakładając pokrewieństwo ewolucyjne między kanałem VDAC i poryną bakteryjną. Obecnie, w świetle dostępnych danych pokrewieństwo to jest negowane. W istocie funkcjonują dwa przeciwstawne poglądy, z których jeden wskazuje na istnienie takiego pokrewieństwa [6], a drugi uznaje istniejące podobieństwa za całkowicie przypadkowe [8] i w związku z tym stosowanie terminu „poryna mitochondrialna” za nie uzasadnione.

Nie ulega natomiast wątpliwości, iż w sensie ewolucyjnym mitochondria są strukturami bakteryjnymi, które tak silnie zintegrowały się z komórką gospodarza, iż zatraciły zdolność samodzielnego funkcjonowania, decydując równocześnie o „być albo nie być” komórki eukariotycznej [19]. Zewnętrzna błona mitochondriów, będąc wytworem komórki gospodarza, stanowi równocześnie skutek licznych, fascynujących i innowacyjnych zmian adaptacyjnych które pojawiły się w toku ewolucji komórek eukariotycznych i doprowadziły do powstania selektywnej bariery będącej równocześnie miejscem kontroli. Jednym ze sposobów kontroli mitochondriów przez komórkę jest kontrola ruchu metabolitów i jonów przez zewnętrzną błonę mitochondrialną, co jest możliwe dzięki obecności w tej błonie kanału VDAC. Tym sposobem kanał VDAC zyskuje centralną rolę w regulacji funkcji mitochondriów w komórce.

## DYSTRYBUCJA ATP

Synteza ATP to podstawowa funkcja mitochondriów wymieniana w podręcznikach. Oczywiście wymaga ona dostarczenia mitochondrialnych substratów oddechowych, których transport przez zewnętrzną błonę mitochondrialną jest kontrolowany przez kanał VDAC. Ostatnio wskazuje się również na to, iż obok syntezy ATP mitochondria mogą także regulować dostęp tego metabolitu do różnych miejsc komórki [20]. Decydującą rolę w uwalnianiu ATP z mitochondriów odgrywa przepuszczalność błony zewnętrznej, która jest pochodną stanu funkcjonalnego kanału VDAC. W stanie o wysokiej przewodności, który odpowiada stanowi otwartemu, kanał VDAC wykazuje selektywność anionową, co umożliwia transport ATP jak i innych metabolitów obdarzonych ładunkiem ujemnym. Zmiana stanu funkcjonalnego kanału VDAC w kierunku stanu zamkniętego pociąga za sobą zmniejszenie średnicy kanału jak i zmianę jego selektywności na bardziej kationową, co praktycznie eliminuje możliwość transportu ATP i innych anionów [7,8,21]. Zatem, każdy z czynników regulujących stan funkcjonalny kanału VDAC będzie miał podstawowe znaczenie dla możliwości dostarczenia ATP poza mitochondria. Co ciekawe, sam ATP może wiązać się z kanałem VDAC modulując jego działanie [7,8]. Wiązanie ATP przez kanał VDAC prowadzi prawdopodobnie do jego zagęszczania we wnętrzu kanału, co przyspiesza transport ATP w obecności jego niskich stężeń i zwalnia ten transport w obecności wysokich stężeń ATP. Regulacja kanału VDAC w wyniku wiązania ATP ma zapewne kluczowe znaczenie dla realizacji energetycznych potrzeb komórki, umożliwia bowiem dostosowanie szybkości transportu ATP do istniejących warunków.

ATP transportowany przez kanał VDAC może być preferencyjnie kierowany do określonych celów. Jest to możliwe dzięki temu, iż kanał VDAC tworzy miejsca kontaktowe pomiędzy sąsiadującymi mitochondriami, jak i mitochondriami i innymi organellami (patrz „Utrzymanie homeostazy wapniowej komórki”). Ponadto bardzo ważną rolę w dystrybucji ATP transportowanego przez kanał VDAC odgrywa oddziaływanie tego kanału z białkiem prowadzącym transport ATP przez błonę wewnętrzną, czyli translokazą nukleotydów adeninowych [22,23]. Białka te tworzą łącznie system transportu nukleotydów adeninowych, a istotną rolę w działaniu tego systemu odgrywa oddziaływanie kanału VDAC z kinazami (Ryc. 1). Są to heksokinaza, kinaza glicerolowa i kinaza kreatynowa, które dzięki temu oddziaływaniu zyskują ułatwiony dostęp do ATP, co ma istotne konsekwencje fizjologiczne [3,11,23]. Eksportowany ATP jest bezpośrednio przekształcany przez kinazy do ADP, który szybko powraca do matryks mitochondrialnej i może podlegać fosforylacji oksydacyjnej [11]. Równocześnie, oddziaływanie kanału VDAC z heksokinazą lub kinazą kreatynową przeciwdziała aktywacji kompleksu PTP [23,24], co ma decydujące znaczenie dla uruchomienia apoptozy (patrz „Kluczowa rola w procesie apoptozy”). Z drugiej strony ułatwienie dostępu ATP do heksokinazy i wynikające stąd ułatwienia w zapoczątkowaniu glikolizy, odgrywają podstawową rolę w metabolizmie energetycznym komórek nowotworowych [25].



**Rycina 1.** Kanał VDAC stanowi integralną część mitochondrialnego systemu transportu nukleotydów adeninowych, decydującego o dostępności ATP do różnych przedziałów komórkowych. Istotną rolę w działaniu tego systemu odgrywa oddziaływanie kanału VDAC z translokazą nukleotydów adeninowych i kinazami, np. heksokinazą, i kinazą kreatynową, które dzięki temu oddziaływaniu zyskują ułatwiony dostęp do ATP. Eksportowany ATP jest bezpośrednio przekształcany przez kinazy do ADP, który szybko powraca do matrixu mitochondrialnego i może podlegać fosforylacji oksydacyjnej. Objasnienia skrótów: TNA – translokaza nukleotydów adeninowych; FoF<sub>1</sub> – syntaza ATP; A – kinaza adenylanowa; H – heksokinaza; G – glukoza; G6P – glukoza-6-fosforan; Kr – kreatyna; KrP – fosforan kreatyny; Km i Kc – odpowiednio mitochondrialna i cytoplazmatyczna forma kinazy kreatynowej.

Co ciekawe, ATP powstający w wyniku glikolizy może być również zużywany przez mitochondria, co stwierdzono, na przykład, dla eozynofili, w których mitochondria odgrywają niewielką rolę w syntezie ATP. Wymaga to oczywiście transportu tego metabolitu do mitochondriów, który zachodzić musi dzięki kanałowi VDAC. Zjawisko to stanowi skrajny przypadek zużywania ATP przez mitochondria, które zachodzi w warunkach niedotlenienia [19]. Pojawia się oczywiście pytanie dotyczące przyczyny zużywania ATP przez mitochondria, uznawane przecież za podstawowe generatory ATP w komórkach. Okazuje się, iż ATP kierowany do mitochondriów lub w nich pozostający w warunkach niedotlenienia, umożliwia działanie syntazy ATP jako pompy protonowej, co z kolei umożliwia utrzymanie potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej. Obecność tego potencjału chroni komórkę przed uwolnieniem z mitochondriów białek proapoptycznych [19]. Zatem, kanał VDAC jest jednym z białek o podstawowym znaczeniu w przebiegu apoptozy (patrz „Kluczowa rola w procesie apoptozy”).

#### UTRZYMANIE HOMEOSTAZY WAPNIOWEJ W KOMÓRCIE

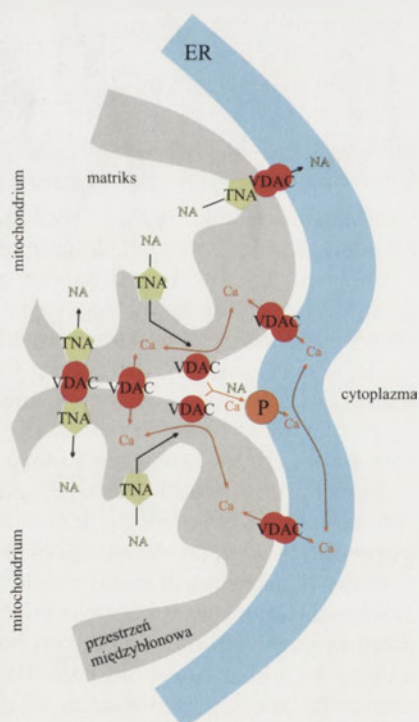
Jony wapnia (Ca<sup>2+</sup>) odgrywają podstawową rolę w regulacji syntezy ATP przez mitochondria [7,26], ponieważ regulują działanie wielu białek mitochondrialnych zaangażowanych pośrednio lub bezpośrednio w ten proces. Są to między innymi enzymy uczestniczące w cyklu Krebsa, utlenianiu kwasów tłuszczowych i katabolizmie aminokwasów oraz syntaza ATP jak i nośniki wewnętrznej błony

mitochondrialnej, w tym translokaza nukleotydów adeninowych [7,19]. Ponadto jony Ca<sup>2+</sup> wprowadzone do matrixu mitochondrialnego stanowią kluczowy aktywator kompleksu PTP (patrz „Kluczowa rola w procesie apoptozy”), czego konsekwencją może być śmierć komórki (np. [7,19]). Z drugiej strony, pobieranie i uwalnianie jonów wapnia przez mitochondria odgrywa istotną rolę w regulacji stężenia jonów wapnia w komórce, co z kolei jest podstawą tworzenia fizjologicznych sygnałów wykorzystujących jony Ca<sup>2+</sup> [27]. Zatem, pobieranie, akumulacja i uwalnianie jonów wapnia przez mitochondria ma podstawowe znaczenie nie tylko dla mitochondriów, ale również dla całej komórki i to zarówno w terminach fizjologii jak i patologii. Wiadomo bowiem, iż prawidłowe funkcjonowanie komórek gwarantowane jest przez utrzymanie cytoplazmatycznego stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> na odpowiednim poziomie, czego najlepszym przykładem są komórki nerwowe i glejowe [19,20]. Z drugiej strony wiele stanów patologicznych wywołanych upośledzeniem funkcji mitochondriów wynika właśnie ze zmian w gospodarce wapniowej mitochondriów, w tym z przeładowania mitochondriów jonami Ca<sup>2+</sup>. Na przykład wzrost stężenia jonów wapnia w mitochondriach odgrywa kluczową rolę w uruchomieniu śmierci komórek nerwowych w wyniku ekscytotoksyczności [28]. Co więcej, istnieją dane wskazujące na udział wysokiego stężenia jonów wapnia w matrixu mitochondrialnym w generacji reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*) [29,30], które stanowią dla komórki poważne zagrożenie (patrz „Ochrona przed stresem oksydacyjnym”). Samo upośledzenie transportu jonów Ca<sup>2+</sup> do mitochondriów także ma poważne konsekwencje funkcjonalne. Prowadzi ono między innymi do rozwoju padaczki mioklonicznej z występowaniem „włókien szmatowatych” w mięśniach (MERRF – ang. *myoclonic epilepsy with ragged-red fibers*) [19].

Mitochondria zawierają kilka różnych systemów służących transportowi jonów Ca<sup>2+</sup>. Są to: (1) uniporter wrażliwy na czerwień rutenową; (2) szybki mechanizm pobierania (RaM – ang. *rapid mode of uptake*), różniący się od uniportera między innymi modulacyjnym wpływem ATP oraz (3) zależne i niezależne od jonów Na<sup>+</sup> drogi wypływu z mitochondriów [19,31-33]. Wszystkie te systemy funkcjonują w obrębie wewnętrznej błony mitochondrialnej. Natomiast transport jonów wapnia przez zewnętrzną błonę mitochondrialną do i z mitochondriów odbywa się dzięki kanałowi VDAC. Co więcej, jony wapnia mogą uczestniczyć w regulacji przepuszczalności kanału VDAC [7,8]. Pojawia się oczywiście pytanie, w jaki sposób kanał z definicji dysponujący selektywnością anionową może prowadzić transport kationów, jakimi są jony wapnia? Wymaga to zmiany stanu funkcjonalnego kanału, w kierunku stanu bardziej zamkniętego, czemu towarzyszy zmniejszenie średnicy kanału i zmiana selektywności na bardziej kationową [8].

Jeszcze niedawno prace poświęcone udziałowi mitochondriów w homeostazie wapniowej komórki i wpływowi jonów Ca<sup>2+</sup> na procesy mitochondrialne pomijały kwestie transportu jonów wapnia przez zewnętrzną błonę mitochondrialną, koncentrując się głównie na działaniu systemów transportowych błony wewnętrznej. Uznawano bowiem, iż zewnętrzna błona mitochondrialna jest przepuszczalna dla małych jonów. Obecnie nie ulega już wątpliwości, że trans-

port jonów wapnia przez kanał VDAC ma istotne znaczenie dla szybkiego przemieszczania się tych jonów między mitochondriami, cytosolem i siateczką śródplazmatyczną [34,35], co z kolei umożliwia regulację procesów zachodzących w mitochondriach jak i prowadzi do powstania lub wyłączenia sygnału wapniowego. Dlatego kanał VDAC odgrywa podstawową rolę nie tylko w regulacji syntezy ATP przez mitochondria, ale również w angażujących jony  $\text{Ca}^{2+}$  procesach przekazywania sygnału w komórce [7]. Badania poświęcone pobieraniu jonów wapnia przez mitochondria doprowadziły do wniosku, iż skuteczność tego procesu wymaga zlokalizowania mitochondriów blisko miejsc uwalniania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez siateczkę śródplazmatyczną lub ich napływu do komórki przez błonę komórkową [19,36]. Umożliwia to bowiem powstanie lokalnego obszaru zwiększonego stężenia jonów wapnia, dostępnego bezpośrednio dla mitochondriów, co z kolei jest warunkiem rozpoczęcia pobierania tych jonów przez mitochondria (Ryc. 2). Z drugiej strony, mitochondria pobierając jony  $\text{Ca}^{2+}$  z bliskiego sąsiedztwa miejsc uwalniania tych jonów przez siateczkę śródplazmatyczną zapobiegają inaktywacji białek odpowiedzialnych za ten proces (kanał bramkowany trifosforanem inozytoli (IP3) i receptor rianodynowy) i w związku z tym ułatwiają dalsze uwalnianie jonów wapnia z siateczki śródplazmatycznej [19]. Istotne znaczenie ma także lokalna dostępność ATP uwalnianego z mitochondriów, niezbędnego dla akumulacji jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez siateczkę śródplazmatyczną.

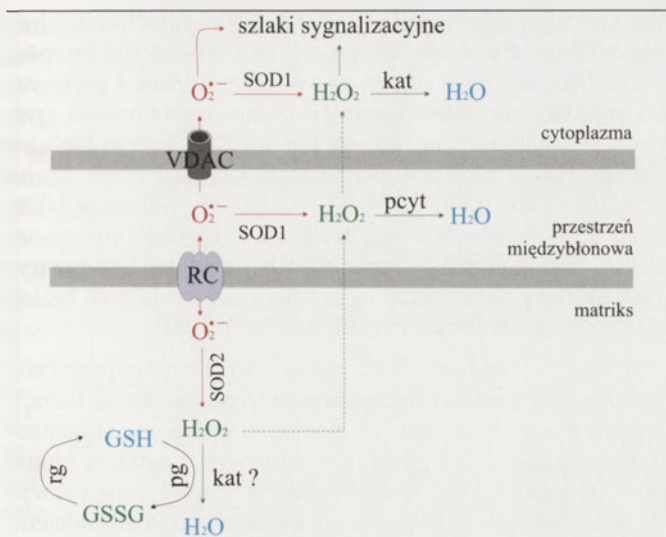


**Rycina 2.** Kanał VDAC uczestniczy w tworzeniu miejsc kontaktowych między mitochondriami i siateczką śródplazmatyczną (ER) oraz między mitochondriami. Miejsca kontaktowe powstające między mitochondriami i siateczką śródplazmatyczną pełnią istotną rolę w tworzeniu obszarów o zwiększonym stężeniu jonów wapnia i w dostarczaniu ATP do siateczki śródplazmatycznej. Należy zauważyć, iż kanał VDAC obecny jest także w błonach siateczki, gdzie zapewniać może skuteczny transport jonów  $\text{Ca}^{2+}$  jak i innych metabolitów, w tym ATP, między mitochondriami i siateczką śródplazmatyczną. Miejsca kontaktowe powstające między mitochondriami także zapewniają transport jonów  $\text{Ca}^{2+}$  jak i innych metabolitów, co umożliwia skuteczną komunikację między nimi. Objaśnienia skrótów: ER – siateczka śródplazmatyczna; NA – nukleotydy adeninowe; P – pompa wapniowa, TNA – translokaza nukleotydów adeninowych.

ną. Co więcej, udowodniono istnienie miejsc kontaktowych między mitochondriami a siateczką śródplazmatyczną, którym przypisano istotną rolę w tworzeniu obszarów o zwiększonym stężeniu jonów wapnia i dostarczaniu ATP do siateczki śródplazmatycznej [19,37,38]. W tworzeniu takich miejsc kontaktowych podstawową rolę odgrywa kanał VDAC, obecny także w błonach siateczki śródplazmatycznej, który dodatkowo stanowić może drogę transportu jonów  $\text{Ca}^{2+}$  jak i innych metabolitów, w tym ATP, między mitochondriami i siateczką śródplazmatyczną [39,40]. Kanał VDAC zlokalizowany jest także w miejscach kontaktu między sąsiadującymi ze sobą mitochondriami. Umożliwia to skuteczną komunikację między tymi organellami, czego przykładem jest zsynchronizowane otwarcie kanału PTP (patrz „Kluczowa rola w procesie apoptozy”) w sąsiadujących ze sobą mitochondriach [19,40].

## OCHRONA PRZED STRESEM OKSYDACYJNYM

Jest faktem dobrze znanym, iż w większości typów komórek mitochondria są głównym miejscem powstawania reaktywnych form tlenu: anionorodnika nadmanganowego ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), nadtlenu wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i rodnika hydroksylowego ( $\text{HO}^{\cdot}$ ). Co więcej, podstawowym czynnikiem decydującym o ich powstaniu jest fizjologiczna aktywność łańcucha oddechowego. Jak policzono, około 2% tlenu zużywanego przez mitochondrialny łańcuch oddechowy ulega przekształceniu do anionorodnika nadmanganowego [41,42], a około 1–5% jest przekształcanych w nadtlenek wodoru [43]. Nie ulega zatem wątpliwości, iż transport metabolitów przez kanał VDAC musi mieć istotny wpływ na ich dostęp do łańcucha oddechowego, a więc także jego aktywność fizjologiczną, co z kolei ma wpływ na generację reaktywnych form tlenu. Powstawanie reaktywnych form tlenu jest dla komórki, w tym przede wszystkim dla mitochondriów, potencjalnym zagrożeniem, bowiem prowadzić może do stresu oksydacyjnego, uznawanego obecnie za kluczowy czynnik w etiologii różnych schorzeń jak i starzenia się [19,44]. Głównym miejscem powstawania reaktywnych form tlenu w mitochondriach jest łańcuch oddechowy, skąd cząsteczki te uwalniane są przede wszystkim do matriks mitochondrialnej, natomiast głównym celem ich działania są mitochondrialny DNA (mtDNA) oraz białka błonowe i nienasycone kwasy tłuszczowe, budujące lipidy błonowe. Skutkiem zmian w mtDNA jest upośledzenie syntezy kodowanych przez niego białek wchodzących w skład łańcucha oddechowego, co zakłóca pracę łańcucha i prowadzi do generacji dodatkowej ilości reaktywnych form tlenu. Natomiast zmiany zachodzące w białkach i lipidach błonowych prowadzić mogą do zmian przepuszczalności błon mitochondrialnych, w tym do otwarcia kanału PTP (patrz „Kluczowa rola w procesie apoptozy”), co doprowadzić może do śmierci komórki [42–44]. Dlatego mitochondria dysponują zestawem cząsteczek antyoksydacyjnych (np. glutation, tioredoksyna) oraz enzymów antyoksydacyjnych, zlokalizowanych w matriks mitochondrialnej, których zadaniem jest eliminacja reaktywnych form tlenu (Ryc. 3). Podstawowa lista mitochondrialnych enzymów antyoksydacyjnych zawiera dysmutazę nadmanganową zależną od manganu (MnSOD), peroksydazę glutationową i reduktazę glutationową [42,45,46]. W wyniku działania MnSOD, anionorodnik nadmanganowy ulega przekształceniu w nadtlenek wodoru, który z kolei zosta-



**Rycina 3.** Kanał VDAC uczestniczy w eksporcie anionorodnika ponadtlennkowego z mitochondriów. Usuwanie anionorodnika ponadtlennkowego, generowanego przez łańcuch oddechowy od strony przestrzeni międzybłonowej, zmniejsza jego stężenie w mitochondriach i równocześnie moduluje przebieg wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych. Objasnienia skrótów: RC – łańcuch oddechowy; SOD1 (MnSOD) – izoforma dysmutazy ponadtlennkowej zlokalizowana w cytoplazmie (u drożdzy i ssaków izoforma ta zlokalizowana jest także w mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej); pg – peroksydaza glutationowa; rg, reduktaza glutationowa; GSH – glutation; GSSG – dwusiarczek glutationu; pcyt – peroksydaza cytochromu c; kat – katalaza (obecność tego enzymu w mitochondriach jest na razie kwestią dyskusyjną).

je przekształcony w  $H_2O$  na skutek działania peroksydazy glutationowej. Ta ostatnia jest uznawana za jedyny enzym usuwający nadtlenek wodoru powstający w mitochondriach [42], chociaż istnieją również prace wskazujące na obecność w mitochondriach katalazy [19,47,48]. Ponieważ nadtlenek wodoru dyfunduje szybko przez błony może być także rozkładany przez katalazę zlokalizowaną w cytoplazmie. Natomiast reduktaza glutationowa umożliwi odtworzenie zredukowanego glutationu (GSH), który pełni rolę kofaktora peroksydazy glutationowej oraz antyutleniaacza i zmiatacza reaktywnych form tlenu. Zmiany w aktywności powyższych enzymów jak i w proporcji glutationu zredukowanego do powstającego w wyniku jego utleniania dwusiarczku glutationu (GSH/GSSG) mogą być, zatem stosowane jako wskaźnik poziomu produkcji reaktywnych form tlenu przez mitochondria [45,49].

Istotną rolę w obronie mitochondriów przed działaniem reaktywnych form tlenu pełni także dysmutaza ponadtlennkowa zależna od cynku i miedzi (Cu,ZnSOD), zlokalizowana w przestrzeni międzybłonowej [41,50]. Cu,ZnSOD reprezentuje około 90% całkowitej aktywności dysmutazy w komórce, a głównym miejscem jej występowania jest cytosol oraz peroksyzomy, lizosomy i jądro komórkowe. Skoro anionorodnik ponadtlennkowy jest przede wszystkim uwalniany do matriksu mitochondrialnej, pojawia się oczywiście pytanie, co jest substratem enzymu antyoksydacyjnego o takiej lokalizacji komórkowej? Najnowsze dane wskazują, iż anionorodnik ponadtlennkowy może być uwalniany przez łańcuch oddechowy do przestrzeni międzybłonowej, a w procesie tym uczestniczy rodnik ubisemichinonowy i dehydrogenaza NADH [41]. Co więcej, znaczna frakcja anionorodnika ponadtlennkowego uwalnianego do przestrzeni międzybłonowej może opuszczać mitochondria dzięki ka-

nałowi VDAC [51]. Stan funkcjonalny kanału VDAC odgrywa więc prawdopodobnie kluczową rolę w uwalnianiu anionorodnika ponadtlennkowego do cytoplazmy, gdzie może być on usuwany przez zlokalizowaną poza mitochondriami dysmutazę ponadtlennkową lub włączyć się w szlaki sygnalizacyjne będące podstawą odpowiedzi komórki adekwatnej do istniejących warunków oksydacyjnych. Zatem, kanał VDAC może być rozpatrywany jako ważny element mitochondrialnego zestawu białek zaangażowanych w obronę przed reaktywnymi formami tlenu.

## KLUCZOWA ROLA W PROCESIE APOPTOZY

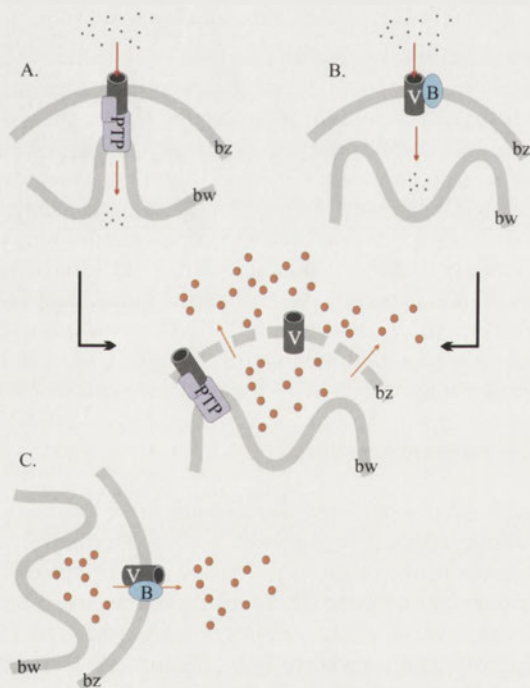
Zgodnie z definicją, apoptoza (programowana śmierć komórki) to ewolucyjnie zachowany proces fizjologiczny o podstawowym znaczeniu dla normalnego rozwoju i funkcjonowania organizmów wielokomórkowych [52] oraz organizmów jednokomórkowych [52]. Około 10 lat badań zjawiska apoptozy doprowadziło do wniosku, iż podstawową rolę w procesach odpowiedzialnych za utrzymanie subtelnej równowagi między stanem życia i śmierci komórki odgrywają mitochondria [6-8,19,43,53]. Pełnią one w zjawisku apoptozy funkcję „centrum decyzyjnego komórki” [6,22], są bowiem miejscem magazynowania białek, które po opuszczeniu mitochondriów uruchamiają procesy prowadzące do apoptozy [19,53,54]. W skrócie, w przebiegu apoptozy z udziałem mitochondriów wyróżnić można trzy etapy: (1) pojawienie się sygnałów proapoptotycznych aktywujących wewnątrzkomórkowe białka efektorowe, przemieszczające się do mitochondriów; (2) zmiana przepuszczalności błon mitochondrialnych, w tym błony zewnętrznej, prowadząca do uwolnienia białek proapoptotycznych, zlokalizowanych głównie w mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej; (3) egzekucja apoptozy. Mimo wielu lat badań etap 2 jest nadal najsłabiej poznany i jednocześnie najsilniej dyskutowany. Istniejące dane wskazują jednak, iż kluczową rolę podczas tego etapu apoptozy odgrywa kanał VDAC. Przede wszystkim funkcjonalny kanał VDAC gwarantuje zajście apoptozy, a jego zablokowanie lub usunięcie przeciwdziała uruchomieniu apoptozy w różnego typu komórkach eukariotycznych [9,10]. Zatem, na czym polega udział kanału VDAC w procesie apoptozy?

Kanał VDAC uznawany jest za miejsce, w którym zbiega się działanie różnych cząsteczek wewnątrzkomórkowych, zdolnych do promowania lub hamowania apoptozy. Są to przede wszystkim cząsteczki regulujące działanie kompleksu PTP (ang. *permeability transition pore*) oraz białka pro- i antyapoptotyczne z rodziny Bcl-2. Kompleks PTP najczęściej jest definiowany jako niespecyficzny kanał o wysokiej przewodności, obecny w obu błonach mitochondrialnych, a powstający w wyniku zmian konformacyjnych kilku białek mitochondrialnych [5,7,11,19,22,44,54-57]. Do białek tych zalicza się przede wszystkim kanał VDAC, translokazę nukleotydów adeninowych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i cyklofilinę D zlokalizowaną w matriksu mitochondrialnej. Funkcjonowanie tego kanału w warunkach fizjologicznych jest nadal tematem dyskusji [19,56], niewątpliwie jednak jego pełne otwarcie prowadzi do śmierci komórki na drodze apoptozy (otwarcie odwracalne) lub nekrozy (otwarcie nieodwracalne). Otwarcie kanału PTP sprzyja między innymi zwiększone stężenie jonów  $Ca^{2+}$  w matriks

mitochondrialnej, które transportowane są do wnętrza mitochondriów dzięki kanałowi VDAC [7]. Co więcej, ostatnio stwierdzono także, iż decydującą rolę w otwarciu kanału PTP odgrywa stan oligomeryzacji kanału VDAC [12]. W stanie otwartym kanał PTP umożliwia swobodne przemieszczanie się między cytoplazmą i wewnętrznymi przedziałami mitochondriów cząsteczek o masie cząsteczkowej do 1500 Da [56,57]. Jak zatem może on uczestniczyć w uwalnianiu białek proapoptotycznych z mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej? Na podstawie dostępnych danych można stwierdzić, iż uwolnienie białek proapoptotycznych wynika z przerwania ciągłości błony zewnętrznej lub powstania specjalnej drogi w jej obrębie, przy czym w obu mechanizmach kanał VDAC odgrywa kluczową rolę (Ryc. 4). Pęcznienie mitochondriów i przerwanie fizycznej ciągłości zewnętrznej błony mitochondrialnej może być skutkiem działania kanału PTP [57]. Kanał VDAC, prowadząc transport cząsteczek przez zewnętrzną błonę mitochondrialną, umożliwia działanie kanału PTP i w konsekwencji pęcznienie mitochondriów. Z drugiej strony przerwanie fizycznej ciągłości zewnętrznej błony mitochondrialnej może także wynikać z ograniczenia przepuszczalności kanału VDAC (np. przez białka z rodziny Bcl-2), ponieważ ograniczenie takie prowadzi do akumulacji niskocząsteczkowych metabolitów w przestrzeni międzybłonowej, generacji gradien-

tu osmotycznego i pęcznienia matriks mitochondrialnej [58,59]. Jednak w wielu badaniach nad zjawiskiem apoptozy nie obserwuje się pęcznienia mitochondriów i przerwania ciągłości błony zewnętrznej, mimo uruchamiania apoptozy przez znane aktywatory kanału PTP, w tym białka z rodziny Bcl-2 oraz hamowania tego zjawiska przez znane inhibitory kanału PTP [7,60-62]. Badania te wskazują także na istotną rolę białek z rodziny Bcl-2 w regulacji przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej bez przerywania jej ciągłości, a głównym celem działania tych białek jest prawdopodobnie kanał VDAC [9,53,60,63].

Do białek z rodziny Bcl-2 należą białka proapoptotyczne (np. Bax, Bid, Bad) jak i antyapoptotyczne (np. Bcl-2, Bcl-x<sub>1</sub>). Białka antyapoptotyczne są białkami integralnymi, zlokalizowanymi w błonach organelli, w tym w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Natomiast białka proapoptotyczne są zwykle zlokalizowane w cytosolu lub związane z cytoszkieletem, skąd, po pojawieniu się odpowiedniego sygnału, ulegają przeniesieniu do błon komórki, w tym szczególnie do błony zewnętrznej mitochondriów, która uznawana jest za główne miejsce działania białek z rodziny Bcl-2 [64,65]. Istotną rolę w działaniu białek z rodziny Bcl-2 odgrywa powstawanie połączeń między białkami o przeciwstawnej aktywności, co prowadzi do wyeliminowania tej aktywności [9] i stanowi stosunkowo proste wyjaśnienie roli tych białek w uruchomieniu lub hamowaniu apoptozy. Jednak udział białek z rodziny Bcl-2 w regulacji uwalniania białek proapoptotycznych z mitochondriów może również polegać na ich niezależnym działaniu. Dostępne dane sugerują funkcjonowanie trzech następujących mechanizmów: (1) regulacja integralności zewnętrznej błony mitochondrialnej w wyniku regulacji działania kompleksu PTP, co sprowadza się do oddziaływania z tworzącymi ten kompleks białkami, w tym z kanałem VDAC [19,60]; (2) tworzenie kanałów w obrębie zewnętrznej błony mitochondrialnej (np. białka Bax i Bid) [53,63,66-69]; (3) oddziaływanie z kanałem VDAC, co prowadzi do tworzenia nowych kanałów (np. Bax) lub regulacji działania kanału VDAC (np. Bcl-x<sub>1</sub>) [20,60,63]. Zatem, uwolnienie białek proapoptotycznych z mitochondriów jak i ich zatrzymanie w przestrzeni międzybłonowej może być skutkiem oddziaływania proapoptotycznych jak i antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 z kanałem VDAC. Należy jednak zauważyć, iż regulacja przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej w zjawisku apoptozy jest zjawiskiem bardzo złożonym, co oznacza, iż regulacja działania kanału VDAC przez białka z rodziny Bcl-2 jest bardzo istotna, ale zapewne stanowi jedynie część tego procesu. Na przykład wiadomo, iż zwiększenie przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej może być skutkiem działania ceramidu [8].



**Rycina 4.** Kanał VDAC odgrywa istotną rolę w uwalnianiu białek proapoptotycznych z mitochondriów, co z kolei gwarantuje apoptozę. Uwolnienie białek proapoptotycznych wynika z przerwania ciągłości błony zewnętrznej lub powstania specjalnej drogi w jej obrębie, przy czym w obu mechanizmach kanał VDAC odgrywa kluczową rolę. A – pęcznienie mitochondriów i przerwanie fizycznej ciągłości zewnętrznej błony mitochondrialnej może być skutkiem działania kanału PTP. Kanał VDAC, prowadząc transport cząsteczek przez zewnętrzną błonę mitochondrialną, umożliwia działanie kanału PTP i w konsekwencji pęcznienie mitochondriów. B – pęcznienie mitochondriów może wynikać także z akumulacji niskocząsteczkowych metabolitów w przestrzeni międzybłonowej, co z kolei może być skutkiem ograniczenia przepuszczalności kanału VDAC przez białka z rodziny Bcl-2. C – białka z rodziny Bcl-2 regulują przepuszczalność zewnętrznej błony mitochondrialnej bez przerywania jej ciągłości, a głównym celem działania tych białek jest kanał VDAC. Objasnienia skrótów: bz – błona zewnętrzna; bw – błona wewnętrzna; V – kanał VDAC; B – białka z rodziny Bcl-2. Czerwone kółka reprezentują różne białka proapoptotyczne.

## PODSUMOWANIE

Kanał VDAC został zidentyfikowany w roku 1976. Obecnie, po 30 latach badań tego kanału możemy stwierdzić, iż jest to jeden z kluczowych elementów gwarantujących miejscowe i przejściowe zmiany w funkcjach mitochondriów w komórce w odpowiedzi na sygnały fizjologiczne jak i sygnały leżące u podstaw patofizjologii. Kanał VDAC jest bowiem kanałem wielofunkcyjnym, kontrolującym aktywność mitochondriów oraz komunikację między mitochondriami i przyległymi błonami. Jest to możliwe dzięki temu, iż prowadzi on transport wielu



kluczowych cząsteczek przez zewnętrzną błonę mitochondrialną, w tym jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i ATP, jak i uczestniczy w tworzeniu miejsc kontaktowych między sąsiadującymi ze sobą mitochondriami oraz między mitochondriami jak i innymi organellami. Jednakże wiele z zagadnień składających się na tak istotną rolę kanału VDAC pozostaje jeszcze do wyjaśnienia; np. na czym polega rola kanału VDAC w działaniu kompleksu PTP i w uruchomieniu apoptozy oraz jak faktycznie dochodzi do regulacji przewodnictwa tego kanału w mitochondriach? Co więcej, znajomość sekwencji białek VDAC różnych organizmów nie pozwoliła, jak dotąd, na opracowanie powszechnie akceptowanego modelu struktury przestrzennej tego kanału. W sferze dyskusji pozostaje także związek ewolucyjny kanału VDAC z porynami bakteryjnymi. Poznanie i zrozumienie wszystkich aspektów działania kanału VDAC pozwoli na pełniejsze wyjaśnienie jego roli w regulacji funkcji mitochondriów, co może mieć istotne implikacje praktyczne.

## PIŚMIENICTWO

- Schein SJ, Colombini M, Finkelstein A (1976) Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. *J Membr Biol* 30: 99-120
- Benz R (1994) Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim Biophys Acta* 1197: 167-196
- Colombini M, Blachly-Dyson E, Forte M (1996) VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. W: *Ion Channels*. Plenum Press, New York, 4: 169-202
- Blachly-Dyson E, Forte M (2001) VDAC channels. *IUBMB Life* 52: 113-118
- Kmita H, Antos N (2002) Udział kanałów błony zewnętrznej w fizjologii mitochondriów. *Postępy Biologii Komórki* 29: 203-220
- De Pinto V, Messina A, Accardi R, Aiello R, Guarino F, Tomasello MF, Tommasino M, Tasco G, Casadio R, Benz R, De Giorgi F, Ichas F, Baker M, Lawen A (2003) New functions of an old protein: the eukaryotic porin or voltage dependent anion selective channel (VDAC). *Ital J Biochem* 52: 17-24
- Shoshan-Barmatz V, Gincel D (2003) The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys* 39: 279-292
- Colombini M (2004) VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem* 256-257: 107-115
- Tsujimoto Y, Shimizu S (2002) The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. *Biochimie* 84: 187-193
- Godbole A, Varghese J, Sarin A, Mathew MK (2003) VDAC is a conserved element of death pathways in plant and animal systems. *Biochim Biophys Acta* 1642: 87-96
- Vysokikh MY, Brdiczka D (2003) The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Polon* 50: 389-404
- Zalk R, Israelson A, Garty ES, Azoulay-Zohar H, Shoshan-Barmatz V (2005) Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 386: 73-83
- Krimmer T, Rapaport D, Ryan MT, Meisinger C, Kassenbrock CK, Blachly-Dyson E, Forte M, Douglas MG, Neupert W, Nargang FE, Pfanner N (2001) Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the general import pore of the TOM complex. *J Cell Biol* 152: 289-300
- Paschen SA, Waizenegger T, Stan T, Preuss M, Cyrklaff M, Hell K, Rapaport D, Neupert W (2003) Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* 426: 862-866
- Gentle I, Gabriel K, Beech P, Waller R, Lithgow T (2004) The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J Cell Biol* 164: 19-24
- Habib SJ, Waizenegger T, Lech M, Neupert W, Rapaport D (2005) Assembly of the TOB complex of mitochondria. *J Biol Chem* 280: 6434-6440
- Kozjak V, Wiedemann N, Milenkovic D, Lohaus C, Meyer HE, Guidard B, Meisinger C, Pfanner N (2003) An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 278: 48520-48523
- Pfanner N, Wiedemann N, Meisinger C, Lithgow T (2004) Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Mol Biol* 11: 1044-1048
- Duchen MR (2004) Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* 25: 365-451
- Jonas E (2004) Regulation of synaptic transmission by mitochondrial ion channels. *J Bioenerg Biomembr* 36: 357-361
- Rostovtseva T, Colombini M (1997) VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys J* 72: 1954-1962
- Gottlieb RA (2000) Programmed cell death. *Drug News Perspect* 13: 471-476
- Vysokikh M, Brdiczka D (2004) VDAC and peripheral channelling complexes in health and disease. *Mol Cell Biochem* 256-257: 117-126
- Azoulay-Zohar H, Israelson A, Abu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V (2004) In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem J* 377: 347-355
- Oudard S, Miccoli L, Beurdeley-Thomas A, Dutrillaux B, Poupon MF (2004) Homophilic anchorage of brain-hexokinase to mitochondria-porins revealed by specific-peptide antibody cross recognition. *Bull Cancer* 91: E184-200
- Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, Rutter GA, Rizzuto R (1999) Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13807-13812
- Bianchi K, Rimessi A, Prandini A, Szabadkai G, Rizzuto R (2004) Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship. *Biochim Biophys Acta* 1742: 119-131
- Nicholls DG, Budd SL (2000) Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 80: 315-360
- Carriedo SG, Sensi SL, Yin HZ, Weiss JH (2000) AMPA exposures induce mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload and ROS generation in spinal motor neurons *in vitro*. *J Neurosci* 20: 240-250.
- Starkov AA, Polster BM, Fiskum G (2002) Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *J Neurochem* 83: 220-228
- Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R, Gunter K (2000) Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* 28: 285-296
- Bernardi P (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79: 1127-1155
- Sluse FE, Jarmuszkiewicz W (2002) Dynamics of  $\text{H}^+$  fluxes in mitochondrial membrane. W: Rengel Z (red) *Handbook of plant growth: pH as a master variable in plant growth*. Marcel Dekker Inc, New York, str. 173-209
- Szalai G, Csordas G, Hantash BM, Thomas AP, Hajnoczky G (2000) Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. *J Biol Chem* 275: 15305-15313
- Hajnoczky G, Csordas G, Yi M (2002) Old players in a new role: mitochondria-associated membranes, VDAC, and ryanodine receptors as contributors to calcium signal propagation from endoplasmic reticulum to the mitochondria. *Cell Calcium* 32: 363-377
- Gilbert JA, Bakowski D, Parekh AB (2001) Energized mitochondria increase the dynamic range over which inositol 1,4,5-trisphosphate activates store-operated calcium influx. *EMBO J* 20: 2672-2679
- Sharma VK, Ramesh V, Franzini-Armstrong C, Sheu SS (2000) Transport of  $\text{Ca}^{2+}$  from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in rat ventricular myocytes. *J Bioenerg Biomembr* 32: 97-104
- Pacher P, Thomas AP, Hajnoczky G (2002)  $\text{Ca}^{2+}$  marks: miniature calcium signals in single mitochondria driven by ryanodine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2380-2385

39. Rapizzi E, Pinton P, Szabadkai G, Wieckowski MR, Vandecasteele G, Baird G, Tuft RA, Fogarty KE, Rizzuto R (2002) Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of  $Ca^{2+}$  microdomains to mitochondria. *J Cell Biol* 159: 613-624
40. Shoshan-Barmatz V, Zalk R, Gincel D, Vardi N (2004) Subcellular localization of VDAC in mitochondria and ER in the cerebellum. *Biochim Biophys Acta* 1657: 105-114
41. Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC (2001) A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* 276: 38084-38089
42. Łukaszewicz-Hussain A (2003) Uszkodzenia komórki – rola mitochondriów. *Postępy Biochem* 49: 250-256
43. Fleury C, Mignotte B, Vayssières JL (2002) Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84: 131-141
44. Szewczyk A, Wojtczak L (2002) Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 54: 101-127
45. Jo SH, Son MK, Koh HJ, Lee SM, Song IH, Kim YO, Lee YS, Jeong KS, Kim WB, Park JW, Song BJ, Huh TL (2001) Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 276: 16168-16176
46. Bartosz G (2003) Total antioxidant capacity. *Adv Clin Chem* 37: 219-292
47. Petrova YV, Rasheva TV, Kujumdzieva AV (2002) Catalase enzyme in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 5(1), <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue1>
48. Dutilleul C, Garmier M, Noctor G, Mathieu C, Chetrit P, Foyer CH, de Paeppe R (2003) Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell* 15: 1212-1226
49. Wojtczak L, Slyshenkov VS (2003) Protection by pantothenic acid against apoptosis and cell damage by oxygen free radicals – the role of glutathione. *Biofactors* 17: 61-73
50. Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 276: 38388-38393
51. Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E (2003) Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* 278: 5557-5563
52. Madeo F, Engelhardt S, Herker E, Lehmann N, Maldener C, Proksch A, Wissing S, Frohlich KU (2002) Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr Genet* 41: 208-216
53. Parone PA, James D, Martinou JC (2002) Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 84: 105-111
54. Grądzka I (2000) Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Postępy Biochem* 46: 2-16
55. Zoratti M, Szabo I (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241: 139-176
56. Crompton M (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341: 233-249
57. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ (2002) The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84: 153-166
58. Vander Heiden MG, Chandel NS, Li XX, Schumacker PT, Colombini M, Thompson CB (2000) Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4666-4671
59. Vander Heiden MG, Li XX, Gottlieb E, Hill RB, Thompson CB, Colombini M (2001) Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 276: 19414-19419
60. Rostovtseva TK, Antonsson B, Suzuki M, Youle RJ, Colombini M, Bezrukov SM (2004) Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. *J Biol Chem* 279: 13575-13583
61. Cesura AM, Pinard E, Schubel R, Goetschy V, Friedlein A, Langen H, Polcic P, Forte MA, Bernardi P, Kemp JA (2003) The voltage-dependent anion channel is the target for a new class of inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 278: 49812-49818
62. Waterhouse NJ, Ricci JE, Green DR (2002) And all of a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis. *Biochimie* 84: 113-121
63. Shimizu S, Ide T, Yanagida T, Tsujimoto Y (2000) Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem* 275: 12321-12325
64. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13: 1899-18911
65. Rapaport D (2003) Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins. *EMBO Rep* 4: 948-952
66. Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB (1997) Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385: 353-357
67. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7: 1166-1173
68. Martinou JC, Green DR (2001) Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 63-67
69. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR, Newmeyer DD (2002) Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111: 331-342

## The VDAC channel as the mitochondria function regulator

Hanna Kmita<sup>✉</sup>, Olgierd Stobienia

Laboratory of Bioenergetics, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Adam Mickiewicz University, 10 Fredry St., 61-701 Poznań, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: kmita@amu.edu.pl

**Key words:** mitochondria, the VDAC channel, ATP rationing,  $Ca^{2+}$  homeostasis, reactive oxygen species, apoptosis

### ABSTRACT

Regulation of mitochondria physiology, indispensable for proper cell activity, requires an efficient exchange of molecules between mitochondria and cytoplasm at the level of the mitochondrial outer membrane. The common pathway for the metabolite exchange between mitochondria and cytoplasm is the VDAC channel (voltage dependent anion channel), known also as mitochondrial porin. The channel was identified for the first time in 1976 and since that time has been extensively studied. It has been recognized that the VDAC channel plays a crucial role in the regulation of metabolic and energetic functions of mitochondria. In this article we review the VDAC channel relevance to ATP rationing,  $Ca^{2+}$  homeostasis, protection against oxidative stress and apoptosis execution.

# Mitochondrialne kanały jonowe

## STRESZCZENIE

Kanały jonowe są białkami umożliwiającymi szybki przepływ jonów przez błony biologiczne. Poznano strukturę i funkcję wielu kanałów jonowych błon plazmatycznych. Natomiast wiedza o wewnątrzkomórkowych kanałach jonowych jest ograniczona. Do tej pory dobrze poznano: kanał wapniowy, obecny w błonach siateczki śródplazmatycznej i porynę mitochondrialną. Obecne w wewnętrznej błonie mitochondrialnej kanały potasowe: regulowany przez ATP (mitoK<sub>ATP</sub>) oraz aktywowany przez jony Ca<sup>2+</sup> kanał o dużym przewodnictwie (mitoBK<sub>Ca</sub>) biorą udział w ochronie komórek przed śmiercią wywołaną działaniem różnych szkodliwych czynników np. niedotlenieniem. W opracowaniu przedstawiono najnowsze dane dotyczące różnych kanałów jonowych obecnych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i opisano ich rolę w metabolizmie komórkowym.

## WPROWADZENIE

Mitochondria to organelle produkujące ATP w komórce. Wnętrze mitochondriów, zwane macierzą otoczone jest dwiema błonami: wewnętrzną i zewnętrzną. W wewnętrznej błonie mitochondrialnej znajdują się enzymy łańcucha oddechowego, które podczas utleniania substratów oddechowych wyrzucają z macierzy protony. Powrót protonów przez ATP syntetazę prowadzi do wytworzenia ATP. Badania ostatnich lat wskazują, że mitochondria uczestniczą również w procesach przekazywania sygnałów w komórce [1]. Uważa się, że jednym z wydarzeń inicjujących proces apoptotycznej śmierci komórki jest uwolnienie z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów: cytochromu c, czynnika indukującego apoptozę typu AIF (ang. *apoptosis inducing factor*), inhibitora białek anty-apoptycznych Smac/DIABLO (ang. *second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI*) oraz endonukleazy G. Utracie integralności wewnętrznej błony mitochondrialnej towarzyszą między innymi, zaburzenia homeostazy jonów wapniowych oraz depolaryzacja potencjału. Konsekwencją uszkodzenia mitochondriów jest śmierć komórek na drodze nekrozy. Mitochondria stanowią również miejsce syntezy reaktywnych form tlenu, które według jednej z hipotez przyczyniają się do śmierci komórek, a według innej są cząsteczkami sygnałowymi przekazującymi informację w komórce.

Jednym z lepiej poznanych i najwcześniej opisanych mitochondrialnych białek kanałowych jest poryna, znana również pod nazwą VDAC (ang. *voltage dependent anion channel*), która tworzy, w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, zależny od potencjału kanał anionowy o przewodnictwie ok. 500 pS. Kanał ten nie jest przedmiotem niniejszego opracowania. Zainteresowanych odsyłamy do artykułów przeglądowych [2,3].

Inną grupą białek tworzących kanały jonowe w błonach mitochondriów w warunkach poprzedzających apoptotyczną śmierć komórki, są białka należące do rodziny Bcl-2 (np. białka Bid, Bak i Bax). Białko Bak występuje w mitochondriach i jest związane z VDAC2, a jego proapoptotyczne właściwości ujawniają się po odłączeniu od VDAC2 [4]. Nieaktywne białko Bax znajduje się w cytoplazmie. Po stymulacji komórki do apoptotycznej śmierci, dochodzi do przemieszczenia Bax z cytoplazmy do błony mitochondrialnej, gdzie białko to ulega oligomeryzacji tworząc kompleksy o dużej masie cząsteczkowej. Kompleksy te prowadzą do tworzenia porów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej [5]. Podobnie, proteolityczne rozszczepienie białka tBid (ang. *truncated Bid*) przy udziale kaspazy 8 i jego przemieszczenie do zewnętrznej błony mitochondrialnej, powoduje utratę integralności zewnętrznej błony mitochondrialnej i wypływ cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej. Istnieją również doniesienia mówiące o tworzeniu megakanalu w zewnętrznej błonie mitochondrialnej przez kompleks białek tBid i Bax, przez który wydostają się z przestrzeni międzybłonowej czynniki apoptogenne, takie jak: AIF, Smac/Diablo czy endonukleaza G [6]. Badania rekonstrukcyjne białka Bid do sztucznych błon lipidowych wykazały, że białko to

Jolanta Skalska<sup>1</sup>

Grażyna Dębska-Vielhaber<sup>3</sup>

Marta Głąb<sup>1</sup>

Bogusz Kulawiak<sup>1</sup>

Dominika Malińska<sup>1</sup>

Izabela Koszela-Piotrowska<sup>1</sup>

Piotr Bednarczyk<sup>2</sup>

Krzysztof Dołowy<sup>2</sup>

Adam Szewczyk<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, Warszawa

<sup>2</sup>Katedra Fizyki, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

<sup>3</sup>Department of Neurology II, University of Magdeburg Medical Center, Magdeburg, Germany

<sup>4</sup>Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: a.szewczyk@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 6 października 2005 r.  
Artykuł zaakceptowano 7 marca 2006 r.

**Słowa kluczowe:** mitochondria, kanały jonowe, apoptoza

**Podziękowania:** Prace doświadczalne autorów niniejszego opracowania zostały sfinansowane przez projekty badawcze: Ministerstwa Edukacji i Nauki 3P04A05025, 6P04A1219, 6P04A01019, 6P04A02321 i PBZ-MIN-001/P05/11, przez NATO collaborative grant LST.CLG.975126, LST.CLG.97921 oraz przez Roche Organ Transplantation Research Foundation ROTFR 860428181

charakteryzuje się trzema stanami przewodnictwa: niskim ok. 7,5 pS, średnim ok. 40 pS oraz dużym ok. 100 pS [7].

W transporcie białka do wnętrza mitochondriów uczestniczą receptory zlokalizowane na błonie mitochondrialnej zewnętrznej i wewnętrznej. Stanowią one kompleks białek o nazwie TOM (ang. *translocase of the outer membrane*) znajdujący się w mitochondrialnej błonie zewnętrznej oraz TIM (ang. *translocase of the inner membrane*) umiejscowiony w błonie wewnętrznej. W kompleksach TOM i TIM znajdują się domeny transbłonowe tworzące por kanału, przez który dostają się do mitochondrium białka prekursorowe. Kanał w kompleksie TIM prawdopodobnie otwiera się w momencie przechodzenia wprowadzanego do macierzy mitochondrialnej białka prekursorowego [8].

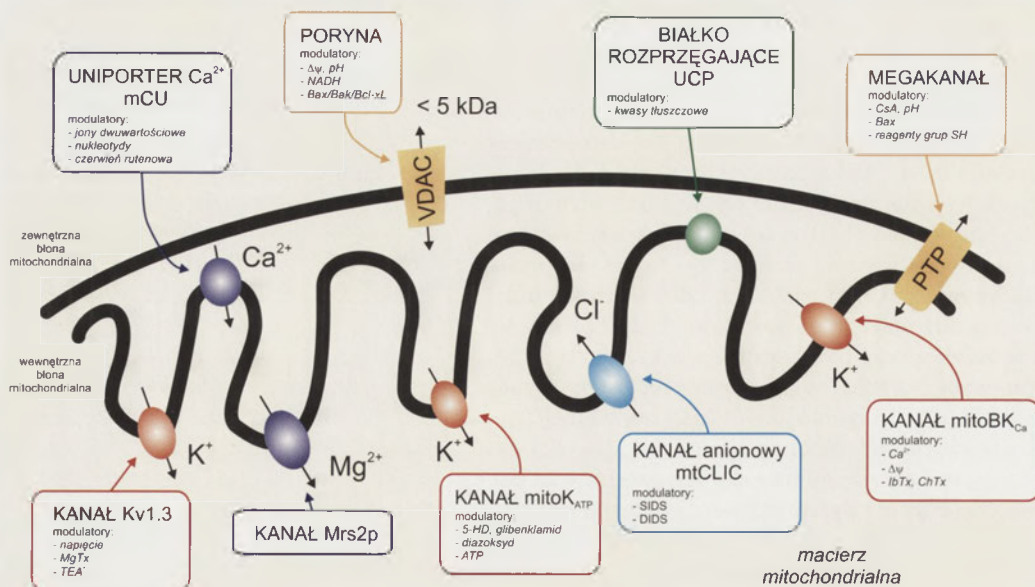
## KANAŁY JONOWE WEWNĘTRZNEJ BŁONY MITOCHONDRIALNEJ

W wewnętrznej błonie mitochondrialnej znajduje się wiele kanałów jonowych (Ryc. 1), niektóre przepuszczają selektywnie kationy, inne aniony. Kanały te utrzymują homeostazę jonową w mitochondriach, odpowiedzialne są za zmiany objętości wnętrza mitochondriów, a także biorą udział w tworzeniu gradientu pH między macierzą mitochondrialną a cytoplazmą komórki [9,10]. Transport jonów potasowych, który jest kontrolowany między innymi przez mitochondrialne kanały potasowe zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, jest istotny dla optymalnego przebiegu fosforylacji oksydacyjnej. Napływ  $K^+$  do wnętrza mitochondriów wpływa na: zmianę ich objętości [11], na regulację procesu  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych i na zwiększenie szybkości oddychania mitochondrialnego. Badania ostatnich lat pokazują, że kanały potasowe obecne w wewnętrznej błonie mitochondrialnej biorą aktywny udział w indukowaniu procesów zmniejszających śmiertelność komórek poddanych działaniu czynników szkodliwych [12], a aktywacja kanału  $mitoK_{ATP}$  może prowadzić do ochrony komórek zarówno przed śmiercią apoptotyczną jak i nekrotyczną. Mitochondrialny kanał chlorkowy (mtCLIC)

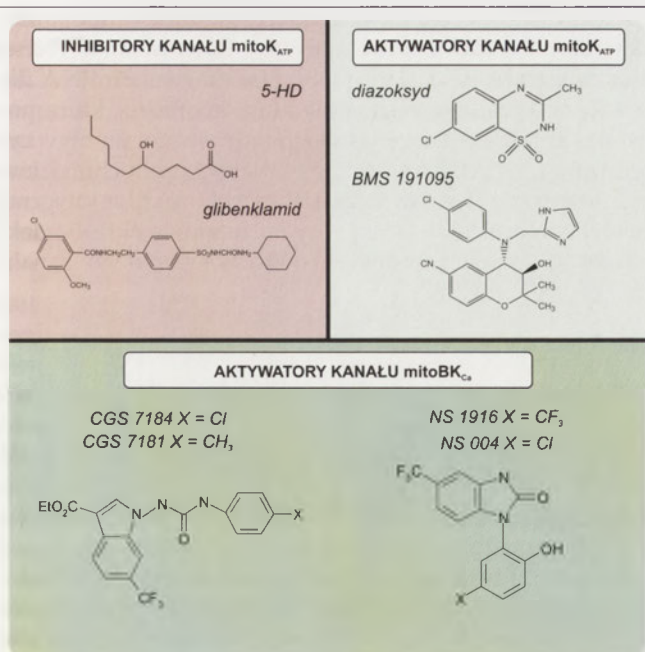
prawdopodobnie bierze udział w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy. Poznanie roli jaką pełnią kanały jonowe w wewnętrznej błonie mitochondrialnej jest więc bardzo istotne. Wiedza ta może, między innymi, przyczynić się do powstania nowej generacji leków przeciwnowotworowych, których celem oddziaływać będą mitochondrialne kanały jonowe.

## KANAŁ POTASOWY REGULOWANY PRZEZ ATP

Mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP (kanał  $mitoK_{ATP}$ ) po raz pierwszy został opisany w wewnętrznej błonie mitochondriów wątroby szczura [13]. Kanały o podobnych właściwościach zostały następnie zidentyfikowane w mitochondriach: serca [14], limfocytów T człowieka [15], mięśni szkieletowych [16] oraz mózgu [17]. Można zaobserwować podobieństwa i różnice pomiędzy kanałem  $K_{ATP}$  znajdującym się w błonie plazmatycznej i kanałem  $mitoK_{ATP}$ . Oba kanały są otwierane przez aktywatory kanałów potasowych – KCO (ang. *potassium channel openers*) i hamowane przez pochodne sulfonamocznika – gli-benklamid oraz kwas 5-hydroksydekanowy (5-HD) [16-22] (Ryc. 2). Diazoksyd (aktywator kanału  $K_{ATP}$ ) wykazuje około 1000 razy większe powinowactwo do kanału  $mitoK_{ATP}$  niż do  $K_{ATP}$  błony plazmatycznej komórek mięśnia sercowego [23]. Inny aktywator kanałów potasowych BMS 191095 oddziałuje specyficznie z kanałem  $mitoK_{ATP}$  a nie wykazuje powinowactwa do kanału  $K_{ATP}$  z błony plazmatycznej [24]. Zaobserwowano, że S-nitrozo-N-acetyl-DL-penicylamina (SNAPS), związek będący donorem tlenu azotu, aktywuje kanał  $mitoK_{ATP}$ , natomiast nie powoduje aktywacji kanału  $K_{ATP}$  z błony plazmatycznej. Wykazano również, że utlenianie macierzy mitochondrialnej indukowane przez SNAPS blokowane jest przez specyficzny inhibitor kanału  $mitoK_{ATP}$  5-HD oraz przez wymiatacze rodników. Wyniki te sugerują, że tlenek azotu może bezpośrednio aktywować kanał  $mitoK_{ATP}$  [25]. Ostatnie wyniki sugerują, że izoforma kinazy białkowej C, obok reaktywnych form tlenu, pochodnych kwasu palmitylooleinowego oraz GTP, reguluje aktywność kanału  $mitoK_{ATP}$  (Ryc. 3) [26,27].

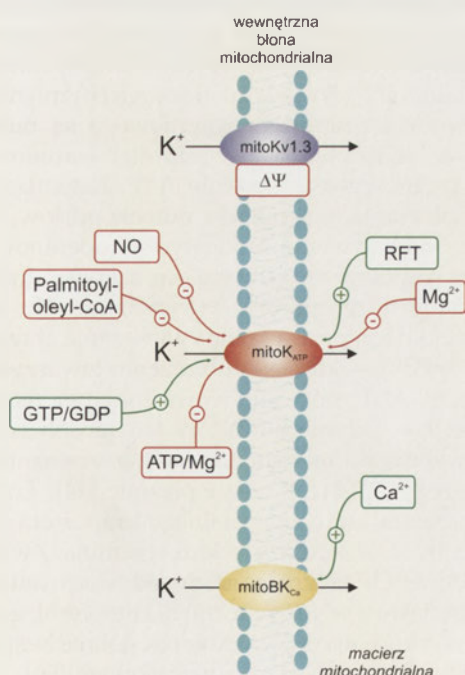


Rycina 1. Mitochondrialne kanały jonowe. Oznaczenia skrótów: CsA – cyklosporyna A, ChTx – charybdotoksyna, DIDS (oraz SIDS) – pochodne stilbenu, 5-HD – kwas 5-hydroksydekanowy, IbTx – ibe-riotoksyna, mCU – uniporter wapniowy (ang. *mitochondrial calcium uniporter*), MgTx – margatoksyna,  $mitoBK_{Ca}$  – mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie aktywowany jonami wapniowymi,  $mitoK_{ATP}$  – mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP, Mrs2p – kanał magnezowy, PTP – megakanał mitochondrialny (ang. *permeability transition pore*), TEA – jony tetraetyloamoniowe, UCP – białko rozprzegające (ang. *uncoupling protein*), VDAC – poryna mitochondrialna (ang. *voltage dependent anion channel*),  $\Delta\psi$  – potencjał mitochondrialny.



Rycina 2. Regulatory aktywności mitochondrialnych kanałów jonowych. Oznaczenia skrótów: 5-HD – kwas 5-hydroksydekanowy, mitoBK<sub>Ca</sub> – mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie aktywowany jonami wapniowymi, mitoK<sub>ATP</sub> – mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP.

Budowa kanału mitoK<sub>ATP</sub> nie została dotychczas poznana, ale wydaje się, że kanał ma strukturę podjednostkową. Podobnie jak kanał z błony plazmatycznej, mitochondrialny kanał K<sub>ATP</sub> prawdopodobnie składa się z dwóch podjednostek: Kir6.x (podjednostka tworząca por kanału) i SUR (część regulatorowa będąca receptorem sulfonamoczników)



Rycina 3. Endogenne regulatory mitochondrialnych kanałów potasowych. Oznaczenia skrótów: mitoBK<sub>Ca</sub> – mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie aktywowany jonami wapniowymi, mitoK<sub>ATP</sub> – mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP, mitoKv1.3 – mitochondrialny kanał potasowy typu Kv, RFT – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*).

[18]. Receptor SUR w błonie wewnętrznej mitochondriów różni się od swojego odpowiednika z błony plazmatycznej niższym powinowactwem do pochodnych sulfonamocznika [28,29]. Do tej pory nie udało się jednoznacznie określić jakiego rodzaju izoforny podjednostek Kir i SUR wchodzi w skład kanału mitoK<sub>ATP</sub>, a dane literaturowe na ten temat nie są jednoznaczne [18]. Ostatnie badania wskazują, że kanał mitoK<sub>ATP</sub> może być związany funkcjonalnie z mitochondrialną dehydrogenazą bursztynianową tworząc większy, wielobiałkowy kompleks [18].

Istnieje hipoteza, że wzrost aktywności kanału mitoK<sub>ATP</sub> wpływa ochronnie na mięsień sercowy poddany uszkodzeniu poprzez niedotlenienie i na neurony oraz komórki mięśni szkieletowych [30,31]. Wykazano, że inhibitory kanału mitoK<sub>ATP</sub> takie jak glibenklamid oraz 5-HD obniżają dobroczynną rolę diazoksydu w zjawisku kardioprotekcji [12]. Stąd też poszukiwania specyficznych aktywatorów mitochondrialnego kanału K<sub>ATP</sub> stało się ważnym celem wielu grup badawczych.

### KANAŁ POTASOWY AKTYWOWANY JONAMI WAPNIOWYMI

Mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie, aktywowany jonami wapniowymi (kanał mitoBK<sub>Ca</sub>), zidentyfikowano po raz pierwszy w mitoplastach oczyszczonych z linii komórek glejaka człowieka [32]. Prawdopodobieństwo otwarcia tego kanału wzrasta wraz ze wzrostem stężenia Ca<sup>2+</sup> w cytosolu i spadkiem potencjału mitochondrialnego, a jego aktywność, podobnie jak w przypadku kanałów BK<sub>Ca</sub> błony plazmatycznej, hamowana jest przez charybdotoksynę [32]. Rola kanałów BK<sub>Ca</sub> w mitochondriach nie jest znana, wykazano jednak, że aktywatory kanału BK<sub>Ca</sub> (NS1619 i NS004) hamują aktywność łańcucha oddechowego w mitochondriach komórek glejaka [33–35]. Kanał mitoBK<sub>Ca</sub> opisano również w wewnętrznej błonie mitochondrialnej kardiomiocytów [36]. Wzrostowi aktywności mitoBK<sub>Ca</sub> przypisuje się efekt ochrony komórek mięśnia sercowego przed śmiertelnymi skutkami niedotlenienia. Prawdopodobnie generacja reaktywnych form tlenu zapoczątkowuje proces tzw. farmakologicznego hartowania serca przez NS1619 [37]. Ochronny efekt NS1619, hamowany przez inhibitor kanału – paksylinę, obserwowano także w warunkach podwyższonego stężenia jonów wapniowych w cytoplazmie kardiomiocytów [38]. Specyficzność oddziaływania NS1619 z kanałem mitoBK<sub>Ca</sub> potwierdziły dodatkowe badania jego wpływu na stopień utlenienia flawoprotein mitochondrialnych. Aktywator NS1619 pobudzał utlenianie i zmianę fluorescencji flawoprotein, a efekt ten był hamowany przez paksylinę. Regulatorem kanału mitoBK<sub>Ca</sub> może być kinaza białkowa A. Aktywacja PKA przez analog cyklicznego AMP – 8Br-cAMP wykazała wzmożony efekt NS1619 na utlenienie flawoprotein [38]. Podobny efekt obserwowano dla 17β-estradolu – wzmocniona fluorescencja flawoprotein hamowana przez paksylinę może świadczyć o wpływie estrogenów na aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> [39]. Hipotezę tę wydaje się potwierdzać hamujący wpływ paksyliny na kardioprotekcyjny efekt 17β-estradolu podawanego w warunkach niedotlenienia.

Budowa kanału mitoBK<sub>Ca</sub> nie jest znana. Być może jest ona podobna do kanału BK<sub>Ca</sub> błony plazmatycznej, o któ-

rym wiadomo, że składa się z czterech podjednostek  $\alpha$  (tworzących por kanału) oraz czterech podjednostek regulatorowych  $\beta$  [18]. Kanały BK<sub>Ca</sub> w poszczególnych tkankach różnią się jednak, ponieważ podjednostki kanału występują w różnych izoformach [40]. Badania podwójnych hybryd drożdżowych wskazują, że podjednostki  $\beta_1$  mitoBK<sub>Ca</sub> mięśnia sercowego mogą oddziaływać bezpośrednio z podjednostką I oksydazy cytochromu *c* [39]. Do tej pory nie udało się określić sekwencji poszczególnych podjednostek kanału mitoBK<sub>Ca</sub>.

#### KANAŁ Kv1.3 W WEWNĘTRZNEJ BŁONIE MITOCHONDRIALNEJ

Kanał Kv1.3 w wewnętrznej błonie mitochondrialnej limfocytów T odkryto stosując elektrofizjologiczną technikę patch-clamp [41]. Przewodnictwo kanału wynosi około 25 pS. Jest on selektywny dla jonów potasowych i wrażliwy na specyficzny inhibitor kanałów Kv: margatoksynę [42]. Obecność kanału Kv1.3 potwierdziły doświadczenia z użyciem specyficznych przeciwciał anti-Kv1.3. Masę cząsteczkową białka kanałowego oszacowano na ok. 65 kDa [41]. Fizjologiczna rola mitochondrialnego kanału Kv1.3 jak i jego budowa są nadal nieznane. Zaobserwowano jednak terapeutyczny efekt hamowania aktywności kanału Kv1.3 limfocytów T w układzie doświadczalnym imitującym stwardnienie rozsiane [43]. Doświadczenia z użyciem genetycznie zmodyfikowanych limfocytów T (z wyłączonym genem kodującym białko kanału Kv1.3) wskazują na jego udział w apoptotycznej śmierci komórek [44]. Kanał Kv1.3 należący do rodziny białek kanałowych *Shaker*, został scharakteryzowany w błonach komórkowych wielu tkanek. Opisano jego obecność, między innymi, w centralnym układzie nerwowym, nerkach, mięśniach szkieletowych, tkance tłuszczowej, osteoklastach oraz limfocytach T i B. Po mitoK<sub>ATP</sub> [13] i mitoBK<sub>Ca</sub> [32] mitochondrialny kanał Kv1.3 jest trzecim kanałem, któremu przypisuje się udział w transporcie jonów potasowych przez wewnętrzną błonę mitochondrialną i dobroczynny wpływ na komórki poddane działaniu czynników szkodliwych.

#### KANAŁY CHLORKOWE

Wewnątrzkomórkowe kanały chlorkowe CLIC (z ang. *chloride intracellular channel*) to rodzina białek, do których należą: między innymi białko p64 oraz białka CLC1 – 5 i „parachorin”. Sekwencja aminokwasowa dla CLIC kodowana jest przez geny ulegające ekspresji niemal w każdej tkance ssaków. Ponadto obecność kanału chlorkowego typu CLC-Nt1 zidentyfikowano w mitochondriach roślin [45]. Również w wewnętrznej błonie mitochondrialnej organizmów zwierzęcych opisano kanały chlorkowe [46,47], jednak do tej pory tylko jeden z nich, oznaczony jako mtCLIC udało się sklonować [48]. Kanał ten wykazuje duże podobieństwo do zależnego od potencjału elektrycznego kanału Cl<sup>-</sup> znanego z błony plazmatycznej oraz do wewnątrzkomórkowego kanału chlorkowego p64H1 opisanego w siateczce śródplazmatycznej komórek nerwowych szczura. Obecność miejsc fosforylacji dla kinazy białkowej zależnej od cAMP, kinazy tyrozynowej oraz kinazy białkowej 2 wskazuje na potencjalny udział tych białek w regulacji aktywności mtCLIC [48]. Zaobserwowano również, że ekspresja genu mtCLIC

regulowana jest przez czynniki uczestniczące w apoptozie, takie jak p53 oraz czynnik martwicy nowotworów TNF- $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) [48]. Nadekspresja mRNA dla mtCLIC w keratynocytach powoduje apoptozę, którą poprzedza spadek potencjału mitochondrialnego, wypływ cytochromu *c* z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów oraz aktywacja kaspaz uczestniczących w apoptotycznej śmierci komórek [49]. Do tej pory nie udało się określić elektrofizjologicznych właściwości mitochondrialnego kanału chlorkowego mtCLIC.

#### UNIPORTER WAPNIOWY

Mitochondrialny uniporter wapniowy mCU (ang. *mitochondrial calcium uniporter*) odpowiedzialny jest za szybkie pobieranie jonów wapniowych z cytosolu komórki do wnętrza macierzy [50]. Ponieważ transport Ca<sup>2+</sup> jest elektrogenny, procesowi temu towarzyszy spadek potencjału elektrycznego, który może być kompensowany przez wzmożoną aktywność łańcucha oddechowego [50]. Badania przeprowadzone techniką patch-clamp pokazały, że uniporter wapniowy może tworzyć w wewnętrznej błonie mitochondrialnej kanał jonowy selektywny względem Ca<sup>2+</sup> [51]. Obserwacje te potwierdzają wcześniejsze badania przeprowadzone na początku lat 80, w których opisano kanał o przewodnictwie ok. 20 pS pojawiający się po rekonstrukcji glikoproteiny o masie 40 kDa (białko wewnętrznej błony mitochondrialnej) do sztucznych błon lipidowych.

Głównym czynnikiem aktywującym mitochondrialny uniporter wapniowy jest podwyższone stężenie Ca<sup>2+</sup> w cytosolu. Po akumulacji Ca<sup>2+</sup> w macierzy mitochondrialnej i powrocie do fizjologicznego stężenia Ca<sup>2+</sup> w cytosolu, aktywność uniportera obniża się. Allosteryczne oddziaływanie jonów wapniowych reguluje aktywność mCU [52]. Dla prawidłowego funkcjonowania uniportera wapniowego niezbędny jest również wysoki potencjał w poprzek błony mitochondrialnej [53]. Ważnymi fizjologicznymi modulatorami aktywności uniportera wapniowego są nukleotydy adeninowe. Mitochondrialny uniporter wapniowy jest hamowany przez wysokie stężenie ATP, natomiast ADP stymuluje pobieranie wapnia do mitochondriów. Prawdopodobnie oddziaływanie nukleotydów adeninowych z uniporterem wapniowym odbywa się za pośrednictwem mitochondrialnych receptorów purynergicznymi: mP2Y<sub>1</sub> – którego stymulacja prowadzi do zwiększenia aktywności uniportera i mP2Y<sub>2</sub> – którego pobudzeniu towarzyszy hamowanie mCU. ADP może aktywować obydwa receptory, natomiast ATP – jedynie mP2Y<sub>2</sub>. W ten sposób szybkość pobierania wapnia do mitochondriów jest uzależniona od stosunku stężeń ATP/ADP w cytoplazmie [54]. Endogennymi aktywatorami mitochondrialnego uniportera Ca<sup>2+</sup> są także poliaminy, a przede wszystkim spermina. Związki te obniżają stężenie Ca<sup>2+</sup> wymagane do aktywacji uniportera [55]. Również flawonoidy (kwercetyna, kempferol, genisteina i genistyna) aktywują mCU prawdopodobnie bezpośrednio oddziaływując z uniporterem wapniowym [56].

Aktywność uniportera wapniowego jest hamowana w sposób niekompetycyjny przez związki rutenu, takie jak czerwień rutenowa czy Ru-360. Substancje te są powszechnie stosowanymi narzędziami w badaniach mCU. Inhibito-

rami tego białka są również jony metali:  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Ba}^{2+}$  oraz lantanowce [57]. Jony te mogą być także przenoszone przez mCU. Natomiast  $\text{Mg}^{2+}$  wiąże się do miejsca regulatorowego uniportera, powodując wzrost  $K_m$  dla  $\text{Ca}^{2+}$ , sam jednak nie jest transportowany przez mCU. Jony manganu w zależności od stężenia w obecności  $\text{Mg}^{2+}$ , mogą zmniejszać lub zwiększać aktywność uniportera wapniowego wypierając jon  $\text{Mg}^{2+}$  z miejsc regulatorowych mCU [57].

Badania ostatnich lat pokazują, że w wewnętrznej błonie mitochondrialnej istnieje jeszcze jeden mechanizm pobierania jonów wapniowych, aktywny podczas krótkotrwałej ekspozycji mitochondriów na submikromolowe stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  (tzw. fizjologiczny puls wapniowy) [58]. W tych warunkach mitochondria pobierają  $\text{Ca}^{2+}$  znacznie wydajniej. Jest to tak zwany szybki mechanizm pobierania jonów wapniowych RaM (ang. *rapid mode of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake*). RaM podobnie jak uniporter  $\text{Ca}^{2+}$  hamowany jest przez czerwień rutenową oraz aktywowany przez sperminę [50], ale nie jest hamowany przez  $\text{Mg}^{2+}$  [58]. Jony wapniowe w macierzy mitochondrialnej regulują enzymy związane z cyklem kwasów trójkarboksylowych: fosfatazę dehydrogenazy pirogronianowej, dehydrogenazę izocytrynianową zależną od  $\text{NAD}^+$  oraz dehydrogenazę  $\alpha$ -ketoglutaranową, przyczyniając się tym samym do wzrostu produkcji ATP. Ostatnie badania wskazują również na funkcjonalne powiązanie mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej w procesach regulujących apoptotyczną śmierć komórki z udziałem jonów wapniowych.

#### KANAŁ MAGNEZOWY

$\text{Mg}^{2+}$  są transportowane do macierzy mitochondrialnej poprzez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Prawdopodobnie napływ  $\text{Mg}^{2+}$  do mitochondriów następuje poprzez kanał Mrs2p, którego aktywność zależy od potencjału elektrycznego oraz stężenia  $\text{Mg}^{2+}$ . Do tej pory jednak nie udało się przedstawić profilu elektrofizjologicznego tego kanału [59].

#### KANAŁ ANIONOWY IMAC

Anionowy kanał IMAC (ang. *mitochondria inner membrane anion channel*) zlokalizowany w wewnętrznej błonie mitochondriów bierze udział w regulacji objętości mitochondriów. IMAC przewodzi zarówno aniony jednowartościowe ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ) jak i wielowartościowe (np. cytrynian) [60]. Metodą patch-clamp wyznaczono przewodnictwo kanału IMAC na 105 pS. [61]. Rola jaką kanał IMAC odgrywa w funkcjonowaniu komórki nie jest do końca jasna. Istnieją doniesienia mówiące, że przez IMAC dochodzi do uwalniania nadtlenu anionowych z mitochondriów podczas tzw. hartowania niedotlenieniem [62]. Prawdopodobnie bierze on też udział w synchronizacji oscylacji potencjału mitochondrialnego w izolowanych kardiomiocytach. Aktywacja IMAC poprzedza otwarcie megakanału mitochondrialnego (PTP) czego efektem jest śmierć komórki [63].

#### BIAŁKO ROZPRZĘGAJĄCE UCP

W wewnętrznej błonie mitochondrialnej opisano również kanał o przewodnictwie 75 pS, tworzony przez termo-

geninę – białko rozprzęgające UCP1 (ang. *uncoupling protein*) należące do integralnych białek błonowych ulegających ekspresji głównie w brązowej tkance tłuszczowej. Odgrywa ono kluczową rolę w procesie termogenezy. Opisano pięć izoform białek UCP w komórkach ssaków: UCP1, UCP2, UCP3, UCP4 oraz BMCP-1, występujące w mózgu (ang. *brain mitochondria carrier protein-1*). Główną ich funkcją jest tworzenie ciepła poprzez rozprzęganie fosforylacji oksydatywnej. Białko UCP2 występuje powszechnie w tkankach ssaków. Ostatnie doniesienia wskazują, że UCP2 bierze udział w ochronie komórek nerwowych przed śmiercią na skutek niedotlenienia poprzez zapobieganie nadmiernemu tworzeniu się i gromadzeniu w mitochondriach wolnych rodników oraz zmniejszeniu napływu jonów wapniowych do wnętrza mitochondriów. Ochronne właściwości UCP2 opisano również dla kardiomiocytów, które poddano uszkodzeniu nadtlakiem wodoru, wywołującym apoptotyczną śmierć komórek [18].

#### MITOCHONDRIALNY MEGAKANAŁ

Pod wpływem  $\text{Ca}^{2+}$  wewnętrzna błona mitochondriów staje się przepuszczalna dla jonów i substancji osmotycznie czynnych o masie cząsteczkowej poniżej 1500 Da. Prowadzi to do pęcznienia mitochondriów, a nawet do mechanicznego rozerwania ich błony wewnętrznej. Za pęcznienie mitochondriów odpowiedzialna jest aktywacja nieselektywnego kanału o średnicy 2,8 nm, zwanego megakanałem lub PTP (ang. *permeability transition pore*) [64]. Istnieją również doniesienia, które pokazują udział innych czynników w aktywacji megakanału przy niskim stężeniu  $\text{Ca}^{2+}$  we wnętrzu mitochondriów. Zaobserwowano, że pochodna sulfonamocznika - glibenklamid, która jest powszechnie stosowana w terapii cukrzycy typu II, wpływa na aktywację PTP w mitochondriach mięśni szkieletowych [65]. Otwarcie megakanału sprzyja ponadto spadek potencjału elektrycznego, wzrost stężenia nieorganicznych fosforanów w macierzy mitochondrialnej oraz stres oksydacyjny [64]. Zaobserwowano również, że podanie karboksyatraktylozydu (inhibitora translokazy nukleotydowej) od strony cytosolowej kanału sprzyja jego aktywacji [66].

Inhibitorami megakanału są kationy dwuwartościowe takie jak  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$ , nukleotydy: ADP i ATP oraz poliaminy [66]. Również zakwaszenie macierzy mitochondrialnej jest czynnikiem utrzymującym kanał w stanie zamkniętym [64]. Jony wapniowe stanowią istotny czynnik aktywujący megakanał w układach doświadczalnych, natomiast w komórce, oprócz  $\text{Ca}^{2+}$  na modulację aktywności megakanału mogą wpływać również białka z rodziny Bcl-2/Bax oraz obecność związków związanych z metabolizmem lipidów takich jak ceramid i kwas arachidonowy [64]. Zastosowanie, działającego w niskich stężeniach, specyficznego inhibitora PTP – cyklosporyny A (cyklicznego oligopeptydu, będącego czynnikiem immunosupresyjnym), okazało się być przełomem w badaniach mechanizmu aktywacji i budowy megakanału mitochondrialnego. Jedną z hipotez budowy PTP, występującego w miejscach kontaktowych mitochondrialnej błony zewnętrznej i wewnętrznej, zakłada, że jest to kompleks zbudowany z translokazy nukleotydów adeninowych (ANT), zależnego od potencjału kanału anionowego VDAC (ang. *voltage dependent anion channel*)

oraz mitochondrialnej cyklofiliny D (CyP-D) [64]. Istnieją również doniesienia mówiące o udziale heksokinazy, mitochondrialnej kinazy kreatynowej, kinazy glicerolowej, białek pro-apoptycznych Bax oraz anty-apoptycznych Bcl-2 i Bcl-x, i białek receptora benzodiazepinowego w budowie megakanalu [67].

Wykorzystanie techniki inżynierii genetycznej umożliwiło pełniejsze zrozumienie mechanizmu tworzenia i regulacji megakanalu. Wyniki opisanych doświadczeń wskazują, że białko CyP-D nie jest niezbędne do tworzenia PTP, stanowi jednak element, który ułatwia otwarcie megakanalu przez jony wapniowe [64]. Doświadczenia z użyciem modyfikowanych genetycznie zwierząt wskazują na regulatorową funkcję ANT w aktywacji PTP, a obecność translokazy nukleotydów nie jest konieczna do utworzenia megakanalu i nie wpływa również na przebieg apoptozy, zapoczątkowanej pobudzeniem receptorów błonowych [64]. Technika patch-clamp wykazało, że w warunkach *in vitro* ANT może tworzyć kanały o dużym przewodnictwie, zależne od  $Ca^{2+}$ . Otwarcie PTP jest prawdopodobnie bezpośrednio przyczyną umierania neuronów podczas uszkodzenia mózgu [68] oraz komórek mięśnia sercowego, poddanych niedotlenieniu i reperfuzji [69]. Znana jest też rola PTP w dystrofii mięśniowej, wywołanej niedoborem kolagenu VI i w hepatocytach, powodowanych czynnikami nowotworowymi [70]. Wykazano ochronny wpływ inhibitorów PTP, takich jak kwas bonkrekowy i cyklosporyna A (CsA) przed nekrotyczną i apoptotyczną śmiercią komórek [64].

## ZAKOŃCZENIE

W ostatnich kilkunastu latach odkryto kilka kanałów jonowych obecnych w wewnętrznej błonie mitochondrium. Ich fizjologiczna rola nie jest jasna. Zaobserwowano jednak, że kanały potasowe wpływają na pęcznienie macierzy mitochondrialnej, na potencjał elektryczny, poziom produkowanych reaktywnych form tlenu i transport jonów wapnia do wnętrza mitochondriów (Ryc. 4). Wykazano, że aktywacja potasowych kanałów mitochondrialnych zabezpiecza komórki przed skutkami uszkodzenia prowadzącymi do ich nekrotycznej i apoptotycznej śmierci, podczas zawału serca i niedotlenienia mózgu. Pobudziło to intensywne badania farmakologii kanałów mitochondrialnych i powstanie wielu hipotez wiążących mitochondrialne kanały jonowe ze śmiercią komórek.

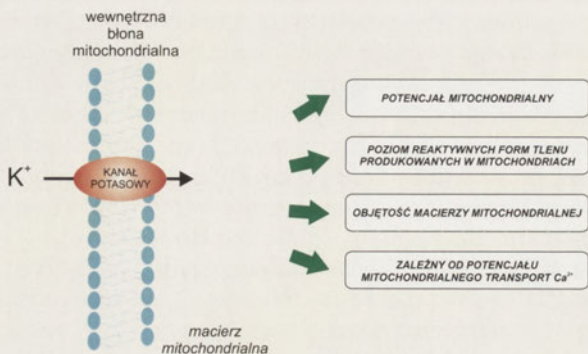
Jedną z hipotez wyjaśniających mechanizm ochrony komórek przed skutkami niedotlenienia i reperfuzji, opiera się na obserwacji regulacji objętości mitochondriów pod wpływem  $K^+$ . Zmiany objętości mitochondriów mogą bowiem wpływać korzystnie na gospodarkę energetyczną komórki. Przypuszcza się także, że wzrost objętości mitochondriów nie dopuszcza do nadmiernego obkurczania się macierzy mitochondrialnej w czasie niedotlenienia, zachowując połączenia pomiędzy mitochondrialną kinazą kreatynową a translokazą nukleotydów adeninowych, co umożliwia przekazywanie energii zgromadzonej w ATP z mitochondriów do cytosolu.

Drugą z hipotez wyjaśniającą mechanizm ochrony komórek przed skutkami niedotlenienia i reperfuzji, opiera się na obserwacji uszkodzeń wynikających z nadmiernej kumulacji  $Ca^{2+}$  we wnętrzu mitochondriów. Podczas niedotlenienia dochodzi do wzrostu stężenia jonów wapniowych w cytosolu komórki. Nadmiar stężenia  $Ca^{2+}$  w środowisku wewnątrzkomórkowym jest obniżany częściowo przez magazynowanie  $Ca^{2+}$  w przedziałach wewnątrzkomórkowych, takich jak siateczka śródplazmatyczna, jądro komórkowe czy mitochondria. Napływ jonów wapniowych do wnętrza mitochondriów jest bardzo efektywny i zachodzi na koszt różnicy potencjału ( $\Delta\psi$ , ujemny w matriks mitochondrialnej) poprzez aktywację uniportera wapniowego. Z kolei nadmiar  $Ca^{2+}$  w macierzy aktywuje megakanal mitochondrialny, którego otwarcie uruchamia szereg reakcji doprowadzających, w konsekwencji, do śmierci komórki. Być może aktywacja kanałów potasowych w błonie wewnętrznej mitochondriów prowadzi do obniżenia  $\Delta\psi$ , przez napływ  $K^+$  do wnętrza. Konsekwencją wzmożonego transportu  $K^+$  do mitochondriów może być zmniejszenie pobierania  $Ca^{2+}$ . W ten sposób dochodzi do ochrony komórki przed uszkodzeniem w czasie niedotlenienia.

Udowodniono również, iż istnieje zależność ochrony kardiomiocytów od uwalniania reaktywnych form tlenu z mitochondriów do cytosolu. Przekazanie sygnału przez podwyższony poziom reaktywnych form tlenu w kardiomiocytach, może prowadzić do aktywacji kinaz białkowych stymulujących kanały potasowe obecne w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

## PIŚMIENNICTWO

1. Szewczyk A, Wojtczak L (2002) Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 54: 104-127
2. Mannella CA (1997) Minireview: on the structure and gating mechanism of the mitochondrial channel, VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 29: 525-531
3. Lemasters JJ, Holmuhamedov E (2006) Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor – thinking outside the box. *Biochim Biophys Acta* 1762: 181-190
4. Cheng EH-Y, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer ST (2003) VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* 301: 513-517
5. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 276: 11615-11623
6. Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC (1999)



Rycina 4. Skutki napływu jonów potasowych do macierzy mitochondrialnej.



- Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 11: 5752-5757
7. Schendel SL, Azimov R, Pawlowski K, Godzik A, Kagan BL, Reed JC (1999) Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, Bid. *J Biol Chem* 274: 21932-21936
  8. Michejda J (1997) Import białek do mitochondriów. *Kosmos* 46: 71-80
  9. Szewczyk A, Mikołajek B, Pikula S, Nałęcz MJ (1993) Potassium channel openers induce mitochondrial matrix volume changes *via* activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *Pol J Pharmacol* 45: 437-443
  10. Czyż A, Szewczyk A, Nałęcz MJ, Wojtczak L (1995) The role of mitochondria potassium fluxes in controlling the protonomotive force in energized mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 210: 98-104
  11. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler PA (1996) The mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem* 271: 8796-8799
  12. Kicińska A, Szewczyk A (2003) Protective effects of the potassium channel opener – diazoxide against injury in neonatal rat ventricular myocytes. *Gen Physiol Biophys* 22: 383-395
  13. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T (1991) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352: 244-247
  14. Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD (1992) Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K<sup>+</sup> channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 267: 26062-26069
  15. Dahlem YA, Horn TF, Buntinas L, Gonoï T, Wolf G, Siemen D (2004) The human mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel is modulated by calcium and nitric oxide: a patch-clamp approach. *Biochim Biophys Acta* 1656: 46-56
  16. Dębska G, Kicińska A, Skalska J, Szewczyk A, May R, Elger CE, Kunz WS (2002) Opening of potassium channels modulates mitochondrial function in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1556: 97-105
  17. Dębska G, May R, Kicińska A, Szewczyk A, Elger CE, Kunz WS (2001) Potassium channel openers depolarize hippocampal mitochondria. *Brain Res* 892: 42-50
  18. Ardehali H (2005) Cytoprotective channels in mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 37: 171-177
  19. Bednarczyk P, Kicińska A, Kominkova V, Ondrias K, Dolowy K, Szewczyk A (2004) Quinine inhibits mitochondria ATP-regulated potassium channel from bovine heart. *J Membr Biol* 199: 63-72
  20. Bednarczyk P, Dolowy K, Szewczyk A (2005) Matrix Mg<sup>2+</sup> regulates mitochondrial ATP dependent potassium channel from heart. *FEBS Lett* 579: 1625-1632
  21. Kulawiak B, Bednarczyk P (2005) Reconstitution of brain mitochondria membrane into planar lipid bilayer. *Acta Neurobiol Exp* 65: 271-276
  22. Szewczyk A, Wójcik G, Nałęcz MJ (1995) Potassium channel opener, RP 66471, induces membrane depolarization of rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 207: 126-132
  23. Grover GJ, Garlid KD (2000) ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 32: 677-695
  24. Neckar J, Szarszoi O, Koten L, Papousek F, Ost'adal B, Grover GJ, Kolar F (2002) Effects of mitochondrial K<sub>ATP</sub> modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc Res* 55: 567-575
  25. Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B, Marban E (2000) Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation* 101: 439-45
  26. Wang Y, Hirai K, Ashraf M (1999) Activation of mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase C activity. *Circ Res* 85: 731-741
  27. Yarov-Yarovoy V, Paucek P, Jaburek M, Garlid KD (1997) The nucleotide regulatory sites on the mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel face the cytosol. *Biochim Biophys Acta* 22: 128-136
  28. Szewczyk A, Czyż A, Nałęcz MJ (1997) ATP-regulated potassium channel blocker, glibenclamide, uncouples mitochondria. *Pol J Pharmacol* 49: 49-52
  29. Szewczyk A, Wójcik G, Lobanov NA, Nałęcz MJ (1999) Modification of the mitochondrial sulfonylurea receptor by thiol reagents. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 255-258
  30. Pang CY, Neligan P, Zhong A, He W, Xu H, Forrest CR (1997) Effector mechanism of adenosine in acute ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol* 273: R887-895
  31. Rajapakse N, Shimizu K, Kis B, Snipes J, Lacza Z, Busija D (2002) Activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels prevents neuronal cell death after ischemia in neonatal rat. *Neurosci Lett* 327: 208-212
  32. Siemen D, Loupatzisz C, Borecky J, Gulbins E, Lang F (1999) Ca<sup>2+</sup>-activated K channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 549-554
  33. Dębska G, Kicińska A, Dobrucki J, Dworakowska B, Nurowska E, Skalska J, Dolowy K, Szewczyk A (2003) Large-conductance K<sup>+</sup> channel openers NS1619 and NS004 as inhibitor of mitochondria function in glioma cells. *Biochem Pharmacol* 65: 1827-1834
  34. Kicińska A, Szewczyk A (2004) Large-conductance K<sup>+</sup> channel opener NS1619 inhibits cardiac mitochondria respiratory chain. *Toxicol Mech Methods* 14: 59-61
  35. Kicińska A, Skalska J, Szewczyk A (2004a) A large-conductance K<sup>+</sup> channel openers and mitochondria. *Toxicol Mech Methods* 14: 63-65
  36. Xu W, Liu Y, Wang S, McDonald T, Van Eyk JE, Sidor A, O'Rourke B (2002) Cytoprotective role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* 298: 1029-1033
  37. Stowe DF, Aldakkak M, Camara AK, Riess ML, Heinen A, Varadarajan SG, Jiang MT (2006) Cardiac mitochondrial preconditioning by big Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel opening requires superoxide radical generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H434-H440
  38. Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H. (2005) Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation* 111: 198-203
  39. Ohya S, Kuwata Y, Sakamoto K, Muraki K, Imaizumi Y (2005) Cardioprotective effects of estradiol include the activation of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H1635-H1642
  40. Lovell P, McCobb DP (2001) Pituitary control of BK potassium channel function and intrinsic firing properties of adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 21: 3429-3442
  41. Szabo I, Bock J, Jekle A, Soddemann M, Adams C, Lang F, Zoratti M, Gulbins E (2005) A novel potassium channel in lymphocyte mitochondria. *J Biol Chem* 280: 12790-12798
  42. Garcia-Calvo M, Leonard RJ, Novicki J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1993) Purification, characterization and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J Biol Chem* 268: 18866-18874
  43. Beeton C, Barbaria J, Giraud P, Devaux F, Benoliel AM, Gola M, Sabatier JM, Bernard D, Crest M, Beraud E (2001) Selective blocking of voltage-gated K<sup>+</sup> channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *J Immunol* 166: 936-944
  44. Bock J, Szabo I, Jekle A, Gulbins E (2002) Actinomycin D-induced apoptosis involves the potassium channel Kv1.3. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 526-531
  45. Lurin C, Guclu J, Cheniclet C, Carde JP, Barbier-Brygoo H, Maurel C (2000) CLC-Nt1, a putative chloride channel protein of tobacco, co-localizes with mitochondrial membrane markers. *Biochem J* 348: 291-295
  46. Dębska G, Kicińska A, Skalska J, Szewczyk A (2001) Intracellular potassium and chloride channels: an update. *Acta Biochim Polon* 48: 137-144
  47. Kicińska A, Dębska G, Kunz W, Szewczyk A (2000) Mitochondrial potassium and chloride channels. *Acta Biochim Polon* 47: 541-551

48. Fernandez-Salas E, Sagar M, Cheng C, Yuspa SH (1999) p53 and tumor necrosis factor alpha regulate the expression of a mitochondrial chloride channel protein. *J Biol Chem* 274: 36488-36497
49. Fernandez-Salas E, Suh KS, Speransky VV, Bowers WL, Levy JM, Adams T, Pathak KR, Edwards LE, Hayes DD, Cheng Ch, Steven AC, Weinberg WC, Yuspa SH (2002) mtCLIC/CLIC4, an organellar chloride channel protein, is increased by DNA damage and participates in the apoptotic response to p53. *Mol Cell Biol* 22: 3610-3620
50. Gunter TE, Pfeiffer DR (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 258: C755-C782
51. Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427: 360-364
52. Kasparinsky FO, Vinogradov AD (1996) Slow Ca<sup>2+</sup>-induced inactive/active transition of the energy-dependent Ca<sup>2+</sup> transporting system of rat liver mitochondria: clue for Ca<sup>2+</sup> influx cooperativity. *FEBS Lett* 389: 293-296
53. Kapus A, Szaszi K, Kaldi K, Ligeti E, Fonyo A (1991) Is mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter a voltage-modulated transport pathway? *FEBS Lett* 282: 61-64
54. Belous A, Wakata A, Knox CD, Nicoud IB, Pierce J, Anderson CD, Pinson CW, Charis RS (2004) Mitochondrial P2Y-Like receptors link cytosolic adenosine nucleotides to mitochondrial calcium uptake. *J Cell Biochem* 92: 1062-1073
55. Salvi M, Toninello A (2004) Effects of polyamines on mitochondrial Ca(2+) transport. *Biochim Biophys Acta* 1661: 113-124
56. Montero M, Lonaton CD, Hernandez-Sanmiguel E, Santodomingo J, Vay L, Moreno A, Alvarez J (2004) Direct activation of the mitochondrial calcium uniporter by natural plant flavonoids. *Biochem J* 384: 19-24
57. Bernardi P (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79: 1127-1155
58. Sparagna GS, Gunter KK, Sheu SS, Gunter TE (1995) Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *J Biol Chem* 270: 27510-27515
59. Kolisek M, Zsurka G, Samaj J, Weghuber J, Schweyen R, Schweigel M (2003) Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg<sup>2+</sup> influx system in mitochondria. *EMBO J* 22: 1235-1244
60. Beavis AD, Davatol-Hag H (1996) The mitochondrial inner membrane anion channel is inhibited by DIDS. *J Bioenerg Biomembr* 28: 207-214
61. Borecky J, Jezek P, Siemen D (1997) 108-pS channel in brown fat mitochondria might be identical to the inner membrane anion channel. *J Biol Chem* 272: 19282-19289
62. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT (1998) Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 273: 18092-18098
63. Aon MA, Cortassa S, Marban E, O'Rourke B (2003) Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 278: 44735-44744
64. Forte M, Bernardi P (2005) Genetic Dissection of the permeability Transition Pore. *J Bioenerg Biomembr* 37: 121-127
65. Skalska J, Dębska G, Kunz WS, Szewczyk A (2005) Antidiabetic sulphonylureas activate mitochondrial permeability transition in rat skeletal muscle. *Br J Pharmacol* 145: 785-791
66. Zoratti M, Szabo L (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241: 139-176
67. Crompton M (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341: 233-249
68. Matsumoto S, Isshiki A, Watanabe Y, Wieloch T (2002) Restricted clinical efficacy of cyclosporin A on rat transient middle cerebral artery occlusion. *Life Sci* 72: 591-600
69. Di Lisa F, Menado R, Barile M, Bernardi P (2001) Opening of the permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD<sup>+</sup> and is causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* 276: 2571-2575
70. Soriano ME, Nicolosi L, Bernardi P (2004) Desensitization of the permeability transition pore by cyclosporin A prevents activation of the mitochondrial apoptotic pathway and liver damage by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Biol Chem* 279: 36803-36808

## Mitochondrial ion channels

Jolanta Skalska<sup>1</sup>, Grażyna Dębska-Vielhaber<sup>3</sup>, Marta Głąb<sup>1</sup>, Bogusz Kulawiak<sup>1</sup>, Dominika Malińska<sup>1</sup>, Izabela Koszela-Piotrowska<sup>1</sup>, Piotr Bednarczyk<sup>2</sup>, Krzysztof Dołowy<sup>2</sup>, Adam Szewczyk<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Intracellular Ion Channels, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur St., 02-093 Warszawa, Poland

<sup>2</sup>Department of Biophysics, Agriculture University SGGW, 159 Nowoursynowska St., 02-776 Warszawa, Poland

<sup>3</sup>Department of Neurology II, University of Magdeburg Medical Center, Leipziger Strasse 44, D-39120 Magdeburg, Germany

✉e-mail: a.szewczyk@nencki.gov.pl

### ABSTRACT

Ion channels are proteins, which facilitate the ions flow through biological membranes. In recent years the structure as well as the function of the plasma membrane ion channels have been well investigated. The knowledge of intracellular ion channels however is still poor. Up till now, the calcium channel described in endoplasmatic reticulum and mitochondrial porine are the examples of intracellular ion channels, which have been well characterized. The mitochondrial potassium channels: regulated by ATP (mitoK<sub>ATP</sub>) and of big conductance activated by Ca<sup>2+</sup> (mitoBK<sub>Ca</sub>), which were described in inner mitochondrial membrane, play a key role in the protection of heart muscle against ischemia. In this review the last date concerning the mitochondrial ion channels as well as they function in cell metabolism have been presented.

# Rola mitochondriów w wytwarzaniu i usuwaniu reaktywnych form tlenu; związek z przesyłaniem sygnałów i programowaną śmiercią komórki

## STRESZCZENIE

Mitochondria są głównym źródłem reaktywnych form tlenu (RFT) w komórce eukariotycznej. Reaktywne formy tlenu powstają jako produkt uboczny metabolizmu tlenowego lub w warunkach stresu oksydacyjnego. Za główne miejsca produkcji RFT uważane są nośniki elektronów mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Źródłem RFT mogą być także enzymy rozmieszczone w różnych przedziałach mitochondriów. Reaktywne formy tlenu mogą prowadzić do licznych zmian struktury i funkcji ważnych dla komórki związków biologicznych. Uszkodzeniu ulegają przede wszystkim białka, lipidy i kwasy nukleinowe, które w wyniku utlenienia tracą swe właściwości biologiczne, co może prowadzić do śmierci komórki. Mitochondria, które są niezwykle narażone na szkodliwe działanie RFT, wytworzyły szereg mechanizmów chroniących je przed stresem oksydacyjnym. Mitochondrialne mechanizmy obronne zmniejszają produkcję RFT (pierwsza linia obrony), bądź usuwają już wytworzone RFT (druga linia obrony) i tym samym minimalizują skutki ich działania. W mitochondrialnej obronie antyoksydacyjnej uczestniczą zarówno białka obniżające produkcję RFT, białka enzymatyczne bezpośrednio reagujące z RFT, jak i niskocząsteczkowe antyoksydanty i białka nieenzymatyczne, usuwające te RFT i ich pochodne, które uniknęły działania obronnego systemu enzymatycznego. Mitochondrialne RFT pełnią rolę cząsteczek sygnałowych oraz modyfikują działanie wielu szlaków przesyłania informacji, wywołując zmiany metabolizmu w różnych przedziałach komórki. Jednym z procesów, w którym istotną rolę pełnią mitochondria i sygnalizacja z udziałem RFT jest programowana śmierć komórki.

## WPROWADZENIE

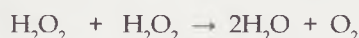
Pojawienie się na Ziemi pierwszych organizmów fotosyntetyzujących już ponad 3,5 miliarda lat temu wywarło ogromny wpływ na pojawienie się tlenu w atmosferze ziemskiej i wykształcenie korzystnych form generowania energii z wykorzystaniem błon biologicznych. Jednak wiadomo, że mimo korzyści wynikających z życiodajnej roli cząsteczki tlenu, jest ona również źródłem szkodliwych cząsteczek zwanych reaktywnymi formami tlenu (RFT). Cząsteczka tlenu może ulegać pełnej redukcji do cząsteczki wody, co ma miejsce w czasie oddychania, jak również może ulegać stopniowej jednoelektronowej redukcji z wytworzeniem RFT. Reaktywne formy tlenu powstają nieustannie jako produkt uboczny metabolizmu tlenowego, uszkadzając składniki budulcowe komórki. Jest to cena, jaką poniosły organizmy za życie w atmosferze bogatej w tlen i wykorzystywanie jego cząsteczek do produkcji dużych ilości energii.

Niektóre RFT mają charakter wolnych rodników, tzn. cząsteczek zawierających jeden niesparowany elektron [1, 2]. W wyniku przyjęcia przez cząsteczkę tlenu jednego elektronu powstaje anionorodnik nadadtlenkowy (ang. *superoxide anion*,  $O_2^{\cdot-}$ ), cząsteczka nietrwała i reagująca ze znacznie większą liczbą substancji niż tlen. Cząsteczka anionorodnika nadadtlenkowego ulega reakcji dysmutacji (dysproporcjonowania), której produktami są tlen i nadtlenek wodoru:



### Wzór 1. Reakcja dysmutacji anionorodnika nadadtlenkowego

Reakcja ta może zachodzić spontanicznie, jak również może być katalizowana przez enzym dysmutazę nadadtlenkową (SOD). Powstający w reakcji dysmutacji nadtlenek wodoru nie jest wolnym rodnikiem. Jest to związek względnie stabilny i może również podlegać reakcji dysmutacji z wytworzeniem tlenu i wody:



### Wzór 2. Reakcja dysmutacji nadadtlenku wodoru

Mimo, że cząsteczka nadadtlenku wodoru nie jest tak reaktywna jak  $O_2^{\cdot-}$ , ma jednak zdolność utleniania jonów metali przejściowych, m.in. żelaza, miedzi, niklu, chromu, a produktem tej reakcji jest rodnik hydroksylowy (ang. *hydroxyl radical*,  $\cdot OH$ ) [1]:

Małgorzata Czarna

Wiesława Jarmuszkiewicz<sup>✉</sup>

Zakład Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

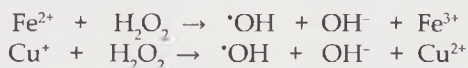
<sup>✉</sup> Zakład Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań; e-mail: wiesiaj@amu.edu.pl, tel. (061) 829 45 31; faks: (061) 829 45 18

Artykuł otrzymano 5 września 2005 r.  
Artykuł zaakceptowano 4 października 2005 r.

**Słowa kluczowe:** mitochondria, reaktywne formy tlenu, system antyoksydacyjny, programowana śmierć komórki

**Wykaz skrótów:** AOX (ang. *alternative oxidase*) – oksydaza alternatywna; CAT (ang. *catalase*) – katalaza; GPx (ang. *glutathione peroxidase*) – peroksydaza glutationowa; GSH (ang. *glutathione*) – glutation ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycyna), forma utleniona; mtNOS (ang. *mitochondrial nitric oxide synthase*) – mitochondrialna syntaza tlenku azotu;  $\cdot NO$  (ang. *nitric oxide*) – tlenek azotu; ONOO $\cdot$  (ang. *peroxynitrite*) – nadtle-noazotyn;  $O_2^{\cdot-}$  (ang. *superoxide anion*)- anionorodnik nadadtlenkowy;  $\cdot OH$  (ang. *hydroxyl radical*)- rodnik hydroksylowy; PCD (ang. *programmed cell death*) – programowana śmierć komórki; PHGPx (ang. *phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*) – peroksydaza glutationowa wodoronadtlenków fosfolipidów; Prx (ang. *peroxiredoxine*) – peroksyredoksyna; RFT- reaktywne formy tlenu; SOD (ang. *superoxide dismutase*) – dysmutaza nadadtlenkowa; Trx (ang. *thioredoxin*) – tioredoksyna; UCP (ang. *uncoupling protein*) – białko rozprzegające; Q – ubiquinon, koenzym Q

**Podziękowania:** Praca powstała w trakcie realizacji projektu promotorskiego MNiI (0480/PO4/2005/29) oraz projektu własnego finansowanego z funduszy Dziekana Wydziału Biologii UAM



### Wzór 3. Reakcja Fentona

Ta przedstawiona w sposób znacznie uproszczony reakcja utleniania jonów metali, zwana jest reakcją Fentona i jest źródłem najbardziej reaktywnej formy tlenu w układach biologicznych ( $\cdot\text{OH}$ ), która reaguje niemal ze wszystkimi cząsteczkami organicznymi, prowadząc do uszkodzeń strukturalnych i funkcjonalnych komórki [1,2].

Do RFT charakteryzującymi się silnymi właściwościami utleniającymi zalicza się również tlenowe związki azotu. Do takich związków należą m.in. tlenek azotu (ang. *nitric oxide*,  $\cdot\text{NO}$ ), wolny rodnik syntetyzowany z udziałem mitochondrialnej syntazy tlenu azotu (mtNOS, ang. *mitochondrial nitric oxide synthase*) oraz nadtlenoazotyn (ang. *peroxynitrite*,  $\text{ONOO}^-$ ), reaktywna forma tlenu powstająca w wyniku reakcji anionorodnika ponadtlenkowego z tlenkiem azotu [1]:



### Wzór 4. Reakcja syntezy nadtlenoazotynu

Reaktywne formy tlenu powstają nieustannie w czasie wielu tlenowych procesów metabolicznych zachodzących w mitochondriach, chloroplastach, peroksysomach, błonie komórkowej, apoplasmie, natomiast ich zwiększona produkcja zachodzi pod wpływem różnorodnych stresów środowiskowych, takich jak niska i wysoka temperatura, promieniowanie nadfioletowe, jonizujące, ultradźwięki, zasolenie,

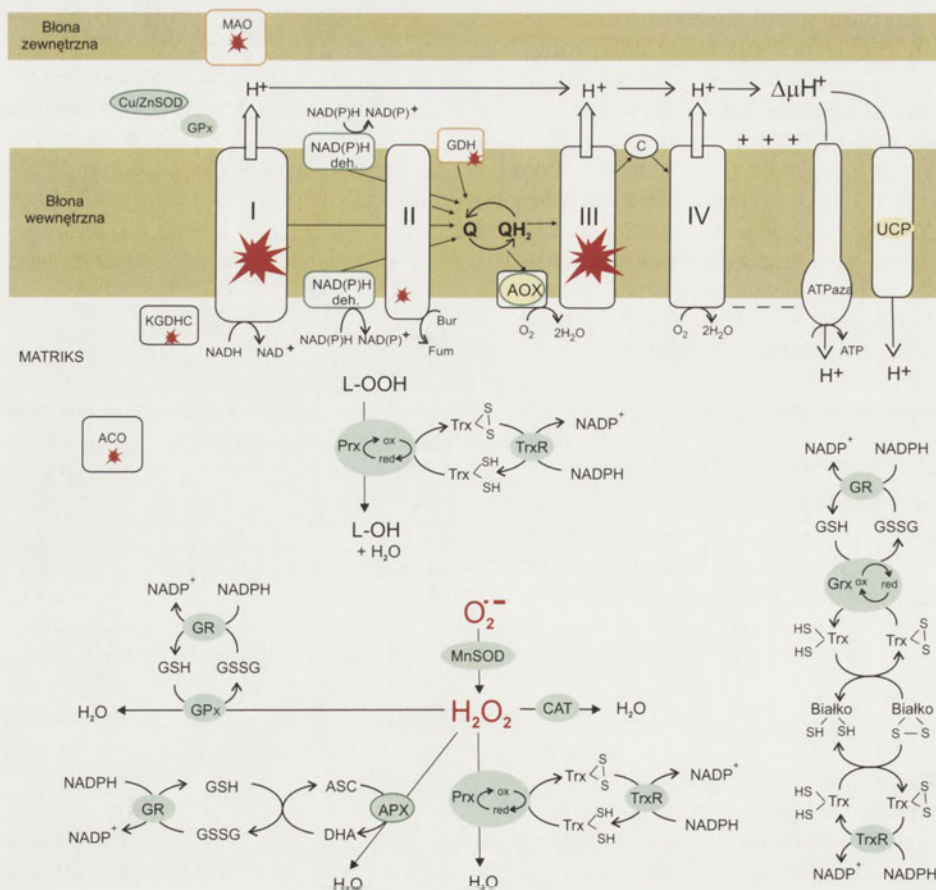
obecność jonów metali ciężkich, ksenobiotyków, czy atak patogenów [1,3].

## MITOCHONDRIA JAKO GŁÓWNY OŚRODEK PRODUKCJI REAKTYWNYCH FORM TLENU

Mitochondria znajdują się niemal we wszystkich komórkach eukariotycznych u zwierząt, roślin, czy u jednokomórkowych mikroorganizmów. Są to organelle tworzone przez dwie błony, zewnętrzną i wewnętrzną, oddzielające przedziały mitochondrialne: wewnątrz mitochondrium, zwane macierzą mitochondrialną, oraz zawartą pomiędzy błonami przestrzeń międzybłonową. Mitochondria są głównym źródłem RFT w komórce eukariotycznej. Reaktywne formy tlenu powstają jako produkt uboczny metabolizmu tlenowego lub w warunkach stresu oksydacyjnego. Za główne miejsca produkcji RFT uważane są transportujące elektrony białka mitochondrialnego łańcucha oddechowego oraz niektóre enzymy błony zewnętrznej i macierzy mitochondrialnej (Ryc. 1).

## MITOCHONDRIALNY ŁAŃCUCH ODDECHOWY

Najważniejszą funkcją mitochondriów jest produkcja ATP, cząsteczki bogatej w energię. Uzyskanie energii odbywa się dzięki utlenianiu w obecności tlenu zredukowanych substratów energetycznych pochodzących z pokarmu. W wewnętrznej błonie mitochondrialnej zlokalizowane są enzymy biorące udział w transporcie elektronów ze zredukowanych substratów do tlenu z wytworzeniem wody oraz syntaza ATP, enzym syntetyzujący ATP [4]. Białka przenoszące elektrony zorganizowane są w cztery duże



**Rycina 1.** Mitochondria: łańcuch transportu elektronów, niektóre miejsca powstawania RFT (zaznaczone czerwonymi gwiazdami) oraz niektóre enzymy systemu antyoksydacyjnego (pierwsza linia obrony – żółte elipsy, druga linia obrony – zielone elipsy). Białka roślinne (i mikroorganizmów o roślinnym typie łańcucha oddechowego) nie występujące u zwierząt zaznaczono ciemnozieloną obwódką. Enzymy, których rolę w wytwarzaniu RFT stwierdzono w mitochondriach zwierząt zaznaczono pomarańczową obwódką. ACO – akonitaza; KGDHC, kompleks dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej; AOX – oksydaza alternatywna; APX – peroksydaza askorbinianowa; ASC – askorbinian; ATPaza – syntaza ATP; c – cytochrom c; CAT – katalaza; Cu/ZnSOD – miedziowo/cynkowa dysmutaza ponadtlenkowa; DHA, dehydroaskorbinian; GPx – peroksydaza glutationowa; GR, reduktaza glutationowa; Grx – glutaredoksyna (ox – z utlenionymi do -SS- grupami -SH, red – z wolnymi grupami -SH); GSH – glutation, forma zredukowana; GSSG – glutation, forma utleniona; L-OOH, wodoronadtlenek lipidu; L-OH, hydroksylipid; MAO – oksydaza monoaminowa; MnSOD – manganowa dysmutaza ponadtlenkowa;  $\text{O}_2^{\cdot-}$  – anionorodnik ponadtlenkowy; Prx – peroksyredoksyna (ox – z utlenionymi do -SS- grupami -SH, red – z wolnymi grupami -SH); Trx – tioredoksyna (z uwzględnieniem zmian redox grupy -SH; TrxR – reduktaza tioredoksyny; UCP – białko rozprzegające; Q – ubichinon;  $\text{QH}_2$  – ubichinol (zredukowany Q);  $\Delta\mu\text{H}^+$ , protonowy gradient elektrochemiczny; I, II, III, IV – kolejne kompleksy łańcucha oddechowego.

kompleksy enzymatyczne tworzące tzw. mitochondrialny łańcuch transportu elektronów (Ryc. 1). Utworzony jest on przez dehydrogenazę NADH (kompleks I), dehydrogenazę bursztynianową (kompleks II), kompleks cytochromów *bc<sub>1</sub>* (kompleks III) oraz oksydazę cytochromową (kompleks IV). Kompleksy te zawierają jony Fe i S, tworzące centra żelazo-siarkowe, jony Cu oraz koenzymy (np. mononukleotyd flavinowy – FMN, dinukleotyd flavinoadeninowy – FAD, lub ubichinon – Q) pełniące rolę centrów oksydoredukcyjnych. Poza kompleksami enzymatycznymi w skład mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów wchodzi również dwa ruchome przENOŚniki elektronów, ubichinon, zwany koenzymem Q, odbierający elektrony z kompleksów I i II oraz cytochrom *c*, małe peryferyczne białko, przekazujące elektrony na kompleks IV. Trzy enzymatyczne kompleksy (I, III i IV), obok funkcji transportu elektronów, są również miejscami pompowania protonów. W czasie przepływu elektronów przez łańcuch oddechowy wytwarzana jest energia wykorzystana do pompowania poprzez te kompleksy protonów z macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej. W rezultacie w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej zostaje utworzony elektrochemiczny gradient protonowy (złożony z potencjału błonowego,  $\Delta\Psi$ , oraz różnicy pH,  $\Delta\text{pH}$ ), który następnie jest wykorzystywany do syntezy ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej z udziałem syntazy ATP.

Jak już wspomniano, elektrony pochodzące z substratów oddechowych przekazywane są poprzez enzymy mitochondrialnego łańcucha oddechowego do tlenu, wraz ze wzrastającym potencjałem oksydoredukcyjnym, z wytworzeniem cząsteczki wody. Przepływ elektronów przez białka transportujące elektrony nie jest jednak zupełnie szczelny, gdyż mogą one „przeciekać” i reagować z cząsteczką tlenu z wytworzeniem anionorodnika ponadtlenkowego [1,2,5]. Kompleksy I i III łańcucha oddechowego uczestniczą w przemianach oksydoredukcyjnych ubichinonu, w których występuje niestabilna forma rodnikowa (ubisemichinon) odpowiedzialna za „przeciek” elektronów z tych kompleksów, prowadząca do wytworzenia RFT.

#### DEHYDROGENAZA NADH I KOMPLEKS *bc<sub>1</sub>*, JAKO GŁÓWNE ŹRÓDŁA REAKTYWNYCH FORM TLENU W MITOCHONDRiach

**Kompleks I.** Głównym miejscem produkcji anionorodnika ponadtlenkowego jest kompleks I łańcucha oddechowego (dehydrogenaza NADH) [2,5]. Zaproponowano trzy główne rodzaje produkcji RFT przy udziale kompleksu I [5]: poprzez tzw. odwrotny transport elektronów (ang. *reverse electron transfer*), produkcję indukowaną przez rotenon (inhibitor kompleksu I) oraz produkcję zachodzącą podczas prawidłowego funkcjonowania łańcucha oddechowego (bez inhibitorów kompleksu I). Drugi i trzeci mechanizm dotyczą transportu elektronów „do przodu” (ang. *forward electron transport*), tj. z substratów zależnych od  $\text{NAD}^+$  na kompleks I.

Największą produkcję anionorodnika ponadtlenkowego zaobserwowano podczas odwrotnego transportu elektronów z bursztynianu na  $\text{NAD}^+$  [2,5]. Proces ten polega na przenoszeniu elektronów wbrew potencjałowi oksydoredukcyjnemu przENOŚników elektronów łańcucha oddechowego

z bursztynianu, substratu oddechowego oddającego elektrony na kompleks II, poprzez zredukowany koenzym Q do  $\text{NAD}^+$ , a nie w kierunku oksydazy cytochromowej i cząsteczki tlenu [2,5]. Ten termodynamicznie niekorzystny proces musi być sprzężony z wykorzystaniem energii elektrochemicznego gradientu protonowego (wytwarzanego przez kompleksy III i IV) oraz wymaga dla zredukowania koenzymu Q substratów kompleksu II (np. bursztynianu lub  $\alpha$ -glicerofosforanu) oraz  $\text{FADH}_2$ . A zatem, zarówno redukcja  $\text{NAD}^+$ , jak i produkcja RFT, wymagają wysokiego potencjału błonowego istniejącego w niefosforylującym stanie oddechowym (w tzw. stanie 4, przy braku ADP). Natomiast zmniejszenie potencjału błonowego podczas fosforylującego stanu oddechowego (stanu 3), podczas pobierania przez mitochondria jonów  $\text{Ca}^{2+}$  lub pod wpływem działania związków rozprzęgających, prowadzi do znacznego obniżenia poziomu produkcji RFT [5]. Skoro proces odwrotnego transportu elektronów wymaga wysokiego potencjału błonowego, to produkcja RFT jest regulowana przez jego zmiany. Okazuje się, że już 10% spadek wartości potencjału błonowego hamuje produkcję RFT aż w 90%. Zaobserwowano również, że przypisywana kompleksowi I produkcja RFT przez cząstki submitochondrialne jest wyższa w alkalicznym pH [5-7], zaś zakwaszenie środowiska macierzy mitochondrialnej obniża poziom produkcji RFT przez izolowane mitochondria [8]. Produkcja RFT przez kompleks I podczas odwrotnego transportu elektronów jest prawie całkowicie hamowana przez rotenon (inhibitor kompleksu I), który hamuje przepływ elektronów z koenzymu Q do tego kompleksu [6,9-11].

Produkcję RFT indukowaną przez rotenon zaobserwowano w przypadku izolowanych mitochondriów bądź cząstek submitochondrialnych utleniających substraty oddechowe zależne od  $\text{NAD}^+$  (np. pirogronian, glutaminian plus jabłczan) i poddanych działaniu rotenonu [5,6]. W nienaruszonych mitochondriach indukowana przez rotenon produkcja anionorodnika ponadtlenkowego wymaga bardzo wysokiego stopnia redukcji przENOŚników elektronów w obrębie kompleksu I, powyżej miejsca wiązania rotenonu. Proces produkcji RFT w obecności substratów zależnych od  $\text{NAD}^+$  nie jest regulowany przez zmiany potencjału błonowego, gdyż zahamowanie kompleksu I ostatecznie prowadzi do rozproszenia potencjału błonowego.

Dane doświadczalne wskazują na jeszcze jeden mechanizm syntezy RFT przez kompleks I zachodzący podczas prawidłowego funkcjonowania łańcucha oddechowego w obecności substratów oddechowych tego kompleksu i  $\text{NAD}^+$  [5,12]. W obecności substratów zależnych od  $\text{NAD}^+$ , przy braku inhibitorów kompleksu I, produkcja anionorodnika ponadtlenkowego stymulowana jest przez wysoki potencjał błonowy, jak również wysoki stopień redukcji przENOŚników elektronów w sąsiedztwie kompleksu I. Jednak w porównaniu z odwrotnym transportem elektronów, w mechanizmie tym, zależność produkcji RFT od różnicy potencjału po obu stronach wewnętrznej błony nie jest tak znacząca, gdyż proces ten jest bardziej korzystny termodynamicznie.

Przypuszcza się, że produkcja anionorodnika ponadtlenkowego przez kompleks I zachodzi przede wszystkim od

strony macierzy wewnętrznej błony mitochondrialnej [13-15]. Nie jest pewne, który z komponentów kompleksu I odpowiedzialny jest za produkcję anionorodnika ponadtlenkowego. Wydaje się jednak, że każdy element transportu elektronów w obrębie kompleksu I (tj. FMN, centra żelazo-siarkowe, czy Q) jest potencjalnym miejscem syntezy  $O_2^{\cdot-}$  [6,9,13,16,17].

**Kompleks III.** Kolejnym miejscem łańcucha oddechowego, odpowiedzialnym za produkcję anionorodnika ponadtlenkowego jest kompleks  $bc_1$ , zwany kompleksem III. Kompleks ten odpowiedzialny jest za utlenianie koenzymu Q (formy zredukowanej,  $QH_2$ ), z wykorzystaniem cytochromu  $c$  jako akceptora elektronów. Głównym miejscem syntezy  $O_2^{\cdot-}$  w obrębie kompleksu III jest centrum  $Q_o$ , hamowane przez myksotiazol. W miejscu tym, w tzw. cyklu Q powstaje bardzo niestabilna forma ubichinonu, ubisemichinon ( $Q^{\cdot-}$ ), która najprawdopodobniej jest odpowiedzialna za formowanie anionorodnika ponadtlenkowego [17]. Zwiększenie produkcji anionorodnika ponadtlenkowego zachodzi w obecności inhibitora kompleksu III, antymycyny A [2,5,14]. Inhibitor ten, wiążąc się w miejscu  $Q_i$  kompleksu III, uniemożliwia przeniesienie elektronu z ubisemichinonu zlokalizowanego w miejscu  $Q_o$  i tym samym przyczynia się do akumulacji niestabilnego ubisemichinonu. Najprawdopodobniej anionorodnik ponadtlenkowy produkowany jest po obu stronach centrum  $Q_o$ , czyli zarówno od strony macierzy, jak i od cytosolowej strony wewnętrznej błony mitochondrialnej [2,5,15,18].

Z kolei inne inhibitory kompleksu III, myksotiazol i stygmatelina, wiążąc się z miejscem  $Q_o$ , uniemożliwiają formowanie się  $Q^{\cdot-}$  zarówno poprzez bezpośrednie zablokowanie wiązania zredukowanej formy ubichinonu ( $QH_2$ ) z miejscem  $Q_o$  (myksotiazol), jak i zahamowanie transportu elektronu z  $QH_2$  na centrum żelazo-siarkowe (stygmatelina) [5]. Inhibitory te, w przeciwieństwie do antymycyny A, hamują tworzenie się  $O_2^{\cdot-}$  [2,5,14,15].

#### POZOSTAŁE MIEJSCA POWSTAWANIA REAKTYWNYCH FORM TLENU W MITOCHONDRiach

Źródłem RFT w mitochondriach są nie tylko białka łańcucha transportu elektronów, ale również inne białka zlokalizowane w błonie wewnętrznej, a także białka błony zewnętrznej, jak i macierzy mitochondrialnej (Ryc. 1).

Z pozostałych kompleksów mitochondrialnego łańcucha oddechowego, również **dehydrogenaza bursztynianowa** (kompleks II, EC 1.3.5.1) może produkować w obecności inhibitorów tego kompleksu anionorodnik ponadtlenkowy, choć produkcja ta nie jest znacząca [19, 20]. Enzym ten, zlokalizowany w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, utlenia bursztynian do fumaranu używając koenzymu Q jako akceptora elektronów. Izolowane białko dehydrogenazy bursztynianowej po wprowadzeniu do liposomów może produkować RFT, prawdopodobnie poprzez FAD, zredukowany przy braku akceptora elektronów [5].

Innym miejscem produkcji anionorodnika ponadtlenkowego jest **dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa** (EC 1.3.5.1), enzym zlokalizowany na zewnętrznej powierzchni wewnętrznej błony mitochondrialnej, utleniający glicerolo-

3-fosforan do fosfodihydroksyacetonu, przy jednoczesnej redukcji FAD do  $FADH_2$ , a następnie wykorzystujący koenzym Q jako akceptor elektronów. Reakcja ta jest elementem metabolizmu lipidów w mitochondriach zwierzęcych oraz częścią tzw. czółenka glicerolo-fosforanu, służącego regeneracji cytosolowego  $NAD^+$  z  $NADH$  pochodzącego z glikolizy. Dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanu produkuje  $O_2^{\cdot-}$  głównie od cytosolowej strony wewnętrznej błony mitochondrialnej [15,21]. U ssaków enzym ten występuje jedynie w brunatnej tkance tłuszczowej i mózgu, gdzie jest potencjalnie ważnym miejscem produkcji RFT [2]. Ponadto, dwa inne enzymy związane z utlenianiem kwasów tłuszczowych, **flawoproteina przenosząca elektrony** (ang. *electron transport flavoprotein*) oraz **jej oksydoreduktaza** (ang. *electron transfer flavoprotein quinone oxidoreductase*), są potencjalnymi miejscami produkcji  $O_2^{\cdot-}$  od strony macierzy mitochondrialnej, przynajmniej w przypadku mitochondriów zwierząt [14].

W zewnętrznej błonie mitochondrialnej wielu tkanek ssaków zlokalizowana jest **oksydaza monoaminowa** (ang. *monoamine oxidase*, MAO-A i MAO-B, EC 1.4.3.4), enzym katalizujący utlenianie biogennych amin, czemu towarzyszy uwalnianie nadtlenu wodoru [5]. Oksydaza monoaminowa mitochondriów mózgu odgrywa centralną rolę w przemianach neuroprzekaźników monoaminowych. Możliwość produkcji  $H_2O_2$  przez oksydazę monoaminową znacznie przewyższa produkowanie tej reaktywnej formy tlenu przez inne enzymy mitochondrialne. Dzieje się tak m. in. w mitochondriach mózgu szczura, gdzie utlenianiu tyraminy towarzyszy uwalnianie  $H_2O_2$  z prędkością 50 razy większą w porównaniu z produkcją nadtlenu wodoru przez kompleks III w obecności antymycyny A [22]. Oksydaza monoaminowa może być głównym źródłem  $H_2O_2$  w tkankach w czasie niedokrwienia, starzenia, czy utleniania egzogennych amin [5]. Podejrzewa się, że podwyższony poziom  $H_2O_2$ , wywołany przez zwiększoną aktywność oksydazy, może być odpowiedzialny za uszkodzenia mitochondriów w czasie choroby Parkinsona.

W macierzy mitochondrialnej znajduje się **akonitaza** (EC 4.2.1.3), enzym katalizujący w cyklu kwasów trikarboksylowych utworzenie izocytrynianu z cytrynianu. Enzym ten ulega inaktywacji przez anionorodnik ponadtlenkowy w wyniku utlenienia jego centrum żelazo-siarkowego [23]. Tak zinktywowana wyizolowana akonitaza jest źródłem rodnika hydroksylowego, w tworzeniu którego prawdopodobnie uczestniczy uwolniony jon  $Fe^{2+}$  [24].

Innym miejscem cyklu kwasów trikarboksylowych, odpowiedzialnym za wytwarzanie RFT jest **kompleks dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej**, zlokalizowany w macierzy przy wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Kompleks ten katalizuje utlenienie 2-oksoglutaranu do sukcyńlo-CoA z wykorzystaniem  $NAD^+$  jako akceptora elektronów. Niedawno wykazano, że kompleks dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej w izolowanych mitochondriach mózgu myszy oraz wyizolowane i oczyszczone enzymy kompleksu z mitochondriów serca wołu mogą generować anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru [25,26]. Produkcja RFT przez kompleks dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej jest

najprawdopodobniej wynikiem małej dostępności jego naturalnego akceptora elektronów,  $\text{NAD}^+$  [25,26].

Z błoną wewnętrzną mitochondrium związany jest enzym syntetyzujący tlenek azotu ( $\cdot\text{NO}$ ), syntaza tlenu azotu (mtNOS). Ta mitochondrialna izoforma enzymu wytwarza  $\cdot\text{NO}$  z aminokwasu L-argininy w sposób zależny od stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w macierzy mitochondrialnej zwiększa aktywność mtNOS) [27]. Powstały tlenek azotu jest cząsteczką niezwykle reaktywną, reagującą m.in. z białkami zawierającymi grupy hemowe, tiolowe i centra żelazo-siarkowe [1].  $\cdot\text{NO}$  wiążąc się z oksydazą cytochromową łańcucha oddechowego, blokuje przyłączanie tlenu do tego enzymu, a tym samym hamuje przepływ elektronów i obniża syntezę ATP [27].

Tlenek azotu ma zdolność reagowania z anionorodnikiem ponadtlenkowym, tworząc nadtlendioazotyn ( $\text{ONOO}^-$ ) (Wzór 4) [1,27]. Cząsteczka ta, wykazując zdolność dyfundowania przez błony, może utleniać grupy tiolowe i hemowe białek oraz nienasycone reszty kwasów tłuszczowych zarówno w obrębie mitochondrium, jak i w innych przedziałach komórki [1]. Nadtlendioazotyn przeprowadza również reakcję nitrowania reszt tyrozylowych w białkach, prowadząc do inaktywacji enzymów macierzy mitochondrialnej, m.in. akonitazy i MnSOD. Ponadto,  $\text{ONOO}^-$  może również hamować aktywność białek wewnętrznej błony mitochondrialnej (I i II kompleksu łańcucha oddechowego i syntazy ATP) oraz kanału anionowego zależnego od potencjału (poryny mitochondrialnej), występującego w zewnętrznej błonie mitochondrialnej [28].

#### MITOCHONDRIALNY SYSTEM ANTYOKSYDACYJNY

Mimo, że RFT wytwarzane jako produkt uboczny metabolizmu tlenowego komórki lub w warunkach stresu oksydacyjnego to cząsteczki nietrwałe, o krótkim okresie półtrwania, są jednak związkami niezwykle reaktywnymi i mogą bezpośrednio utleniać lipidy błonowe, białka i kwasy nukleinowe, powodując modyfikację struktury, utratę aktywności i właściwości biologicznych tych cząsteczek. Nagromadzenie zmodyfikowanych makrocząstek prowadzi do postępujących uszkodzeń strukturalnych komórki, a tym samym jej śmierci [2,5].

Organizmy wytworzyły szereg mechanizmów obronnych zapobiegających powstawaniu RFT (pierwsza linia obrony), bądź usuwających już wytworzone RFT (druga linia obrony) i tym samym minimalizujących skutki ich działania. Mitochondria, stanowiąc istotne źródło RFT, posiadają rozbudowany system antyoksydacyjny, składający się zarówno z białek enzymatycznych (dysmutazy ponadtlenkowe, katalaza, peroksydazy, oksydaza alternatywna), jak i związków niskocząsteczkowych, czy białek nieenzymatycznych (m.in. glutation, askorbinian,  $\alpha$ -tokoferol, tioredoksyna, białko rozprzegające).

#### ENZYMATYCZNY SYSTEM ANTYOKSYDACYJNY

Na enzymatyczny mechanizm obronny mitochondriów składa się szereg enzymów, które bezpośrednio usuwają anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru, nie do-

puszczając do reakcji RFT ze składnikami komórki (Ryc. 1). Ponadto, enzymy te reagując z  $\text{O}_2^{\cdot-}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  zapobiegają powstawaniu rodnika hydroksylowego, najbardziej niebezpiecznej reaktywnej formy tlenu.

**Dysmutazy ponadtlenkowe.** Dysmutazy ponadtlenkowe (SOD, ang. *superoxide dismutases*) są enzymami katalizującymi wspomnianą już reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego (Wzór 1). Aktywność tych enzymów została stwierdzona u niemal wszystkich zbadanych organizmów aerobowych, eukariotycznych i prokariotycznych [1]. Dysmutazy występują w wielu organellach komórkowych, m.in. w mitochondriach, chloroplastach, peroksydomach, ponadto w cytosolu oraz na zewnątrz komórek.

W macierzy mitochondrialnej znajduje się dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca jony manganowe (MnSOD, SOD-2, EC 1.15.1.1). Dysmutaza manganowa występująca w mitochondriach organizmów eukariotycznych jest tetramerem zbudowanym z czterech podjednostek o masie cząsteczkowej około 24 kDa [1]. Jon manganu znajduje się w centrum katalitycznym enzymu. Dysmutaza manganowa jest kodowana przez genom jądrowy i syntetyzowana jest w postaci białka prekursorowego, zawierającego N-kończącą sekwencję sygnałową złożoną z około 30 reszt aminokwasowych. Aktywność MnSOD stwierdzono również w komórkach prokariotycznych, w których MnSOD występuje zwykle w postaci dimeru. Aktywność MnSOD, chroniąca mitochondrialne enzymy zawierające centra żelazo-siarkowe przed atakiem  $\text{O}_2^{\cdot-}$  [29], podlega regulacji komórkowej. Wykazano, że synteza MnSOD zwiększa się pod wpływem szoku osmotycznego, cieplnego oraz związków generujących  $\text{O}_2^{\cdot-}$  [30]. Ponadto, zaobserwowano również wzrost poziomu transkryptów MnSOD w mitochondriach *Nicotiana sylvestris* wykazujących obniżenie aktywności kompleksu I mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów [31]. U ssaków aktywność MnSOD jest bardzo różna w poszczególnych tkankach; u myszy największą aktywność zaobserwowano w wątrobie i nerkach a najmniejszą w płucach [32]. Homozygotyczne myszy pozbawione MnSOD przeżywają tylko kilka dni po urodzeniu, natomiast myszy z 6-10-krotną nadprodukcją enzymu wykazują wady rozwojowe oraz obniżoną płodność [5].

W przestrzeni międzybłonowej mitochondriów stwierdzono obecność innego rodzaju dysmutazy ponadtlenkowej, dysmutazy wiążącej miedź i cynk (Cu/ZnSOD, SOD-1). Enzym ten jest homodimerem, zawierającym w centrum aktywnym jony miedzi i cynku. W komórkach roślinnych, Cu/ZnSOD występuje przede wszystkim w cytosolu, lecz jej obecność wykryto również w mitochondriach, chloroplastach i peroksydomach [33-35]. Przypuszcza się, że Cu/ZnSOD zlokalizowana w mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej uczestniczy w dysmutacji  $\text{O}_2^{\cdot-}$  powstającego podczas transportu elektronów przez łańcuch oddechowy.

**Katalaza.** Dysmutacja anionorodnika ponadtlenkowego prowadzi do utworzenia kolejnej reaktywnej formy tlenu, nadtlenu wodoru, który również musi zostać usunięty, aby zapobiec powstawaniu rodnika hydroksylowego [1]. Rola tę spełniają katalazy (ang. *catalase*, CAT, EC 1.11.1.6), enzymy przeprowadzające reakcję dysmutacji (dyspropor-

cyjowania) nadtlenu wodoru do wody i tlenu (Wzór 2). Katalazy, kodowane przez genom jądrowy, występują w formie tetramerów o masie cząsteczkowej 240 kDa. W przypadku organizmów roślinnych, jak dotąd wyizolowano trzy formy izoenzymatyczne tego białka: CAT-1, CAT-2, CAT-3. Enzymami charakterystycznymi przede wszystkim dla peroksyosomów, glioksyosomów i cytosolu, a więc miejsc obfitej produkcji  $H_2O_2$ , są formy CAT-1 i CAT-2, z kolei izoforma CAT-3 występuje w mitochondriach. Obecność katalazy stwierdzono m.in. w mitochondriach liści kukurydzy, rośliny typu  $C_4$ , ale nie zaobserwowano aktywności tego enzymu u roślin typu  $C_3$  [36]. U ssaków (m.in. u myszy) największą aktywność katalazy wykazano w mitochondriach, peroksyosomach i cytosolu komórek wątroby, nerek, płuc, serca i mózgu [37]. Wydaje się prawdopodobne, że w komórkach serca występuje jedynie izoforma mitochondrialna katalazy, której ilość sięga 0.025% wszystkich białek mitochondriów [38].

**Peroksydaza glutationowa.** Peroksydaza glutationowa (ang. *glutathione peroxidase*, GPx, EC 1.11.1.9) jest enzymem, który podobnie jak katalaza, usuwa nadtlenek wodoru. Mechanizm reakcji katalizowanej przez peroksydazę polega na redukcji  $H_2O_2$  do  $H_2O$  z jednoczesnym utlenieniem glutationu (GSH):



**Wzór 5.** Reakcja redukcji nadtlenu wodoru z udziałem peroksydazy glutationowej

Powstająca w tej reakcji utleniona forma glutationu, disulfid glutationu (GSSG), jest związkiem niebezpiecznym dla komórki, bowiem może utleniać grupy tiolowe białek lub tworzyć mieszane dwusiarczki z białkami, prowadząc do ich inaktywacji [1]. Dlatego z GPx współdziała enzym reduktaza glutationowa, która przywraca zredukowaną formę glutationu, wykorzystując NADPH jako źródło elektronów.

Powszechne w tkankach roślinnych peroksydazy glutationowe są białkami zawierającymi grupę hemową. Z kolei tkanki zwierząt, szczególnie ssaków, są bogate w peroksydazy glutationowe, które nie są hemoproteinami, lecz zawierają w swym centrum aktywnym aminokwas selenocysteinę [1,5]. Obecność selenocysteiny w centrum aktywnym enzymu umożliwia utlenienie glutationu bez uwalniania wolnego rodnika tiolowego tej cząsteczki [1]. U człowieka stwierdzono obecność pięciu form izoenzymatycznych GPx, natomiast u myszy występują cztery formy tego enzymu. GPx kodowane są przez różne geny i mogą występować w różnych przedziałach komórkowych, włączając macierz i przestrzeń międzybłonową mitochondriów (formy izoenzymatyczne Gpx1 i GPx4 człowieka) [39]. Peroksydazy glutationowe występują w postaci tetramerów, składających się z czterech podjednostek o masie cząsteczkowej około 20 kDa. Najwyższą aktywność GPx zaobserwowano w mitochondriach wątroby, nerki i serca, nieco mniejszą natomiast w mitochondriach mózgu i mięśni szkieletowych ssaków [40]. Przez dłuższy czas GPx uważana była za bardzo ważny element komórkowego i mitochondrialnego systemu obrony przeciwko RFT. Jednakże myszy pozbawione

geny GPx są zdrowe, płodne i rozwijają się normalnie [5]. Badania te wskazują, że GPx jest prawdopodobnie zaangażowana w ochronę tkanek i mitochondriów tylko podczas wzmożonego stresu oksydacyjnego i nie odgrywa roli antyoksydacyjnej przy niskim poziomie endogennej produkcji RFT przez mitochondria.

Jedną z form GPx jest peroksydaza glutationowa wodoronadtlenków fosfolipidów (PHGPx, ang. *phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*, EC 1.11.1.12), selenoenzymem redukujący wodoronadtlenki fosfolipidów,  $H_2O_2$ , nadtlenu cholesterolu oraz nadtlenek tyminy [41]. W przeciwieństwie do tetramerycznej formy peroksydazy glutationowej, PHGPx jest monomerycznym o masie cząsteczkowej 18 kDa [1]. Enzym ten, redukując wodoronadtlenki fosfolipidów, pełni istotną rolę w ochronie błon komórkowych przed peroksydacją lipidów, stanowiąc tym samym jeden z najważniejszych mechanizmów obrony komórki przed RFT. PHGPx ulega ekspresji w postaci dwóch izoform: formy krótszej (forma S) i dłuższej (forma L), która kierowana jest do mitochondriów [42]. Znaczną ilość PHGPx znaleziono w jądrach ssaków, szczególnie w mitochondriach plemników myszy i szczura [1,5]. Enzym ten stanowi niemal połowę całkowitej ilości białek zewnętrznej błony mitochondrialnej plemników, najprawdopodobniej spełniając ważną rolę fizjologiczną w tych komórkach [1]. Jednakże bardzo wąska specyficzność tkankowa tego enzymu u ssaków wyklucza jego szersze znaczenie.

Reduktaza glutationowa. Powstała w mitochondriach utleniona forma glutationu, jest cząsteczką szkodliwą, która jednakże nie może być eksportowana do cytosolu i musi ulec regeneracji do zredukowanej formy glutationu w macierzy mitochondrialnej. Reakcja redukcji GSSG katalizowana jest przez reduktazę glutationową (ang. *glutathione reductase*, GR, EC 1.8.1.7), odtwarzającą zredukowaną formę glutationu kosztem utlenienia wewnątrzmitochondrialnego NADPH [1, 5]:



**Wzór 6.** Reakcja redukcji glutationu z udziałem reduktazy glutationowej

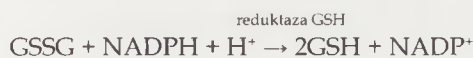
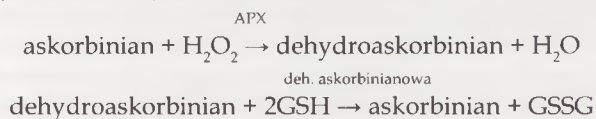
NADPH może ulec regeneracji z udziałem występujących w macierzy enzymów, zależnej od  $\text{NADP}^+$  dehydrogenazy izocytrynianowej lub enzymu jabłczanowego (NADP-ME), lub występującej w wewnętrznej błonie mitochondriów, transhydrogenazy NADPH.

**S-transferaza glutationowa.** Mitochondria wykorzystują glutation nie tylko jako regenerowalny donator elektronów. Grupa tiolowa glutationu może bowiem łatwo reagować z różnymi związkami elektrofilowymi (tzn. związkami, których grupy reaktywne charakteryzują się małą gęstością elektronową i z łatwością wchodzi w reakcje z grupami o dużej gęstości elektronowej [1]), w tym produktami peroksydacji lipidów, wodoronadtlenkami, czy ksenobiotykami. Reakcje te mogą zachodzić spontanicznie lub przy udziale enzymów, S-transferaz glutationowych (ang. *glutathione-S-transferase*, GST, E.C.2.5.1.18) prowadząc do powstania koniugatów glutationu, usuwanych następnie na zewnątrz mitochondriów i dalej na zewnątrz komórek [1,5]. W ten



sposób enzymy te chronią mitochondria przed różnymi toksycznymi związkami, w tym produktami peroksydacji lipidów, m.in. 4-hydroksynonenalem [5]. Po usunięciu z mitochondrium koniugatu GSH z toksyną, zapas GSH w organeli musi być uzupełniony poprzez pobranie go z cytosolu. Dostatecznie duża pula wewnątrzmitochondrialnego GSH zapewnia efektywne działanie systemu obronnego oparte go na S-transferazach glutationowych. S-transferazy glutationowe, w przeciwieństwie do peroksydazy glutationowej, nie zawierają selenu oraz nie mogą redukować nadtlenu wodoru. W mitochondriach ssaków stwierdzono obecność kilku izoform S-transferazy glutationowej [43].

**Peroksydaza askorbinianowa.** Enzym ten (APX, E.C.1.11.1.11) charakterystyczny jest przede wszystkim dla chloroplastów i cytosolu komórek roślinnych, lecz został również znaleziony w mitochondriach grochu, papryki i pomidora [44]. Niedawno znaleziono również pojedynczy polipeptyd APX w izolowanych mitochondriach *Arabidopsis*, mimo że analiza genomu jądrowego tego gatunku nie dostarczyła dowodu na to, że koduje on mitochondrialną izoformę APX [44]. Peroksydazy askorbinianowe są hemoproteinami, zawierającymi cztery grupy tiolowe odpowiedzialne za ich reaktywność [1]. Usuwiają nadtlenek wodoru z wykorzystaniem askorbinianu jako donora elektronów. APX stanowią element tzw. cyklu Halliwela-Asady (cyklu askorbinianowo-glutationowego), którego funkcją jest usunięcie  $H_2O_2$  z organeli komórkowych. Z APX współpracuje reduktaza dehydroaskorbinianowa, odtwarzająca askorbinian kosztem utlenienia glutationu oraz wspomniana już reduktaza glutationowa, regenerująca glutation i wykorzystująca NADPH jako źródło elektronów.



#### Wzór 7. Cykl Halliwela-Asady

**Peroksydaza cytochromu c.** Peroksydaza cytochromu c (ang. *cytochrome c peroxidase*, EC 1.11.1.5) jest enzymem zlokalizowanym w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów drożdży, a także występującym u niektórych bakterii [1]. Enzym ten redukuje nadtlenek wodoru, który wytwarzany jest w reakcji katalizowanej przez mitochondrialną MnSOD, utleniając cząsteczkę cytochromu c. Dane doświadczalne wskazują na istotną rolę tego enzymu w usuwaniu  $H_2O_2$ . Stwierdzono, że izolowane nienaruszone mitochondria drożdży uwalniają znacznie mniej nadtlenu wodoru niż cząstki submitochondrialne. Ponadto, mitochondria pozbawione peroksydazy cytochromu c uwalniają dużo więcej nadtlenu wodoru niż mitochondria zawierające aktywny enzym [45].

**Oksydaza alternatywna.** Łańcuch oddechowy roślin, grzybów i niektórych pierwotniaków zawiera oksydazę alternatywną (ang. *alternative oxidase*, AOX), enzymem przenoszący elektrony bezpośrednio z ubichinolu na tlen, z pominięciem drogi cytochromowej. Oksydaza alternatywna

nie pompuje protonów, a energia uzyskana podczas transportu elektronów zostaje zamieniona w ciepło. Enzym ten jest niewrażliwy na antymycynę A i cyjanek (inhibitory odpowiednio III i IV kompleksu oddechowego), stąd może funkcjonować również w sytuacji zablokowania drogi cytochromowej. W mitochondriach roślin AOX występuje w postaci homodimeru, którego aktywność regulowana jest przez stan utlenienia-redukcji wewnątrzcząsteczkowych wiązań disulfidowych (forma zredukowana jest bardziej aktywna), natomiast AOX mikroorganizmów jest monomerym [46-49]. Aktywatorami roślinnej AOX są  $\alpha$ -ketokwasy, natomiast oksydaza pierwotniaków i niektórych grzybów jest stymulowana przez mononukleotydy purynowe (GMP, AMP, IMP). Oksydaza alternatywna kodowana jest przez geny jądrowe, których ekspresja podlega regulacji środowiskowej i tkankowej.

Dotychczas dobrze poznaną, fizjologiczną funkcją AOX jest generacja ciepła w kolbach kwiatostanowych roślin termogennych (*Araceae*), umożliwiającą ich zapylenie. Jednakże obecność tego enzymu u roślin nietermogennych oraz w organizmach jednokomórkowych, u których termogeneza nie jest możliwa, wskazuje na inną, powszechną funkcję AOX. Taką funkcją może być rola w pierwszej linii obrony antyoksydacyjnej w komórce, polegającej na zmniejszaniu mitochondrialnej produkcji RFT poprzez obniżanie poziomu redukcji nośników elektronów łańcucha oddechowego [44,50]. Oksydaza alternatywna, utleniając zredukowany ubichinon (i tym samym obniżając potencjał oksydoredukcyjny mitochondriów), może obniżać mitochondrialną produkcję RFT głównie na poziomie kompleksu I i kompleksu III łańcucha oddechowego. Obniżanie poziomu produkcji RFT przez AOX obserwowano w mitochondriach roślin [51-53], jak i pierwotniaków [54,55]. Wykazano, że zarówno zahamowanie aktywności AOX, jak i obniżona ekspresja tego białka stymulują produkcję  $H_2O_2$  przez mitochondria, natomiast wzrost aktywności AOX powoduje obniżenie produkcji  $H_2O_2$ . Stwierdzono także, że różnego rodzaju warunki stresowe, takie jak niska temperatura, niedobór fosforanu czy atak patogenów, wpływają na zwiększenie ekspresji i aktywności AOX [44,49]. Sugeruje to, że ochrona przed stresem oksydacyjnym może być fizjologiczną rolą AOX, mimo że odbywa się kosztem fosforylacji oksydacyjnej, a więc ilości ATP dostarczanej komórce.

W mitochondriach roślin i organizmów jednokomórkowych posiadających roślinny typ łańcucha oddechowego (pierwotniaki i grzyby), istnieją dodatkowe oprócz AOX kompleksy oddechowe, które zapobiegają nadmiernej redukcji łańcucha oddechowego, głównie w sytuacji ograniczenia jego przepustowości dla przenoszonych elektronów [44,49,56]. W ten sposób, działanie **nie pompujących protonów dehydrogenaz NAD(P)H**, które omijają kompleks I i oddają elektrony bezpośrednio na ubichinon, może przyczyniać się do obniżenia ilości RFT produkowanych przez mitochondrialny łańcuch oddechowy u tych organizmów.

#### NIEENZYMATYCZNY SYSTEM ANTYOKSYDACYJNY

W obronie mitochondriów oraz całej komórki przed szkodliwym działaniem RFT istotną rolę, obok białek enzymatycznych, spełniają również antyoksydanty niskoczą-

steczkowe i białka nieenzymatyczne. Związki te zapobiegają peroksydacji lipidów i białek nie na drodze katalitycznej, lecz poprzez wchodzenie w reakcje z wolnymi rodnikami lub produktami ich utleniania [1]. Mogą one reagować z tymi RFT, które uniknęły działania enzymów antyoksydacyjnych, zmniejszając tym samym prawdopodobieństwo powstania rodnika hydroksylowego.

**Glutation.** Glutation (GSH,  $\gamma$ -glutamylcysteinylglycyna) jest tripeptydem, którego cechą charakterystyczną jest obecność grupy tiolowej (SH), decydującej o jego reaktywności. Tylko około 10–12% glutationu całej komórki znajduje się w mitochondriach, ale z powodu względnie małej objętości macierzy mitochondrialnej stężenie GSH jest nieco wyższe w tym przedziale niż w cytosolu [57]. Mitochondria nie posiadają enzymów syntetyzujących glutation, zaś pula wewnątrzmitochondrialnego GSH jest uzupełniana na drodze transportu GSH z cytoplazmy z udziałem różnych białek transportujących wewnątrz błony mitochondrialnej (nośnika GSH, nośnika dikarboksylianów czy nośnika 2-oksoglutaranu) [5]. Wewnątrz mitochondriów związek ten występuje w zakresie stężeń 2–14 mM; około 90% glutationu stanowi forma zredukowana (GSH) [57,58]. Całkowite stężenie glutationu (formy zredukowanej i utlenionej) w mitochondriach różni się w zależności od stanu metabolicznego komórki, wieku, czy rodzaju tkanki [58], choć zmiany te mogą nie mieć wpływu na poziom usuwania  $H_2O_2$  przez enzymy zależne od GSH [5]. W przypadku mitochondriów serca szczura, dopiero obniżenie stężenia GSH ponad 50% poziomu naturalnego wpływa na podwyższenie produkcji  $H_2O_2$  przez te mitochondria.

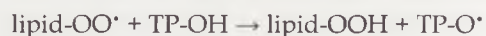
Grupa tiolowa (SH) glutationu może ulec utlenieniu, prowadząc do wytworzenia disulfidu glutationu (GSSG). Reakcja ta może zachodzić na drodze nieenzymatycznej oraz przy udziale peroksydazy glutationowej w obecności nadtlenu wodoru lub innych nadtlenuków organicznych [1]. Grupa tiolowa GSH ma również zdolność do reagowania z RFT (najbardziej z rodnikiem hydroksylowym) oraz wolnymi rodnikami substancji organicznych (m.in. wolnymi rodnikami białek), czego efektem może być odtworzenie struktury tych związków kosztem powstania wolnego rodnika glutationu. Ponadto, glutation może tworzyć wspomniane już wyżej koniugaty ze związkami elektrofilowymi z udziałem S-transferazy glutationowej.

**Askorbinian.** Askorbinian, o którym wspomniano już omawiając działanie peroksydazy askorbinianowej, jest silnym antyoksydantem reagującym z  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ , rodnikami nadtlenukowymi i tlenem singletowym. Związek ten występuje w dużych ilościach w macierzy mitochondrialnej komórek roślinnych, gdzie bardzo często współdziała z glutationem w serii reakcji zwanych cyklem Halliwela-Asady (Wzór 7) [44]. Askorbinian szczególnie silnie reaguje z nadtlenukiem wodoru (tworząc nieszkodliwy dehydroaskorbinian) i choć reakcja ta może zachodzić w warunkach nieenzymatycznych, jej znaczne przyspieszenie następuje w obecności peroksydazy askorbinianowej (u roślin). Wydaje się, że poprzez kontrolę poziomu syntezy askorbinianu w mitochondriach (która zależy od dostępności utlenionego cytochromu c), mitochondrialny łańcuch oddechowy może

mieć istotny wpływ na działanie systemu antyoksydacyjnego komórki roślinnej i z nim związanej tolerancji na stres [44].

**$\alpha$ -Tokoferol.**  $\alpha$ -Tokoferol (TP) to główny hydrofobowy antyoksydant chroniący błony komórkowe przed działaniem RFT. Szczególnie licznie występuje w błonach mitochondrialnych, gdzie jedna cząsteczka tokoferolu przypada na 2100 cząsteczek fosfolipidów [1,5].

Działanie tokoferolu polega przede wszystkim na usuwaniu wolnych rodników organicznych, głównie produktów powstałych w wyniku peroksydacji lipidów [1]:



**Wzór 8.** Reakcja redukcji nadtlenuków lipidów z udziałem tokoferolu (TP-OH)

W wyniku reakcji tokoferolu z rodnikami organicznymi powstaje mało reaktywny wolny rodnik tokoferolowy (TP-O $\cdot$ ), który może ulec regeneracji z udziałem zredukowanej formy koenzymu Q w obrębie błony lub askorbinianu na granicy fazy wodno-lipidowej [5], jak również wejść w reakcję z innym wolnym rodnikiem, co kończy dwa ciągi reakcji wolnorodnikowych [1].

**Szlak tioredoksyny.** Na szlak tioredoksyny składają się zarówno enzymy, jak i białka nieenzymatyczne (Ryc. 1). Tioredoksyna (ang. *thioredoxin*, Trx) jest polipeptydem powszechnie występującym w komórkach eukariotycznych i prokariotycznych. Białko to, o masie 12 kDa, występuje w postaci kilku izoform; w mitochondriach człowieka stwierdzono występowanie tzw. tioredoksyny 2 [1]. Cząsteczka Trx zawiera dwie sąsiadujące grupy tiolowe, które mogą ulec utlenieniu z wytworzeniem mostka disulfidowego. Tioredoksyny mogą redukować mostki disulfidowe białek (i same ulegać utlenieniu), powstałe w wyniku działania utleniaczy w czasie stresu oksydacyjnego.

Z tioredoksyną współdziała enzym **reduktaza tioredoksyny** (ang. *thioredoxin reductase*, TrxR, EC 1.8.1.9), redukująca utlenioną formę Trx z wykorzystaniem wewnątrzmitochondrialnego NADPH jako donora elektronów. Reduktazy tioredoksyny organizmów eukariotycznych przypominają enzym reduktazę glutationową ze względu na obecność selenocysteiny w centrum aktywnym. Szlak tioredoksyny może być istotny podczas rozwoju ssaków, gdyż uszkodzenie genu reduktazy tioredoksyny u myszy prowadzi do wzmożonej apoptozy podczas wczesnej embriogenezy oraz śmieci embrionów [5]. Z drugiej jednak strony, nadprodukcja białka reduktazy i wyższy poziom tioredoksyny nie prowadzą do zwiększonej przeżywalności myszy czy zwiększonej odporności na czynniki indukujące RFT.

W szlaku tioredoksyny działa również enzym peroksydaza zależna od tioredoksyny, zwana **peroksyredoksyną** (ang. *peroxiredoxin* lub *thioredoxin-dependent peroxide reductase*, Prx). Ten niedawno odkryty enzym redukuje  $H_2O_2$  i wodoronadtlenki lipidów (produkty peroksydacji lipidów), wykorzystując tioredoksynę jako źródło elektronów [59]. W mitochondriach ssaków odkryto dwie izoformy peroksyre-

doksyny, Prx3 i Prx5. Izoforma Prx3 występuje w dużych ilościach w różnych tkankach szczura i wołu, szczególnie w mitochondriach serca, wątroby i mózgu. Stwierdzono, że ekspresja genu kodującego Prx3 indukowana jest przez stres oksydacyjny [5]. Powszechne występowanie izoformy Prx5 zostało wykazane w tkankach wołu, przy czym największy poziom tego enzymu stwierdzono w mitochondriach jąder. Wykazano również, że zwiększona produkcja Prx5 człowieka w mitochondriach komórek jajnikowych chomika zapewniła ochronę tym komórkom przed szkodliwym działaniem nadtlenu wodoru, co wskazuje na rolę Prx w komórkowej obronie przed RFT [60]. Efektywność Prx3 i Prx5 w usuwaniu  $H_2O_2$  w porównaniu z innymi antyoksydacyjnymi systemami mitochondrialnymi nie jest dotąd poznana. W przypadku roślin przypuszcza się, że peroksyredoksyna może odgrywać istotną rolę w redukcji wodoronadlenków lipidów oraz  $H_2O_2$  zarówno w mitochondriach, jak i chloroplastach [53].

Peroksyredoksyny, jak już wspomniano, wykorzystują tioredoksynę jako donor elektronów w reakcji redukcji  $H_2O_2$ . Innym białkiem współdziałającym z tioredoksyną jest **glutaredoksyna** (ang. *glutaredoxin*, Grx) obecna w większości tkanek ssaków i roślin [5,44]. Enzym ten katalizuje reakcje oksydoredukcji mostka disulfidowego tioredoksyny. Glutaredoksyna może redukować zarówno mostki disulfidowe białek oraz mieszane z GSH, podczas gdy tioredoksyna efektywnie redukuje tylko mostki disulfidowe białek. Utleniona forma glutaredoksyny może z kolei ulec regeneracji przy udziale innego antyoksydanta, glutationu [44].

Obecnie, oprócz peroksyredoksyn (Prx3 i Prx5), niewiele wiadomo na temat innych mitochondrialnych izoform białek należących do omawianego układu tioredoksyny, tj. tioredoksyny (Trx2), reduktazy tioredoksyny (TrxR2) i glutaredoksyny (Grx2) [5]. Wydaje się jednak bardzo prawdopodobne, że system obejmujący białka tego układu, ze względu na obfitość występowania w tkankach ssaków oraz jego działanie antyoksydacyjne, jest głównym szlakiem usuwającym nadtlenek wodoru oraz nadtenki lipidów w mitochondriach ssaków [44].

**Białko rozprzegające.** W wewnętrznej błonie mitochondrialnej organizmów eukariotycznych istnieje specyficzne białko rozprzegające energię, które współzawodnicząc z syntazą ATP obniża wydajność fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach. Białkiem tym jest białko rozprzegające (UCP, ang. *uncoupling protein*), które rozprasza energię elektrochemicznego gradientu protonowego wytworzonego przez łańcuch oddechowy mitochondriów. Białko to pozwala na powrót do macierzy mitochondrialnej protonów wcześniej wypompowanych przez kompleksy łańcucha oddechowego [50,61,62]. Białko UCP stymulowane jest przez anionowe formy wolnych kwasów tłuszczowych, hamowane zaś przez nukleotydy purynowe (GTP, GDP, ATP).

Przez długi czas uważano, że UCP występuje wyłącznie w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej ssaków charakteryzujących się zachodzeniem przejściowej termogenezy [50,61,62]. Białko to, zwane termogeniną (obecnie UCP1), odpowiedzialne jest za produkcję ciepła u noworodków ssaków, zwierząt hibernujących lub zaadaptowanych

do zimna. Dopiero niedawno odkryto wiele innych białek rozprzegających w mitochondriach różnych tkanek ssaków (UCP2-UCP5), ptaków, bezkręgowców, roślin wyższych, pierwotniaków i grzybów. W związku z obecnością białek rozprzegających u tak różnych grup organizmów eukariotycznych wydaje się, że białka rozprzegające mogą spełniać inne, odmienne od produkcji ciepła, funkcje.

Wykazano, że aktywacja UCP przez wolne kwasy tłuszczowe powoduje obniżenie poziomu produkcji  $H_2O_2$ , natomiast zahamowanie aktywności UCP przez nukleotydy purynowe zwiększa produkcję RFT przez mitochondrialny łańcuch oddechowy. Efekt ten zaobserwowano zarówno w mitochondriach roślin wyższych [63], ssaków [64,65] i pierwotniaków [55]. Wyniki te pozwalają przypuszczać, że UCP pełni rolę endogennego systemu antyoksydacyjnego i podobnie jak oksydaza alternatywna uczestniczy w pierwszej linii obrony mitochondriów przed szkodliwym działaniem RFT [50,61,62,65]. Białko rozprzegające, rozpraszając protonowy gradient elektrochemiczny, obniża poziom redukcji nośników elektronów łańcucha oddechowego i tym samym obniża możliwość produkcji RFT głównie na poziomie kompleksu I i kompleksu III. Podobnie jak w przypadku oksydazy alternatywnej, antyoksydacyjna funkcja UCP odbywa się kosztem energii dostarczanej komórce przez mitochondria.

#### **ROLA MITOCHONDRIALNYCH RFT W PRZENOSZENIU SYGNAŁÓW I PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓRKI**

Reaktywne formy tlenu syntetyzowane przez białka mitochondrialnego łańcucha oddechowego lub inne białka mitochondrialne, oprócz destruktywnego działania na składniki komórek, mogą również pełnić rolę przekaźników sygnałów, prowadząc m. in. do zmian metabolizmu w różnych przedziałach komórki lub uczestniczyć w programowanej śmierci komórki (PCD, ang. *programmed cell death*).

O roli mitochondrialnych RFT działających jako cząsteczki sygnałowe wywnioskowano m. in. na podstawie badań dotyczących wpływu antymycyny A, inhibitora kompleksu III mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów, na ekspresję genów jądrowych tytoniu *Nicotiana tabacum*. Zahamowanie aktywności drogi cytochromowej przez antymycynę A spowodowało zwiększenie ekspresji genu *aox1*, kodującego oksydazę alternatywną, a tym samym wzrost aktywności tego białka [66,67]. Rolę czynnika sygnałowego pomiędzy mitochondriami a jądrem komórkowym pełni najprawdopodobniej RFT, których poziom produkcji w obecności antymycyny A znacznie wzrasta. Wzrost ilości transkryptów genu *aox1* zaobserwowano również w komórkach tytoniu poddanych działaniu  $H_2O_2$ , kwasu salicylowego, cytrynianu i pod wpływem chłodu [66,67].

Kolejny dowód na to, że RFT odgrywają istotną rolę w przekazywaniu sygnałów pomiędzy mitochondriami a innymi przedziałami komórki, uzyskano badając mutant *Nicotiana silvestris*, pozbawionego funkcjonalnego kompleksu I łańcucha oddechowego [31,44]. W komórkach tej rośliny zaobserwowano zwiększenie ekspresji mitochondrialnych enzymów antyoksydacyjnych (MnSOD i AOX), peroksyosomalnej katalazy oraz peroksydazy askorbinianowej zlokalizowanej w cytosolu. Przypuszcza się, że wzrost ekspresji

tych antyoksydantów jest odpowiedzią komórki na mitochondrialne RFT, produkowane w zwiększonej ilości przez łańcuch oddechowy, osłabiony brakiem kompleksu I.

Reaktywne formy tlenu mogą również działać jako bezpośrednie cząsteczki sygnałowe indukujące PCD lub wywoływać uszkodzenia komórki będące sygnałem do jej inicjacji. Oprócz tego, RFT mogą również uczestniczyć w tzw. fazie egzekucji PCD, związanej z obniżeniem przepuszczalności i spadkiem potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej [44,68]. Istotnym etapem procesu programowanej śmierci komórki jest uwolnienie białek apoptogennych (cytochromu *c*, czynnika indukcji apoptozy – AIF, kompleksu białek Smac/Diablo) z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytosolu, wywołane zmianami uprzeczelnienia błon mitochondrialnych. Uwolniony cytochrom *c* wchodzi w reakcję z cytosolowym białkiem Apaf-1, aktywując kaskadę proteaz, zwanych kaspazami, które trawią substraty białkowe w błonach mitochondriów, przyczyniając się do zwiększenia ich przepuszczalności. Proponowane są dwa modele wyjaśniające mechanizm uwolnienia cytochromu *c* i innych białek z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów w momencie dotarcia do mitochondriów sygnałów „śmierci” (np. zwiększony poziom RFT towarzyszący stresowi oksydacyjnemu) [44,68]. Według modelu pierwszego proces ten umożliwiają białka z rodziny Bcl-2 (białka proapoptogenne, np. Bax, Bak, Bad), które w zewnętrznej błonie mitochondrialnej tworzą por pozwalający na przejście białek przestrzeni międzybłonowej do cytosolu. Drugi model zakłada rolę tzw. megakanalu o dużej przepuszczalności (PTP, ang. *permeability transition pore*), który tworzony jest w miejscu złączenia zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej z udziałem m. in. translokazy nukleotydów adeninowych i poryny mitochondrialnej. Długotrwałe otwarcie megakanalu, spowodowane np. stresem oksydacyjnym, powoduje przerwanie zewnętrznej błony mitochondrialnej i uwolnienie zawartości przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytosolu. Utrata jednego z elementów łańcucha transportu elektronów, cytochromu *c*, powoduje poważne zakłócenia w jego aktywności. Efektem jest produkcja dużej ilości RFT, które mogą wzmacniać sygnał realizacji PCD, utleniając lipidy wewnętrznej błony mitochondrialnej (głównie kardiolipinę) i zwiększając przepuszczalność tejże błony, jak również mogą pośredniczyć w postępujących uszkodzeniach całej komórki spowodowanych stresem oksydacyjnym.

W przekazywaniu sygnałów w obrębie komórek i tkanek uczestniczą nie tylko cząsteczki RFT produkowane przez mitochondrialny łańcuch oddechowy, ale również te, które pochodzą z innych, wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych źródeł (błony komórkowej, cytosolu, peroksysomów, chloroplastów, czy apoplastu). Powszechnie uważa się, że anionorodnik ponadtlenkowy i  $H_2O_2$  są pierwszymi cząsteczkami sygnałowymi w kaskadzie sygnałów uruchamianej w czasie stresu [44,68-70]. Są także produkowane jako drugorzędowe przekaźniki podczas odpowiedzi organizmów na działanie hormonów. Akumulacja RFT może prowadzić do zwiększonej ekspresji enzymów antyoksydacyjnych i innych białek obronnych lub zależnie od intensywności stresu oksydacyjnego może przyczyniać się do procesu starzenia komórek czy zapoczątkować proces PCD [2,68-70]. „Wolno-

rodnikowa teoria starzenia się” zakłada, że starzenie się organizmów jest wynikiem gromadzenia się w ich komórkach uszkodzeń wywołanych przez niespecyficzne reakcje RFT [1,2,5,44]. Aktywując wiele czynników transkrypcyjnych, RFT przyczyniają się także do modulacji ekspresji genów uczestniczących m. in. w proliferacji, różnicowaniu i morfogenezie komórek i tkanek (np. aktywacji jądrowego czynnika NF- $\kappa$ B u zwierząt i roślin) [70]. RFT mogą również brać udział w przesyłaniu sygnałów z udziałem kaskady kinaz MAPK pod wpływem działania czynników stresowych biotycznych i abiotycznych, indukując ekspresję genów białek obronnych (np. S-transferazy glutationowej). Reaktywne formy tlenu są kluczowym elementem odpowiedzi rośliny na atak patogenu. Uczestniczą w mechanizmie obronnym polegającym m. in. na zwiększeniu lignifikacji ścian komórkowych, tzw. reakcji nadwrażliwości (HR, ang. *hypersensitive response*), polegającej na zamieraniu komórek, które weszły w kontakt z patogenem, i komórek sąsiednich oraz w nabywaniu odporności systemowej (SAR, ang. *systemic acquired resistance*), czyli aktywowaniu reakcji obronnych w niezaatakowanych częściach rośliny [70].

## PODSUMOWANIE

Organizmy aerobowe, żyjąc w atmosferze tlenowej, narażone są na nieustanną produkcję (głównie w mitochondriach) RFT, cząsteczek stanowiących produkt uboczny metabolizmu tlenowego. Ze względu na „podwójną” rolę cząsteczki tlenu wszystkie organizmy musiały wykształcić szereg mechanizmów obronnych, stanowiących system antyoksydacyjny komórki. System antyoksydacyjny mitochondriów, składający się z białek enzymatycznych i nieenzymatycznych oraz niskocząsteczkowych antyoksydantów, obniża produkcję RFT nieustannie generowanych przez mitochondrialny łańcuch oddechowy oraz usuwa wytworzone RFT, chroniąc mitochondria i inne struktury komórkowe przed szkodliwym następstwem działania RFT. Jednakże w warunkach nierównowagi pomiędzy powstawaniem a eliminacją RFT, może dojść do powstania stresu oksydacyjnego, w czasie którego nadmierna ilość cząsteczek RFT prowadzi do szerokiego spektrum uszkodzeń składników biologicznych komórki, jej starzenia się i śmierci.

Należy również pamiętać o innych, pozytywnych funkcjach RFT, szczególnie roli  $H_2O_2$ . Reaktywne formy tlenu są niezbędne w utrzymaniu homeostazy i komunikacji wewnątrzkomórkowej, gdyż pełnią funkcje cząsteczek sygnałowych. Ze względu na swą mobilność i łatwość reagowania, RFT mogą indukować szereg fizjologicznych reakcji komórkowych, spośród których część stanowi strategię obronną organizmu w odpowiedzi na czynniki stresowe.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bartosz G (2003) Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
2. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N (2004) Mitochondrial superoxide production: biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* 37: 755-767
3. Woźny A, Przybył K (2004) Komórki roślinne w warunkach stresu. Komórki *in vivo*. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań
4. Sluse FE, Jarmuszkiewicz W (2004) Regulation of electron transport in the respiratory chain of plant mitochondria, W: Day DA, Millar HA,

- Whelan J (red) *Plant Mitochondria: From Genome to Function*. Kluwer Academic Publishers, Great Britain, str. 231-245
5. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)* 2: 200-214
  6. Turrens JF, Boveris A (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191: 421-427
  7. Takeshige K, Minakami S (1979) NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NADH-ubiquinone reductase preparation. *Biochem J* 180: 129-135
  8. Lambert AJ, Brand MD (2004) Superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J* 382: 511-51
  9. Liu Y, Fiskum G, Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80: 780-787
  10. Talbot DA, Lambert AJ, Brand MD (2004) Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein. *FEBS Lett* 556: 111-115
  11. Votyakova TV, Reynolds IJ (2001)  $\Delta\Psi_m$ -dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 79: 266-277
  12. Starkov AA, Fiskum G (2003) Regulation of brain mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J Neurochem* 83: 220-228
  13. Genova ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G, Lenaz G (2001) The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett* 505: 364-368
  14. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277: 44784-44790
  15. Miwa S, St-Pierre J, Partridge L, Brand MD (2003) Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria. *Free Radic Biol Med* 35: 938-948
  16. Herrero A, Barja G (2000) Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 32: 609-615
  17. Rich PR, Bonner WD (1978) The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 188: 206-213
  18. Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 237: 408-414
  19. Mc Lennan HR, Degli Esposti M (2000) The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. *J Bioenerg Biomembr* 32:153-162
  20. Gredilla R, Barja G, Lopez-Torres M (2001) Effect of short-term caloric restriction on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *J Bioenerg Biomembr* 33: 279-287
  21. Sohal RS (1993) Aging, cytochrome oxidase activity, and hydrogen peroxide release by mitochondria. *Free Radic Biol Med* 14: 583-588
  22. Hauptmann N, Grimsby J, Shih JC, Cadenas E (1996) The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* 335: 295-304
  23. Gardner PR (2002) Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Meth Enzymol* 349: 9-23
  24. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Kennedy MC (2000) Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation. *J Biol Chem* 275: 14064-14069
  25. Tretter L, Adam-Vizi V (2004) Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci* 24: 7771-7778
  26. Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF (2004) Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* 24: 7779-7788
  27. Ghafourifar P, Cadenas E (2005) Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* 26: 190-195
  28. Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L (2002) peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Rad Biol Med* 33: 1451-1464
  29. Gardner PR, Raineri I, Epstein LB, White C (1995) Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 270: 13399-13405
  30. Jeong JH, Kwon ES, Roe JH (2001) Characterization of the manganese-containing superoxide dismutase and its gene regulation in stress response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 908-914
  31. Dutilleul C, Garmier M, Noctor G, Mathieu C, Chêtrit P, Foyer CH, de Paeppe R (2003) Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell* 15: 1212-1226
  32. Van Remmen H, Salvador C, Yang H, Huang TT, Epstein CJ, Richardson A (1999) Characterization of the antioxidant status of the heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mouse. *Arch Biochem Biophys* 363: 91-97
  33. Żuchowski J (1999) Roślinne dysmutazy ponadtlenkowe. *Kosmos* 242: 82-93
  34. Becana M, Dalton DA, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Matamoros MA, Rubio MC (2000) Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. *Physiol Plant* 109: 372-381
  35. Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53: 1331-1341
  36. Foyer CH, Noctor G (2000) Oxygen processing in photosynthesis: Regulation and signalling. *New Phytol* 146: 359-388
  37. Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS (2004) Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem* 279: 32804-32812
  38. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 266: 22028-22034
  39. Chu FF, Esworthy RS, Doroshov JH (2004) Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Rad Biol Med* 36: 1481-1495
  40. Esposito LA, Kokoszka JE, Waymire KG, Cottrell B, MacGregor GR, Wallace DC (2000) Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Rad Biol Med* 28: 754-766
  41. Maiorino M, Thomas JP, Girotti AW, Ursini F (1991) Reactivity of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and lipoprotein lipid hydroperoxides. *Free Rad Res Commun* 12/13: 131-135
  42. Arai M, Imai H, Koumura T, Yoshida M, Emoto K, Umeda M, Chiba N, Nakagawa Y (1999) Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells. *J Biol Chem* 274: 4924-4933
  43. Raza H, Robin MA, Fang JK, Avadhani NG (2002) Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J* 366: 45-55
  44. Sweetlove LJ, Foyer CH (2004) Roles for reactive oxygen species and antioxidants in plant mitochondria. *W: Day DA, Millar HA, Whelan J (red) Plant Mitochondria: From Genome to Function*. Kluwer Academic Publishers, Great Britain, str. 307-320
  45. Gonchar MV, Kostryk LB, Sibirny AA (1997) Cytochrome c peroxidase from a methylotrophic yeast: physiological role and isolation. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 454-458
  46. Hryniewiecka L (1998) Regulacja transportu elektronów w rozgałęzionym łańcuchu oddechowym ameby *Acanthamoeba castellanii*. *W: Augustyniak H, Oczkowski M (red.) Biologia Molekularna Mitochondriów*. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, str. 57-67.

47. Jarmuszkiewicz W (1998) Molekularna charakterystyka oksydazy alternatywnej. W: Augustyniak H, Oczkowski M (red.) *Biologia Molekularna Mitochondriów*. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, str. 57-67
48. Siedow JN, Umbach AL (2000) The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation and regulatory diversity. *Biochim Biophys Acta* 1459: 432-439
49. Juszczak IM, Rychter A (2003) Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochim Polon* 50: 1257-1271
50. Sluse FE, Jarmuszkiewicz W (2002) Uncoupling proteins outside the animal and plant kingdoms: functional and evolutionary aspects. *FEBS Lett* 510: 117-120
51. Purvis AC (1997) Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiol Plant* 100: 165-170
52. Popov VN, Simonian RA, Skulachev VP, Starkov AA (1997) Inhibition of the alternative oxidase stimulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in plant mitochondria. *FEBS Lett* 48: 87-90
53. Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8271-8276
54. Fang J, Beattie DS (2003) Alternative oxidase present in procyclic *Trypanosoma brucei* may act to lower the mitochondrial production of superoxide. *Arch Biochem Biophys* 414: 294-302
55. Czarna M, Jarmuszkiewicz J (2005) Activation of alternative oxidase and uncoupling protein lowers hydrogen peroxide formation in amoeba *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Lett* 579: 3136-3140
56. Rychter A (1996) Roślinny łańcuch oddechowy. *Postępy Biochem* 42: 268-276
57. Wahllander A, Soboll S, Sies H, Linke I, Müller M (1979) Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferases. *FEBS Lett* 97: 138-140
58. Rebrin L, Kamzalov S, Sohal RS (2003) *Free Rad Biol Med* 35: 626-635
59. Wood ZA, Schroeder E, Robin Harris J, Poole LB (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28: 32-40
60. Banmeyer I, Marchand C, Verhaeghe C, Vucic B, Rees JF, Knoops B (2004) Overexpression of human peroxiredoxin 5 in subcellular compartments of Chinese hamster ovary cells: effects on cytotoxicity and DNA damage caused by peroxides. *Free Rad Biol Med* 36: 65-77
61. Jarmuszkiewicz W (2001) Uncoupling protein in mitochondria of higher plants and some microorganisms. *Acta Biochim Polon* 48: 145-155
62. Jezek P (2002) Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins – UCPn. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1190-1206
63. Kowaltowski AJ, Costa ADT, Vercesi AE (1998) Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Lett* 425: 213-221
64. Talbot DA, Lambert AJ, Brand MD (2004) Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. *FEBS Lett* 556: 111-115
65. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N (2004) Mitochondrial superoxide: production, biological effect, and activation of uncoupling proteins. *Free Rad Biol Med* 37: 755-767
66. Gray GR, Maxwell DP, Villarimo AR, McIntosh L (2004) Mitochondria/nuclear signaling of alternative oxidase gene expression occurs through distinct pathways involving organic acids and reactive oxygen species. *Plant Cell Reports* druk on line
67. Maxwell DP, Nickels R, McIntosh L (2002) Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant J* 29: 269-279
68. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S (2003) Mitochondria. Releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112: 481-490
69. Bartosz G (1997) Oxidative stress in plants. *Acta Physiol Plant* 19: 47-64
70. Scandalios JG (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38: 995-1014

## Role of mitochondria in reactive oxygen species generation and removal; relevance to signaling and programmed cell death

Małgorzata Czarna, Wiesława Jarmuszkiewicz 

Laboratory of Bioenergetics, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Adam Mickiewicz University, 10 Fredry St., 61-701 Poznań, Poland

e-mail: wiesiaj@amu.edu.pl

**Key words:** mitochondria, reactive oxygen species, antioxidant system, programmed cell death

### ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are universal products of aerobic metabolism, which can be also produced in stress conditions. In eukaryotic cells, mitochondria are the main source of ROS. The main mitochondrial sites of ROS formation are electron carriers of respiratory chain. However, there are also other enzymatic sites capable of ROS generation in different mitochondrial compartments.

Reactive oxygen species can cause serious damage to many biological macromolecules, such as proteins, lipids and nucleic acids, which oxidation leads to a loss of their biological properties and eventually to a cell death. Mitochondria, which are also exposed to harmful ROS action, have a defense system that decreases ROS production (first line of defense) or removes generated ROS (second line of defense). Mitochondrial antioxidant system involves proteins that decrease ROS formation, enzymes that directly react with ROS, and non-enzymatic antioxidants that also remove ROS and other oxygen derivatives.

Mitochondrial ROS can also act as signal messengers and modify operation of many routes in different cell compartments. Mitochondrial ROS are also important in execution of programmed cell death.

# Mechanizmy i regulacja programowanej śmierci komórek

## STRESZCZENIE

Programowana śmierć komórki zwykle utożsamiana jest z apoptozą, choć planową sekwencję zdarzeń obserwuje się również w autofagii, katastrofie mitotycznej a nawet niekiedy w nekrozie. Proces apoptozy rozpoczyna się od aktywacji inicjatorowych kaspaz (proteaz cysteinowych) w kompleksach sygnałowych: apoptosomie (na wewnętrznym szlaku apoptozy, tzw. mitochondrialnym) lub degradosomie (na szlaku zewnętrznym, tzw. szlaku receptorów śmierci). Kaskada proteolityczna prowadzi, poprzez aktywację kolejnych kaspaz oraz DNaz do trawienia składników komórki. Centralną rolę w apoptozie odgrywają mitochondria, uwalniając cytochrom *c* – niezbędny składnik apoptosomu, Smac/Diablo i Omi/HtrA2 – wiążące inhibitory kaspaz (IAPs), a także endonukleazę G i AIF – odpowiedzialne za degradację DNA. Czynniki te wydostają się z mitochondrium kanałami utworzonymi przy udziale białek Bax i Bak. Proces jest szybki i zupełny, prawdopodobnie dzięki dokonywanej pod wpływem mechanoenzymów przebudowie struktury organellum oraz zachodzącej w błonie wewnętrznej peroksydacji lipidów i proteolizie. Uwalnianie czynników mitochondrialnych może być stymulowane przez białko p53, histon H1.2 i poli(ADP-rybozę), wysyłane z jądra pod wpływem stresu cyto- i genotoksycznego, pod kontrolą kinazy cAbl.

## WPROWADZENIE

Wiedza o programowanej śmierci komórek, często utożsamianej z apoptozą jako najbardziej znanym jej przejawem, rozwija się bardzo dynamicznie. Tylko w ostatnim roku w literaturze fachowej ukazało się ponad 15000 prac na ten temat. W organizmach wielokomórkowych kontrolowana śmierć określonych grup komórek zachodzi w okresie wzrostu i różnicowania (modelowanie kształtu); również w dorosłym życiu mechanizm ten pozwala na usuwanie komórek rozpoznawanych jako niepotrzebne (regulacja składu populacji komórek odpornościowych), uszkodzone, przenoszące mutacje lub zakażone. Oporność na apoptozę jest często spotykaną cechą komórek nowotworowych. Natomiast nadmierna apoptoza związana jest z chorobami degeneracyjnymi i bezpłodnością, prowadzić może do rozwoju chorób autoimmunologicznych. Zrozumiałe więc jest, że poznanie mechanizmów kierujących przebiegiem śmierci komórki i w rezultacie znalezienie przełączników „życie–śmierć” ma ogromne znaczenie.

Istnieje wiele alternatywnych i krzyżujących się szlaków programowanej śmierci komórki. Może to być proces stopniowy i regularny jak apoptoza, lub gwałtowny i nieuporządkowany jak nekroza. Ostatnie odkrycia dowodzą, że nekroza też może być uwarunkowana aktywnością specyficznych białek.

W łańcuchu zdarzeń doprowadzających do śmierci komórki nadal bezsporna pozostaje centralna rola mitochondriów, jako magazynów czynników aktywujących enzymy wykonawcze: kaspazy i DNazy. Mechanizmy uwalniania tych czynników z mitochondrium pozostają niewyjaśnione. Jednak wyniki badań *in vitro* i genetycznych wskazują, że proapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 są niezbędne do utworzenia kanałów umożliwiających wypływ białek z przestrzeni międzymbłonowej tych organelli. Niedawno stwierdzono, że na uwalnianie aktywatorów apoptozy z mitochondriów bezpośrednio lub pośrednio wpływają, wysyłane z jądra komórkowego białko p53, histon H1.2 i poli(ADP-ryboza). Co raz wyraźniej zarysowuje się współdziałanie cytoplazmy, jądra i mitochondriów w realizacji i regulacji procesów śmierci komórki.

Obecna praca jest próbą przedstawienia najnowszych poglądów na temat mechanizmów i regulacji śmierci komórek, zwłaszcza komórek ssaków. Wobec ogromu materiału, zdecydowano się skupić na wybranych faktach i zjawiskach odkrytych w ostatnich latach.

## Iwona Grądzka

Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia, Warszawa

Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia, ul. Dorodna 16, 03-950 Warszawa; e-mail: iwonag@ichtj.waw.pl, tel./faks: (022) 811 07 36

Artykuł otrzymano 2 września 2005 r.  
Artykuł zaakceptowano 4 października 2005 r.

**Słowa kluczowe:** programy śmierci komórki, szlaki apoptozy: zewnętrzny (receptorów śmierci) i wewnętrzny (mitochondrialny), uwalnianie mitochondrialnych czynników apoptozy, kinaza cAbl, p53, histon H 1.2, poli(ADP-ryboza)

**Wykaz skrótów:** AIF (ang. *apoptosis inducing factor*) – mitochondrialny czynnik indukcji apoptozy; Apaf-1 (ang. *apoptotic protease-activating factor 1*) – składnik apoptosomu, niezbędny do aktywacji kaspazy 9; ATM (ang. *ataxia telangiectasia mutated*) – kinaza białkowa aktywowana po uszkodzeniu DNA; CARD (ang. *caspase recruitment domain*) – domena adaptorowa Apaf-1 i kaspazy 9; Chk2 (ang. *checkpoint kinase 2*) – kinaza punktu kontrolnego fazy G1; DD (ang. *death domain*) i DED (ang. *death effector domain*) – domeny adaptorowe białek tworzących degradosom; DFF40/CAD (ang. *DNA fragmentation factor 40/caspase-activated DNase*) – DNaza aktywowana przez kaspazy; DFF45/ICAD (ang. *DNA fragmentation factor 45/inhibitor of caspase-activated DNase*); DISC (ang. *death-inducing signaling complex*) – kompleks sygnałowy, w którym aktywowana jest kaspaza 8 (degradosom); FADD (ang. *FAS-associated death domain containing protein*) – białko adaptorowe łączące się z receptorem FAS; FLIP (ang. *FLICE inhibitory protein*, gdzie FLICE jest synonimem kaspazy 8, ang. *FADD like interleukin 1 $\beta$  converting enzyme*) – swoisty inhibitor kaspazy 8, indukowany przez czynnik transkrypcyjny NF $\kappa$ B; IAPs (ang. *inhibitors of apoptotic proteins*) – cytoplazmatyczne inhibitory kaspaz; NF $\kappa$ B (ang. *nuclear factor  $\kappa$ B*) – czynnik transkrypcyjny aktywowany m.in. przez TNF; Omi/HtrA2 (ang. *high temperature requirement A2 serine protease*) – mitochondrialny czynnik wiążący i dezaktywujący inhibitory kaspaz (IAPs); PAR (ang. *poly(ADP-ribose)*) – poli(ADP-ryboza); PARP (ang. *poly(ADP-ribose)polymerase*) – polimeraza PAR; Rb (ang. *retinoblastoma*) – białko cyklu komórkowego; ROS (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu (RFT); SmacC/Diablo (ang. *second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pl*) – mitochondrialny czynnik wiążący inhibitory kaspaz (IAPs); TNF (ang. *tumour necrosis factor*) – cytokina, czynnik martwicy nowotworu; TOR (ang. *target of rapamycin*) – kinaza zapobiegająca tworzeniu się autofagosomów; TRADD (ang. *TNF receptor-associated death domain containing protein*) – białko adaptorowe łączące się z receptorem TNF; TRAIL (ang. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) – cytokina, czynnik indukcji apoptozy; TGF $\beta$  (ang. *tumor growth factor  $\beta$* ) – czynnik wzrostu nowotworu

**Podziękowanie:** Autorka pragnie podziękować pani Profesor Irenie Szumiel za dyskusję i cenne uwagi w czasie pisania tej pracy

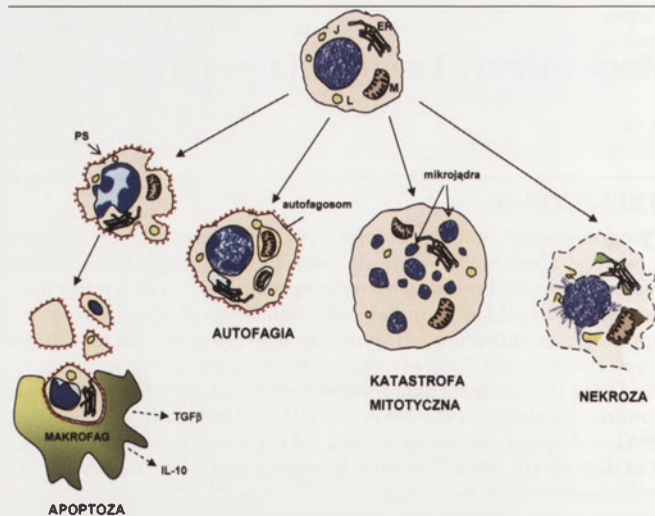
## RODZAJE ŚMIERCI KOMÓRKI

Śmierć może przyjmować rozmaite formy, zależnie od rodzaju i dawki czynnika wyzwalającego, środowiska zewnętrznego i wewnętrznego a także typu komórki. Rycina 1 wskazuje cechy charakterystyczne czterech najczęściej spotykanych typów śmierci komórki [1].

Apoptoza jest procesem najczęściej spotykanym i najlepiej poznany. Pod wpływem wielu bodźców, zarówno zewnętrznych (np. usunięcie czynników wzrostu i składników pokarmowych, niedotlenienie, działanie cytokin z grupy tzw. ligandów śmierci) jak i wewnętrznych (np. uszkodzenie DNA, stres oksydacyjny, mutacje) dochodzi do uruchomienia programu degradacji: cytoplazma obkurcza się, wewnętrzne błony mitochondriów ulegają depolaryzacji, chromatyna w jądrze kondensuje. W późniejszym stadium komórka rozpada się na ciała apoptotyczne zawierające fragmenty jądra i organelle. Do końca tego procesu błony (zewnętrzna i organelli) zachowują integralność. Dzięki markerom fagocytozy przemieszczającym się na powierzchnię błony cytoplazmatycznej, głównie fosfatydyloserynie (PS), komórka apoptotyczna przekazuje makrofagom informację „zjedz mnie”. Połączenie PS ze swoistymi receptorami na powierzchni komórki fagocytydującej indukuje zmiany w jej cytoskieletcie i oplaszczenie komórki apoptotycznej. Jednocześnie fagocyt wydziela czynnik wzrostowy TGF $\beta$  i interleukinę IL-10 – zapobiegające powstawaniu reakcji immunologicznej skierowanej przeciw antygenom własnego organizmu [2]. Proces apoptozy zachodzi według precyzyjnego i rozbudowanego programu, o wielu alternatywnych i krzyżujących się ze sobą szlakach, na których dochodzi do aktywacji specyficznych proteaz i nukleaz, głównie dzięki czynnikom uwalnianym z mitochondriów.

Autofagia jest zjawiskiem fizjologicznym obserwowanym w procesach różnicowania komórek lub przy niedostatecznej podaży składników odżywczych i czynników wzrostu. Umożliwia obrót białek i organelli w komórce a tym samym przemodelowanie struktury i pozyskanie substratów życiowych. Na terenie cytoplazmy powstają, prawdopodobnie z siateczki śródplazmatycznej, pęcherzyki autofagalne (autofagosomy), czasem zawierające uszkodzone organelle. Łączą się one z lizosomami. Zawartość pęcherzyków trawiona jest przez enzymy lizosomowe, bez udziału kaspaz. Chromatyna w jądrze ulega tylko częściowej kondensacji, na powierzchni komórki pojawia się fosfatydyloseryna. Nadmierna autofagia, zwłaszcza, gdy ulegają jej mitochondria, prowadzi do śmierci. Stwierdzono, że obrót składników komórki znajduje się pod kontrolą m.in. kinazy TOR, która zapobiega tworzeniu się autofagosomów. Inhibitor TOR – rapamycyna, a także długotrwałe pozbawienie komórki składników odżywczych lub czynników wzrostu, mogą wyzwolić śmierć autofagalną [3].

Na katastrofę mitotyczną narażone są komórki szybko dzielące się, z defektem punktu kontrolnego G2/M (np. gdy nieaktywne jest białko p53) lub tzw. punktu kontrolnego wrzeciona mitotycznego, gdzie ważną rolę odgrywa surwiwina (białko należące do rodziny inhibitorów kaspaz, jednak niezdolne do pełnienia tej funkcji samodzielnie *in vivo*) [4,5,6]. Po uszkodzeniu DNA dochodzi w takich wa-



Rycina 1. Cechy morfologiczne najczęściej spotykanych typów śmierci komórki. ER – siateczka śródplazmatyczna, J – jądro komórkowe, L – lizosom, M – mitochondrium, PS – fosfatydyloseryna, TGF $\beta$  – czynnik wzrostu nowotworu, IL-10 – interleukina 10.

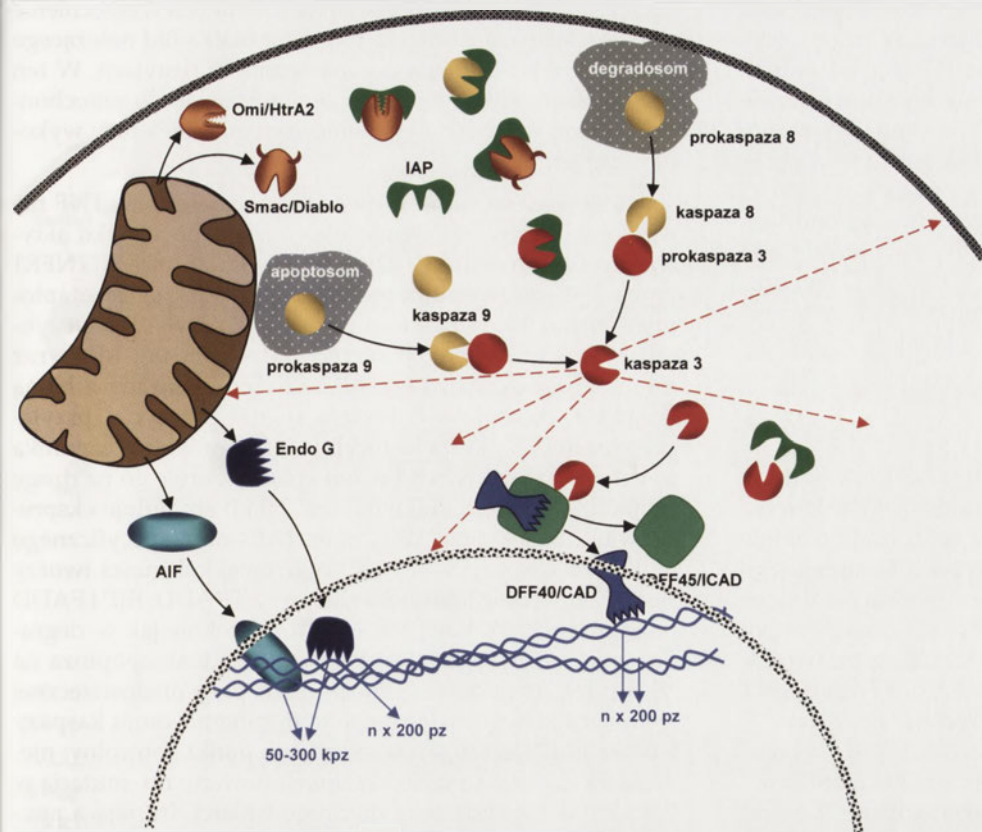
runkach do mitozy przed ukończeniem naprawy, wskutek czego podział jądra jest nieprawidłowy a mitozie nie towarzyszy cytokineza. Powstają poliploidalne komórki olbrzymie o wielu mikrojądrach, które następnie zwykle wchodzą w apoptozę.

Nekroza określana bywa jako „śmierć w wypadku”, ponieważ najczęściej następuje pod wpływem gwałtownego i silnego urazu (np. niedokrwienie, infekcja, szok tlenowy lub temperaturowy). Bodźce te powodują załamanie fizjologicznych funkcji komórki niezbędnych do zachowania homeostazy, takich jak transport jonów, produkcja energii czy utrzymanie równowagi pH. Objawia się to pęcznieniem i nieuporządkowanym rozpadem komórki wraz z jej organelami, wakuolizacją, losowym cięciem DNA. Produkty rozpadu uwalniają się na zewnątrz wywołując reakcję zapalną. Wydawało by się, że tak gwałtowny i nieuporządkowany proces nie jest kontrolowany. Tym niemniej pojawianiu się objawów nekrozy sprzyja np. obecność białka z rodziny Bcl-2, Bip3, które obniża potencjał transbłonowy mitochondriów [7], aktywna kinaza RIP na szlaku FAS/FADD [1] oraz jony Ca<sup>2+</sup>, ceramid i pobudzenie szlaku JNK/p38 [8]. Okazuje się więc, że wprowadzony na początku badań podział na śmierć programowaną i nekrozę nie zawsze jest ostro zarysowany.

## ENZYMY WYKONAWCZE I ICH SUBSTRATY

Enzymami, które przeprowadzają degradację składników komórki są proteazy i nukleazy (Ryc. 2). Najważniejszą grupą proteaz biorących udział w apoptozie są kaspazy – mające cystynę w centrum aktywnym i rozszczepiające wiązania peptydowe w pozycji Asp-Xxx [9]. Białka te znajdują się w cytoplazmie w postaci nieaktywnej, jako zymogeny i ulegają aktywacji po odłączeniu fragmentu cząsteczki. Po tym jednak nadal ich aktywność proteolityczna może być skutecznie hamowana przez związanie naturalnych białkowych inhibitorów kaspaz, IAPs [10,11]. Dopiero uwolnione z mitochondriów czynniki Smac/Diablo [12,13] i Omi/HtrA2 [14,15], łącząc się z IAPs, odblokowują kaspazy. Działanie





Rycina 2. Enzymy wykonawcze procesu apoptozy. Aktywacja kaspaz (proteaz cysteinowych) rozpoczyna się w kompleksach sygnałowych: apoptosomie – na wewnętrznym (mitochondrialnym) szlaku apoptozy lub w degradosomie – na zewnętrznym szlaku apoptozy (szlaku receptorów śmierci). Kaspazy inicjatorowe (kaspaza 8 i 9) aktywują kaspazy wykonawcze (kaspaza 3), te z kolei aktywują DNazę DFF40/CAD oraz trawią białka komórkowe. Aktywne kaspazy są blokowane przez ich inhibitory cytoplazmatyczne – IAPs; blokada ta może być zniesiona przez białka proapoptotyczne uwalniane z mitochondrium – Smac/Diablo i Omi/HtrA2, które wiążą IAPs. AIF i Endo G – również uwalniane z mitochondrium – przemieszczają się do jądra, gdzie, niezależnie od kaspaz indukują kondensację chromatyny i cięcie DNA.

Omi/HtrA2 może być dodatkowo wzmocnione, ponieważ białko to wykazuje aktywność proteazy serynowej. Same kaspazy również mogą znosić hamowanie przez IAPs: np. kaspaza 3 odcina z kaspazy 9 domenę odpowiedzialną za reakcję z XIAP; fragment ten wiąże się z inhibitorem a skrócona kaspaza 9 zachowuje aktywność [16].

Wyróżnia się kaspazy inicjatorowe i efektorowe [17]. Do tych pierwszych należą kaspazy 9 i 2, aktywowane przez autoproteolizę w apoptosomie na tzw. wewnętrznym (mitochondrialnym) szlaku apoptozy, oraz kaspazy 8 i 10 – aktywowane w degradosomie na tzw. zewnętrznym szlaku apoptozy (szlaku receptorów śmierci) [18]. Kaspazy inicjatorowe częściowo hydrolizują i w ten sposób aktywują efektorowe kaspazy 3, 6 i 7.

Substraty kaspaz można podzielić na kilka grup [17]:

**Białka zaangażowane w apoptozę**, m.in. kaspazy efektorowe 3, 6 i 7, proapoptotyczne białko Bid z rodziny bcl-2, czynnik fragmentacji DNA, podjednostka p75 oddechowego kompleksu I w mitochondriach, proapoptotyczna kinaza białkowa MEKK1 (aktywowana przez kaspazę) i antyapoptotyczna kinaza RIP (dezaktywowana przez kaspazę). Ich hydroliza wzmacnia sygnał śmierci i aktywuje dalsze etapy degradacji.

**Białka strukturalne**, jak laminy jądrowe, białka sieci włóknienek cytoplazmatycznych i połączeń międzykomórkowych. Ich rozpad daje charakterystyczne objawy morfologiczne: odczepianie się komórek od podłoża, obkurczenie, uwypuklenia błony cytoplazmatycznej i jądrowej a następnie fragmentację na ciała apoptotyczne.

**Białka naprawy DNA**, m.in. kinazy białkowe DNA-PK i ATM, Rad51, polimeraza poli(ADP-rybozy) – PARP. Zahamowanie naprawy DNA pozwala komórce zaoszczędzić ATP wykorzystywane w przebiegu apoptozy.

**Białka cyklu komórkowego**, m.in. cdc27, Wee1, inhibitory kinaz cyklicznych p21CIP1 i p27KIP1, białko Rb. Efektem jest odblokowanie cyklu podziałowego, co wiąże się z uruchomieniem proapoptotycznej sygnalizacji z jądra.

Fragmentacja DNA zachodzić może zarówno pod wpływem enzymów aktywowanych przez kaspazy jak i niezależnych od kaspaz. Obecna w jądrze DNaza DFF40/CAD jest w żywej komórce związana z podjednostką inhibitorową DFF45/ICAD. Odłączenie inhibitora przeprowadzane przez kaspazy 3 i 7 a następnie połączenie DFF40/CAD z chromatyną aktywuje enzym [19]. DNA jest początkowo cięte na odcinki 50–300 kbp (kilopar zasad) a następnie na mniejsze odcinki oligonukleosomowe ( $n \times 200$  pz, tzw. drabinka nukleosomowa w elektroforezie). Uwalniające się z mitochondrium AIF [20] i endonukleaza G (Endo G) [21] nie wymagają aktywacji przez kaspazy. Mechanizmu działania AIF dotąd nie wyjaśniono. Wiadomo, że po przemieszczeniu do jądra białko to, obdarzone silnie ujemnym ładunkiem elektrostatycznym, wiąże się z DNA. Być może w ten sposób ułatwia ono dostęp do DNA nukleazom i proteazom. W efekcie następuje kondensacja chromatyny i cięcie DNA na fragmenty o dużej masie cząsteczkowej (tzw. rzadkie cięcia, 300–700 kbp) [22]. Niewykluczone, iż AIF samo posiada ukrytą aktywność nukleazową lub/i współdziała z endonukleazą G (jak to się dzieje u robaka *Caeno-*

*rhabditis elegans*) [23]. Endo G występuje w mitochondriach w dużych ilościach i początkowo sądzono, że uczestniczy w replikacji mitochondrialnego DNA (mtDNA) [24]. Jednak niedawno ustalono, że enzym zlokalizowany jest wyłącznie w przestrzeni międzybłonowej (replikacja mtDNA zachodzi w macierzy) i posiada niską swoistość substratową [25]. Jednocześnie potwierdzono przemieszczanie się Endo G pod wpływem bodźców apoptogennych z mitochondrium do jądra, gdzie wywołuje ona internukleosomowe cięcie DNA [21]. W porównaniu z DFF40/CAD, Endo G wykazuje 100-krotnie niższą aktywność i przypuszcza się, że *in vivo* współdziała z egzonukleazami i DNazą I [26].

## ZEWNĘTRZNY SZLAK APOPTOZY – SZLAK RECEPTORÓW ŚMIERCI

Zewnętrzny szlak apoptozy (Ryc. 3) [17,27], wyzwalany przez swoiste cytokiny, jest szczególnie aktywny w komórkach układu odpornościowego, gdzie może samodzielnie doprowadzić do śmierci. W innych typach komórek jego sygnały wymagają wzmocnienia przez czynniki uwalniane z mitochondrium. Receptory śmierci trimery w poprzek błony komórkowej. Sygnał rozpoczyna się po związaniu odpowiedniego ligandu (cytokiny): FASL z FAS/CD95/Apo1, TRAIL/APO2 z DR4/5, TNF z TNFR1.

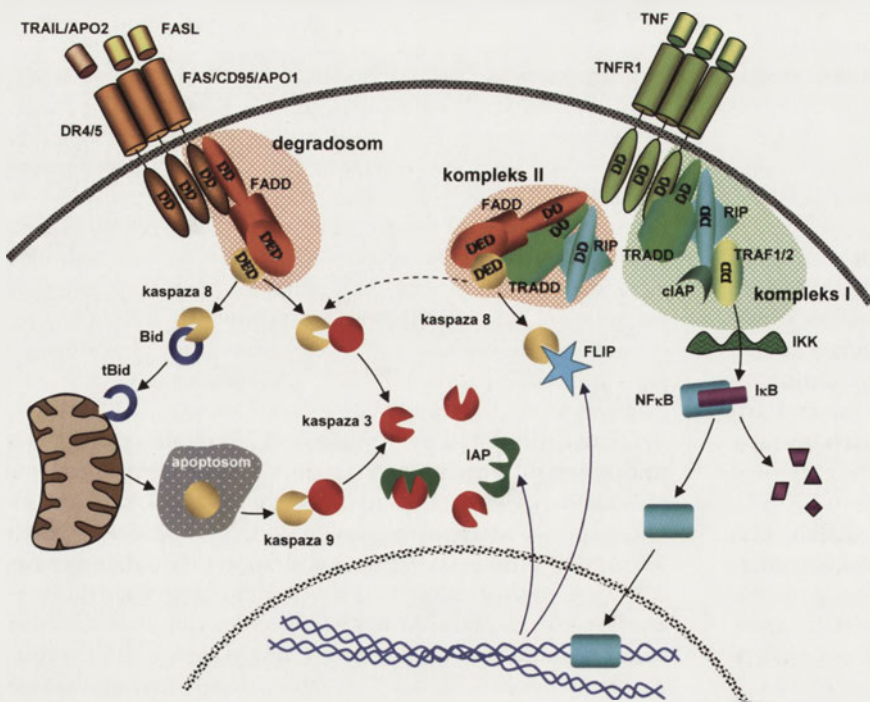
Po przyłączeniu ligandu następuje zmiana konformacyjna receptora i odsłonięcie tzw. domen śmierci, DD, od strony cytoplazmatycznej błony, co umożliwi przyłączenie białek posiadających podobne domeny. Do receptorów FAS i DR4/5 przyłącza się, domeną DD, adaptorowe białko FADD/MORT1 i ono z kolei wiąże prokaspazę 8, przez połączenie domen DED. W ten sposób powstaje kompleks sygnałowy DISC, inaczej zwany degradosomem. W kompleksie tym, dzięki tzw. indukowanemu zbliżeniu, cząsteczki prokaspazy 8 ulegają autoproteolizie i powstaje aktywna kaspaza 8. Jej ilość w komórkach typu I (np. tymocytach) wystarcza do aktywacji kaspaz efektorowych. W komór-

kach typu II (np. hepatocytach) niezbędne jest wzmocnienie sygnału: kaspaza 8 odłącza fragment białka Bid należącego do rodziny bcl-2; ulega ono następnie mirystylacji. W ten sposób zaktywowane, tBid przemieszcza się do mitochondriów wpływając na uwolnienie szeregu białek fazy wykonawczej apoptozy.

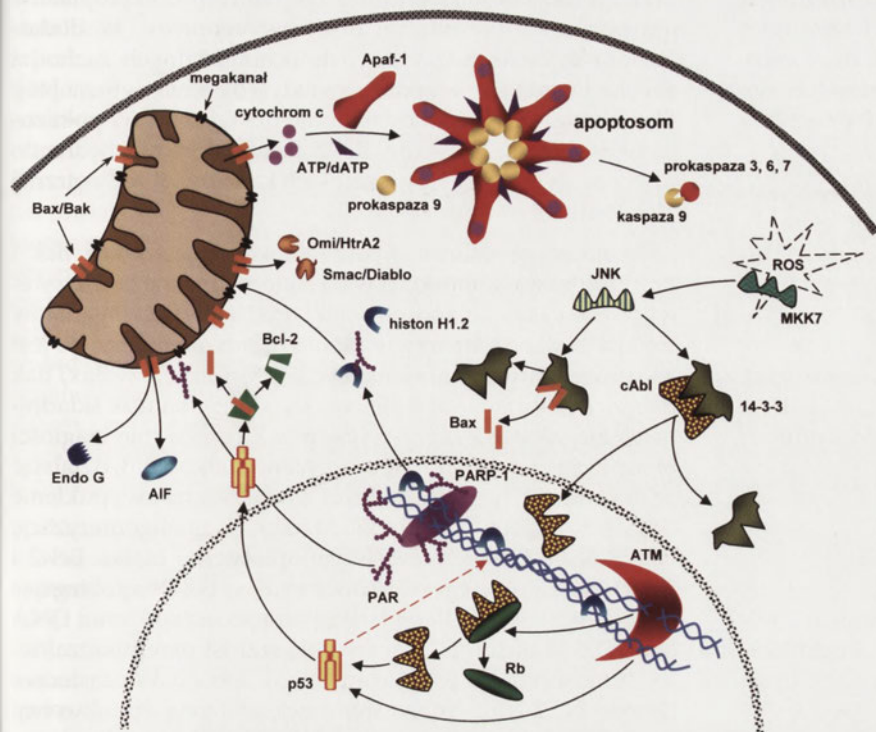
Paradoksalnie, szlak prowadzący od receptora TNF nie wywołuje śmierci spontanicznie – jak w przypadku aktywacji receptorów FAS i DR4/5 [28]. Po aktywacji TNFR1 przez TNF, do receptora preferencyjnie dołącza się adaptorowe białko TRADD, które umożliwi przyłączenie czynnika TRAF1/2 i kinazy serynowo-treoninowej RIP wraz z inhibitorem kaspaz – cIAP 1/2. Ten związany z błoną kompleks (kompleks I) wysyła sygnał przeżycia: przyłącza kinazę IKK, która fosforyluje IκB – inhibitor czynnika transkrypcyjnego NFκB i w ten sposób kieruje go na drogę proteolizy poprzez ubikwitylację. NFκB stymuluje ekspresję wielu białek przeżycia, m.in. IAPs oraz specyficznego inhibitora kaspazy 8 – FLIP. W drugiej kolejności tworzy się w cytoplazmie kompleks złożony z TRADD, RIP i FADD (kompleks II). W kompleksie tym, podobnie jak w degradosomie, aktywowana jest kaspaza 8. Jednak apoptoza na tej drodze rozpocząć się może tylko przy niedostatecznej stymulacji NFκB, a więc niepełnym zahamowaniu kaspazy 8 przez FLIP. Jest to swojego rodzaju punkt kontrolny: niedostatek czynnika przeżycia, spowodowany np. mutacją w IκB [29] kieruje komórkę na drogę śmierci. Inicjująca apoptozę kaspaza 8 aktywuje kaspazy wykonawcze 3, 6 i 7 a te z kolei aktywują nukleazy i rozwija się planowy proces degradacji składników komórki.

## WENĘTRZNY SZLAK APOPTOZY: WSPÓLDZIAŁANIE SYGNAŁÓW Z CYTOPLAZMY, JĄDRA I MITOCHONDRIMUM

Wewnętrzny szlak apoptozy indukowany jest zwykle przez stres metaboliczny lub genotoksyczny. Rozpoczy-



**Rycina 3.** Zewnętrzny szlak apoptozy (szlak receptorów śmierci). Błonowe receptory (DR4/5, FAS/CD95/APO1), po związaniu specyficznych ligandów odsłaniają domeny śmierci (DD), dzięki którym przyłączają białka o podobnych domenach, tworząc degradosomy – kompleksy sygnałowe, w których aktywowane są kaspazy inicjatorowe (kaspaza 8). Te z kolei, jeśli ich ilość jest wystarczająca, zapoczątkują kaskadę proteolityczną aktywując kaspazy wykonawcze (kaspaza 3). Możliwe jest wzmocnienie sygnału generowanego przez szlak receptorów śmierci: rozszczepienie białka Bid przez kaspazę 8 prowadzi do uruchomienia wewnętrznego (mitochondrialnego) szlaku apoptozy i aktywacji następnego kaspaz inicjatorowych (kaspaza 9). Paradoksalnie, związanie receptora TNFR1 z jego ligandem, TNF, prowadzi w pierwszej kolejności do utworzenia tzw. kompleksu przeżycia (kompleks I) i aktywacji NFκB. Ten czynnik transkrypcyjny stymuluje ekspresję m. in. inhibitorów kaspaz, IAPs oraz swoistego inhibitora kaspazy 8 – FLIP, w rezultacie zahamowany zostaje proces apoptozy. Dopiero w drugiej kolejności tworzy się na tej drodze sygnałowy kompleks II, w którym może być aktywowana kaspaza 8. Niedostateczna aktywacja NFκB może skierować komórkę na drogę apoptozy.



Rycina 4. Wewnętrzny (mitochondrialny) szlak apoptozy: współdziałanie mitochondrium z cytoplazmą i jądrem. Uwalniany z mitochondrium pod wpływem czynników proapoptycznych cytochrom c indukuje tworzenie się apoptosomu – kompleksu, w którym, przy współdziałaniu Apaf-1 i ATP/dATP, aktywowana jest inicjatorowa kaspaza 9. Inne mitochondrialne białka uczestniczące w procesie apoptozy to Omi/HtrA2 i Smac/Diablo, które wiążą inhibitory kaspaz (IAPs) oraz AIF i endonukleaza G (Endo G) – odpowiedzialne za kondensację chromatyny i cięcie DNA. Pod wpływem stresu cyto- i genotoksycznego, w cytoplazmie oraz w jądrze uruchamiane są kaskady kinaz, które doprowadzają do wysłania z jądra m.in. białka p53, histonu H1.2 i poli(ADP)rybozy. Czynniki te indukują wpływ białek apoptotycznych z mitochondrium. Nadzrędną rolę w sygnalizacji cytoplazma-jądro-mitochondrium odgrywa kinaza cAbl.

na się z chwilą uwolnienia z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium do cytoplazmy szeregu czynników białkowych (Ryc. 4) [17,27]. Bódcze indukujące wyrzut apoptotycznych białek z mitochondrium, jak reaktywne formy tlenu, długotrwały wzrost stężenia wapnia w cytoplazmie, zachwianie równowagi energetycznej, zmiany w komórkowym potencjale oksydoredukcyjnym, powodują otwarcie megakanalów mitochondrialnych na styku błon zewnętrznej i wewnętrznej [30]. Jest to warunek do utworzenia się w następnej kolejności odpowiednio szerokich kanałów przy udziale Bak i Bax – proapoptotycznych białek z rodziny bcl-2. Przez te kanały w zewnętrznej błonie organellum wydostają się białkowe czynniki warunkujące fazę wykonawczą apoptozy.

Cytochrom c wiąże domeny WD 40 w adaptorowym białku Apaf-1, ułatwiając mu związanie prokaspazy 9. Łączenie Apaf-1 i prokaspazy 9 zachodzi dzięki domenom CARD obecnym w obu białkach. Ukształtowanie domeny CARD jest bardzo podobne jak domen DD i DED [31], co świadczy o ewolucyjnym konserwatywnym zewnętrznego i wewnętrznego układu kaskad proapoptotycznych. Do Apaf-1 przyłącza się ATP/dATP, co prawdopodobnie indukuje zmianę konformacyjną ułatwiającą kształtowanie się heptameru. W tym kompleksie, zwanym apoptosomem [32], prokaspaza 9 znajduje się w centrum. Podobnie jak aktywacja kaspazy 8 w degradosomie, również aktywacja kaspazy 9 w apoptosomie zachodzi dzięki tzw. indukowanemu zbliżeniu. Jak przedstawiono poprzednio (Ryc. 2), kaspaza 9 aktywuje kaspazy efektorowe 3, 6 i 7 zaś białka Smac/Diablo i OMI/Htr2 wiążą się z IAPs dzięki czemu odblokowują kaspazy. AIF i Endo G przemieszczają się do jądra, gdzie zapoczątkują degradację DNA niezależną od kaspaz.

Obecnie, na kilku liniach nowotworowych człowieka i fibroblastach myszy intensywnie badane są powiązania syg-

nalizacyjne między cytoplazmą, jądrem i mitochondrium. W sygnalizacji tej istotną rolę odgrywa kinaza tyrozynowa cAbl (Ryc. 4) [33, 34], występująca zarówno w cytoplazmie jak i w jądrze. W cytoplazmie zatrzymywana jest przez białka 14-3-3, blokujące jej sekwencję lokalizacji jądrowej. Stres oksydacyjny, uszkodzenie DNA lub sygnał idący od receptorów śmierci przyczyniają się do aktywacji cAbl. W cytoplazmie zostaje uruchomiona kaskada: kinaza stresu - MKK7 fosforyluje kinazę JNK a ta z kolei fosforyluje białka 14-3-3, co pozwala na uwolnienie i przemieszczenie do jądra cAbl. W ten sam sposób JNK uwalnia białko Bax, dzięki czemu może się ono wbudować w błonę mitochondrium [35]. W jądrze, cAbl wiąże się z białkiem Rb [36]. Pęknięcia DNA, powstające np. po działaniu promieniowania jonizującego, aktywują czujnikową kinazę tyrozynową ATM i ta, fosforylując, unieczynnia białko Rb, zaś aktywuje cAbl. Białko Rb może też ulec degradacji pod wpływem kaspaz – w ten sposób sygnał zapoczątkowany przez cytokinę TNF przyczynia się do aktywacji cAbl [34]. Dodatkowo, cAbl może być aktywowana przez kinazę punktu kontrolnego fazy G1-Chk2. Aktywna kinaza cAbl jest głównym enzymem stabilizującym p53 – czynnik transkrypcyjny odpowiedzialny m.in. za ekspresję szeregu czynników proapoptotycznych, m. in. Noxa i Puma – białek z rodziny bcl-2 z samą domeną BH3, Bax, zależnego od p53 proapoptotycznego białka p53AIP1, DR5, FAS [37, 38].

Okazało się ponadto, że białko p53 przemieszcza się z jądra do cytoplazmy i tam wykazuje bezpośrednie działanie proapoptotyczne, a wynik, w postaci wypływu cytochromu c z mitochondriów, widoczny jest już po 30 minutach od uszkodzenia DNA przez promieniowanie jonizujące lub etopozyd [39-41]. P53 może bezpośrednio aktywować Bax a poza tym rozbija nieaktywne kompleksy Bax i Bak z ich antagonistami: Bcl-x1 i Bcl-2, działając podobnie jak proapoptotyczne białka z samą domeną BH3 [40]. Pod wpływem

podwójnoniciowych pęknięć w DNA, w sposób zależny od p53, do cytoplazmy przemieszcza się również histon H1.2 [42]. Przypuszcza się, że białko to, podobnie jak tBid, może wbudowywać się w lipidową warstwę zewnętrznej błony mitochondrium i stymulować tworzenie porów przez Bak i Bax.

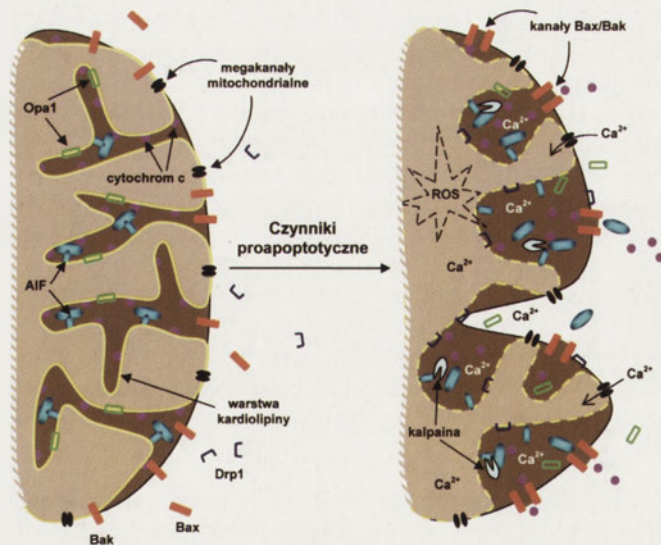
W odpowiedzi na uszkodzenie DNA, w jądrze gwałtownie wzrasta aktywność polimerazy poli(ADP-rybozy), PARP-1 i nagromadzają się rozgałęzione polimery ADP-rybozy, PAR. Wydostają się one do cytoplazmy i swoiście indukują uwalnianie AIF z mitochondrium [43] zapoczątkowując apoptozę niezależną od kaspaz. Stwierdzono, że szereg białek, m.in. p53, p21, histony, silnie niekowalencyjnie oddziałuje z PAR. Być może ta modyfikacja nadaje białkom zdolność zmiany przepuszczalności błon mitochondrium dla AIF.

### UWALNIANIE Z MITOCHONDRIMUM BIAŁEK UCZESTNICZĄCYCH W PROCESIE APOPTOZY

Mechanizm uwalniania białek proapoptotycznych z mitochondrium ciągle jeszcze pozostaje nieznanym. Przemieszczenie tych białek z przestrzeni międzybłonowej do cytoplazmy poprzedzone jest otwarciem megakanałów (porów przemiany przepuszczalności) umiejscowionych na styku błon zewnętrznej i wewnętrznej. Hipotetyczną budowę megakanałów i warunki sprzyjające ich otwieraniu opisano wcześniej w Postępkach Biochemii [30]. Maksymalne otwarcie megakanałów pozwala jedynie na przechodzenie cząsteczek o masie do 1,5 kDa. Jak wobec tego wydobywają się z mitochondrium białka? Przedłużające się otwarcie megakanałów doprowadza do pęcznienia i rozrywania błony zewnętrznej – uwalnia się wtedy zawartość organelum. Zjawisko to obserwowano jednak dopiero w końcowych etapach apoptozy i w nekrozie [44, 45], podczas gdy

przemieszczenie białek mitochondrialnych do cytoplazmy jest jednym z pierwszych objawów apoptozy. W dodatku, opróżnianie magazynów mitochondrialnych zachodzi szybko i wydajnie – jak proces aktywny a nie dyfuzja [46]. Dotychczas zgromadzony materiał doświadczalny pokazuje, że dwa białka z rodziny Bcl-2: Bax i Bak są niezbędne do utworzenia odpowiednio szerokich kanałów w zewnętrznej błonie mitochondrium (Ryc. 5).

Jednoczesne usunięcie lub zablokowanie funkcji Bak i Bax uodpornia komórki na wszystkie testowane bodźce wewnętrznego szlaku apoptozy [47]. Pod wpływem sygnałów śmierci białka te tworzą w błonie homo-oligomery, co jest warunkiem utworzenia kanałów. Nie jest jasne, czy Bax/Bak tworzą kanały samodzielnie, we współdziałaniu ze składnikami megakanałów, czy może przez rozerwanie ciągłości błony lipidowej [48]. Proapoptotyczne białko t-Bid, działając „z doskoku” (ang. „kiss and run”), wpływa na wypuklenie domen N-końcowych odpowiedzialnych za oligomeryzację Bax/Bak [49]. Natomiast antyapoptotyczne białka Bcl-2 i Bcl-xL wiążą sekwencje N-końcowe Bax/Bcl-2 zapobiegając oligomeryzacji [50]. Wysyłane z jądra po uszkodzeniu DNA białko p53 i histon H1.2 wywołują wzrost przepuszczalności mitochondrium w bliżej nieznanym sposób. W cząsteczce histonu H1.2 rozpoznano sekwencję zbliżoną do sekwencji peptydów tworzących pory w błonach lipidowych – mogło by to sprzyjać oligomeryzacji Bak [42]. Badania wpływu białek z mitochondrium prowadzono jak dotychczas na komórkach nowotworowych człowieka, głównie komórkach HeLa, na fibroblastach myszy i szczura, a także na izolowanych mitochondriach z wątroby szczura. Najwięcej informacji uzyskano dla cytochromu *c* i AIF. Ciekawe, że w apoptozie indukowanej przez aktywację Bax/Bak, do cytoplazmy w pierwszej kolejności przemieszczał się cytochrom *c*, Smac/Diablo i Omi/HtrA2. Wpływ AIF i Endo G był procesem wtórnym i wymagał aktywności kaspaz [51], wbrew ugruntowanej opinii, że apoptoza wywołana przez te czynniki jest od kaspaz niezależna. Natomiast w przypadkach, gdy apoptoza indukowana była przez staurosporynę, etopozyd lub PAR, a więc gdy sygnał związany był z uszkodzeniem DNA, obserwowano najpierw wypływ AIF a dopiero potem, zależny od AIF, wypływ cytochromu *c* i aktywację kaspaz [20,52,53]. Wychodzenie AIF z mitochondrium uwarunkowane było aktywnością PARP-1 i przemieszczaniem się do cytoplazmy PAR [43]. Jak wspomiano w poprzednim rozdziale, mechanizm uwalniania AIF za pośrednictwem PAR jest nieznanym, być może wiąże się z poli(ADP-rybozylacją) określonych białek, np. p53, p21 czy histonów. Na podstawie przedstawionych danych powstało przypuszczenie, że w zależności od czynnika indukującego apoptozę w błonie mitochondrialnej tworzą się różne typy kanałów. Na obecnym etapie badań taką hipotezę trudno jest jednak zweryfikować [54].



Rycina 5. Hipotetyczny obraz zmian w mitochondrium umożliwiających uwalnianie cytochromu *c* i AIF z przestrzeni międzybłonowej do cytoplazmy. W błonie zewnętrznej tworzą się odpowiednio szerokie kanały, utworzone przy udziale białek Bax i Bak. Peroksydacja fosfolipidów błonowych (gł. kardiolipiny), a także proteolityczne działanie kalpajny, aktywowanej przez napływ jonów  $Ca^{2+}$ , prowadzą do odszczepiania białek z błony wewnętrznej. Wpływ białek może być znacznie ułatwiony dzięki przebudowie struktury organelum, uwarunkowanej aktywnością mechanoenzymów: Opa1 i Drp1.

mitochondrialnymi. W początkowych stadiach apoptozy kanaliki zlewają się ze sobą tworząc pęcherzyki łączące się z przestrzenią przy błonie, zaś całe organellum wykazuje tendencję do podziału. Doświadczenia przeprowadzone na komórkach HeLa pokazały, że za te zmiany struktury odpowiedzialne są GTPazy – mechanoenzymy z rodziny dynamin. Białko Opa1, zakotwiczone w wewnętrznej błonie mitochondrium i w żywej komórce uczestniczące w łączeniu mitochondriów, zapobiegało apoptozie [55,56]. Z drugiej strony, Drp1, które zlokalizowane jest w cytoplazmie i indukuje podział mitochondrium, w czasie apoptozy gromadziło się w zewnętrznej błonie i w kanalikach mitochondrialnych wpływając na ich zlewanie i podział całego organellum [56,57]. Przemieszczanie się Drp1 do mitochondrium po zadziałaniu czynników apoptogennych obserwowano nie tylko w komórkach człowieka i gryzoni ale także u robaka *Caenorhabditis elegans* [55,57].

Z badań na izolowanych mitochondriach wątroby szczura wiadomo, że cytochrom *c* jest w wewnętrznej błonie mitochondrium związany z fosfolipidami, głównie kardioliną. Proponowany mechanizm uwalniania cytochromu *c* [58] zakłada, że otwarcie megakanalów na styku błon mitochondrium powoduje przerwanie łańcucha oddechowego i nagromadzenie się reaktywnych form tlenu, co sprzyja peroksydacji kardiolipiny, zaś podwyższone stężenie ATP wpływa na zmianę konformacji cytochromu *c*. W rezultacie zerwane zostają silne (hydrofobowe) wiązania cytochromu *c* z kardioliną. Jednocześnie napływ jonów i zmiana pH w przestrzeni międzybłonowej znosi słabe (elektrostatyczne) oddziaływania i cytochrom *c* może wydostać się na zewnątrz.

AIF również związane jest z wewnętrzną błoną mitochondrium. Zakłada się, że pod wpływem wzrostu stężenia jonów  $Ca^{2+}$ , co może nastąpić jeszcze przed maksymalnym otwarciem megakanalów, w przestrzeni międzybłonowej aktywowana jest proteaza cysteinowa zależna od jonów wapnia – kalpaina. Enzym ten rozcina prekursorowy AIF uwalniając aktywny fragment do światła kanalika [59]. Podobnie może działać obecna w mitochondrium kaspaza 3, aktywowana przez obniżenie pH [60]. Zależność uwalniania AIF od aktywności proteaz może tłumaczyć opóźniony w niektórych przypadkach, w porównaniu do cytochromu *c*, wpływ tego białka. Kaspazy aktywowane przy udziale cytochromu *c* znacznie zwielokrotniają wpływ czynników apoptozy, trawiąc substraty w błonach mitochondriów.

Dotychczas uzyskane informacje dotyczące mechanizmów wpływu cytochromu *c* i AIF z mitochondrium podczas apoptozy przedstawiono na rysunku 5. Ponieważ zgromadzony materiał doświadczalny jest skromny, mają one charakter hipotezy roboczej.

#### UWAGI KOŃCOWE

Przedstawione w pracy mechanizmy aktywacji i regulacji apoptozy zostały znacznie uproszczone. W rzeczywistości obraz jest dużo bardziej złożony i niejednoznaczny. Szereg zjawisk i faktów pominięto. Na przykład, oprócz transbłonowych receptorów śmierci komórki mogą produkować „receptory-pułapki”; nie są one zakotwiczone w błonie i po

związaniu liganda nie generują sygnału śmierci a przeciwnie – zapobiegają apoptozie [61]. Kaspazy nie są jedynymi proteazami biorącymi udział w apoptozie. W pewnych warunkach aktywowane są również katepsyny, kalpaina, proteazy serynowe, kompleks proteasomowy. Działając niezależnie, proteazy te mogą degradować klasyczne substraty kaspaz, jak laminy jądrowe czy ICAD i wywoływać programowaną śmierć podobną do apoptozy [62]. Szczególnie zaawansowane są badania nad działaniem kalpain uwalnianych z lizosomów w sposób kontrolowany, przy udziale proapoptotycznych białek z rodziny bcl-2 [63]. Rola samych kaspaz nie ogranicza się zresztą tylko do apoptozy. Na przykład aktywność kaspazy 8 jest niezbędna do proliferacji limfocytów [64]. Istnieją też tzw. kaspazy zapalne, aktywowane w inflamosomie, które nacinają i w ten sposób aktywują prozapalne cytokiny IL-1 $\beta$  i IL-18 [65].

Wiedza o programowanej śmierci komórek rozwija się dynamicznie i wielotorowo. Obok zagadnień dosyć dobrze poznanych, jak działanie kaspaz czy przekazywanie sygnałów przez receptory śmierci, pojawiły się nowe, wśród których wiedza o współdziałaniu cytoplazmy i jądra w indukcji apoptozy zależnej od mitochondrium może całkowicie zmienić dotychczasowe pojmowanie regulacji tego procesu. Mechanizm uwalniania proapoptotycznych białek z mitochondrium ciągle jest nieznany, a obecnie wydaje się, że może on zależeć od rodzaju czynnika wyzwalającego. W najbliższej przyszłości spodziewać się można wielu, być może zaskakujących odkryć, które pozwolą lepiej zrozumieć mechanizmy regulacji procesów śmierci komórki i otworzą nowe perspektywy ich praktycznego zastosowania.

#### PIŚMIENNICTWO

- Okada H, Mak TW (2004) Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4: 592-603
- Savill J, Fadok V (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784-788
- Reggiori F, Klionsky DJ (2002) Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* 1: 11-21
- Cavalho A, Carmena M, Sambade C, Earnshaw WC, Wheatley SP (2003) Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J Cell Sci* 116: 2987-2998
- Lens SM, Wolthuis RM, Klompaker R, Kauw J, Agami R, Brummelkamp T, Kops G, Medema RH (2003) Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *EMBO J* 22: 2934-2947
- Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zon H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC (2003) HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 22: 2728-2740
- Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, Hakem R, Greenberg AH (2000) BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol* 20: 5454-5468
- Proskuryakov SY, Gabai VL, Konoplyannikov AG (2000) Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death. *Biochemistry (Mosc)* 67: 387-408
- Stennicke HR, Salvesen GS (2000) Caspases – controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* 1477: 299-306
- Leblanc AC (2003) Natural cellular inhibitors of caspases. *Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 215-229
- Shiozaki EN, Shi Y (2004) Caspases, IAPs and Smac/Diablo: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci* 29: 486-494

12. Du C, Fang M, Li M, Li L, Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome *c*-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42
13. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102: 43-53
14. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R (2001) A serine protease, Htr A2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8: 613-621
15. Suzuki Y, Takahashi-Niki K, Akagi T, Hashikawa T, Takahashi R (2004) Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways. *Cell Death Differ* 11: 208-216
16. Srinivasula SM, Hedge R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES (2001) A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/Diablo regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410: 112-116
17. Jin Z, El-Deiry WS (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4: e50-e74
18. Boatright KM, Ratus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11: 529-541
19. Widlak P, Garrard WT (2005) Discovery, regulation and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem* 94: 1078-1087
20. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow, BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Constantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-448
21. Li LY, Luo X, Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95-99
22. Candé C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): a key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* 115: 4727-4734
23. Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D (2002) Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 298: 1587-1592
24. Cote J, Ruiz-Carrillo A (1993) Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science* 261: 765-769
25. Ohsato T, Ishihara N, Tsuyoshi M, Umeda S, Ikeda S, Mihara K, Hamasaki N, Kang D (2002) Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space. *Eur J Biochem* 269: 5765-5770
26. Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT (2001) Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates. Cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem* 276: 48404-48409
27. Danial NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205-219.
28. Micheau O, Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114: 181-190
29. Wang CY, Mayo MW, Baldwin Jr AS (1996) TNF and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- $\kappa$ B. *Science* 274: 784-787
30. Grądzka I (2000) Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Postępy Biochem* 46: 2-16
31. Fesik SW (2000) Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 103: 273-282
32. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding and activation. *Mol Cell* 9: 423-432
33. Yoshida K, Yamaguchi T, Natsume T, Kufe D, Miki Y (2005) JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of cAbl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature Cell Biol* 7: 278-285
34. Wang JY (2005) Nucleo-cytoplasmic communication in apoptotic response to genotoxic and inflammatory stress. *Cell Res* 15: 43-48
35. Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, Hattori S, Shimizu S, Tsujimoto Y, Yoshioka, Masuyama N, Gotoh Y (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J* 23: 1889-1899
36. Welch PJ, Wang JY (1993) A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell* 75: 779-790
37. Nakamura Y (2003) Isolation of p53-target genes and their functional analysis. *Cancer Sci* 95: 7-11
38. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y (2003) Apoptosis – the p53 network. *J Cell Sci* 116: 4077-4083
39. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM (2003) p53 has a direct apoptotic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11: 577-590
40. Chipuk JE, Kuwana T, Bauchier-Hayes L, Droin NH, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303: 1010-1014
41. Erster S, Mihara M, Kim RH, Petrenko O, Moll UM (2004) In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Mol Cell Biol* 24: 6728-6741
42. Konishi A, Shimizu S, Hirota J, Takao T, Fan Y, Matsuoka Y, Zhang L, Yoneda Y, Fujii Y, Skoultsi AI, Tsujimoto Y (2003) Involvement of histone H2.1 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell* 114: 673-688
43. Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL (2004) Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci* 25: 259-264
44. Chen Q, Gong B, Almasan A (2000) Distinct stages of cytochrome *c* release from mitochondria, evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death Differ* 7, 227-233
45. Crompton M (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341: 233-249
46. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR (2000) The coordinate release of cytochrome *c* during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2: 156-162
47. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic Bax and Bak: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292: 727-730
48. Sharpe J, Arnoult D, Youle R (2004) Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* 1644: 107-113
49. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20: 929-935
50. Ruffolo SC, Shore GC (2003) BCL-2 selectively interacts with the BID-induced open conformer of BAK, inhibiting BAK auto-oligomerization. *J Biol Chem* 278: 25039-25045
51. Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ (2003) Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J* 22: 4385-4399
52. Dugas E, Susin S, Zamzami N, Ferri K, Irinopoulos T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G (2000) Mitochondrio-nuclear redistribution of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 14: 729-739
53. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poitrier GG, Dawson TM, Dawson VL (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase I-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297: 259-263
54. van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenberg P (2002) The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 9: 1031-1042
55. Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, Lenaers G (2003) Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner

membrane structure and integrity, leading to cytochrome *c* release and apoptosis. *J Biol Chem* 278: 7743-7746

56. Lee Y, Yeong S-Y, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ (2004) Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1 and Opa1 in apoptosis. *Med Biol Cell* 15: 5001-5011
57. Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC (2003) Caspase cleavage product BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome *c* release to the cytosol. *J Cell Biol* 160: 1115-1127
58. Ott M, Robertson JD, Gongvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S (2002) Cytochrome *c* release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Nat Acad Sci USA* 99:1259-1263
59. Polster BM, Basanez G, Etxebarria A, Hardwick JM, Nicholls DG (2005) Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem* 280: 6447-6454
60. Green D, Kroemer G (1998) The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 8: 267-271

61. Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308
62. Leist M, Jäättelä M (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 589-598
63. Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ (2004) Lysosomes in cell death. *Oncogene* 23: 2881-2890
64. Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, Dale JK, Puck J, Davis J, Hall CG, Skoda-Smith S, Atkinson TP, Strauss SE, Lenardo MJ (2002) Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419: 395-399
65. Martinon F, Tschopp J (2004) Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 117: 561-574

## Mechanisms and regulation of the programmed cell death

Iwona Grądzka 

Institute of Chemistry and Nuclear Technology, Department of Radiobiology and Health Protection, 16 Dorodna St., 03-195 Warsaw, Poland  
e-mail: iwonag@ichj.waw.pl

**Key words:** cell death programs, apoptotic pathways: extrinsic (death receptor pathway) and intrinsic (mitochondrial), release of mitochondrial apoptotic factors, cAbl kinase, p53, histone H1.2, poly(ADP-ribose).

### ABSTRACT

The programmed cell death usually is identified with apoptosis, though a scheduled sequence of events can be observed also in autophagy, mitotic catastrophe and, under certain circumstances, in necrosis. Apoptosis begins with activation of the initiator caspases (cysteine proteases) in the signaling complexes: the apoptosome (on the intrinsic or mitochondrial pathway) or the degradosome (on the extrinsic or death receptor pathway). The proteolytic cascade then leads, through activation of downstream caspases and DNases, to digestion of cell components. Mitochondria play a central role in apoptosis by releasing cytochrome *c* – the essential component of the apoptosome, Smac/Diablo and Omi/HtrA2 – that bind the caspase inhibitors (IAPs), and endonuclease G and AIF – that are responsible for DNA degradation. Those factors get out of mitochondrion through the Bax and Bak protein-containing channels. The process is fast and complete, probably due to mechanoenzyme – driven remodeling of the organelle structure as well as to phospholipid peroxidation and proteolysis in the inner membrane. The release of the mitochondrial factors can be stimulated by protein p53, histone H1.2 and poly(ADP-ribose) that are sent from the nucleus in consequence of a cyto- and genotoxic stress, under the control of cAbl kinase.

Kamilla Bąkowska-Żywicka

Agata Tyczewska

Tomasz Twardowski✉

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

✉Instytut Chemii Bioorganicznej PAN,  
ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań;  
e-mail: [twardows@ibch.poznan.pl](mailto:twardows@ibch.poznan.pl), tel.: (061)  
852 85 03, faks: (061) 852 05 32

Artykuł otrzymano 14 października 2005 r.  
Artykuł zaakceptowano 27 października 2005 r.

**Słowa kluczowe:** biosynteza białka, rRNA, rybosom, synteza wiązania peptydowego

**Wykaz skrótów:** AA-tRNA – aminoacylo-tRNA; dA – 2'-deoksyadenozyna; D-tRNA – deacylowany tRNA; fA – 2'-fluoroadenozyna; miejsce A – miejsce wiązania aminoacylo-tRNA; miejsce E – miejsce wiązania deacylowanego tRNA; miejsce P – miejsce wiązania peptydylo-tRNA; Pm – puromycyna; Pm-OH – hydroksypuromycyna; PTC – centrum peptydylotransferazowe; P-tRNA – peptydylo-tRNA; tRNA – ogólne określenie wszystkich rodzajów tRNA (AA-tRNA, P-tRNA bądź D-tRNA); tRNA<sup>AA</sup> – cząsteczka tRNA specyficzna względem określonego aminokwasu

## STRESZCZENIE

W ciągu ostatnich pięciu lat opublikowano szereg danych dotyczących struktury i mechanizmu funkcjonowania rybosomu. Dzięki badaniom nad strukturą atomową wiadomo, że centrum peptydylotransferazowe rybosomu jest zbudowane wyłącznie z rRNA. Wiemy również, że odpowiednie ułożenie końców CCA cząsteczek tRNA związanych z rybosomem, znacząco wpływa na jego siłę katalityczną. Niemniej jednak dokładny i szczegółowy mechanizm syntezy wiązania peptydowego w rybosomie nadal nie jest poznany. Czy istnieją komponenty chemiczne, które wpływają na szybkość syntezy wiązania peptydowego? Czy rybosom w komórce pełni swoją rolę w translacji w sposób identyczny jak izolowane podjednostki, będące źródłem większości danych? W tym artykule staramy się przedstawić poglądy na sposób w jaki rybosom bierze udział w syntezie wiązania peptydowego.

## WPROWADZENIE

Rozwiązanie struktury krystalograficznej zarówno małej (30S) jak i dużej (50S) podjednostki rybosomalnej [1,2] oraz całego rybosomu prokariotycznego [3] było przełomowym momentem w badaniach nad zrozumieniem molekularnego podłoża biosyntezy białka. Po raz pierwszy miejsca aktywne tak złożonego makrokompleksu mogły zostać opisane z ogromną precyzją. Badania te pozwoliły na bardzo dokładne określenie struktury i oddziaływań poszczególnych komponentów podjednostek. Dzięki temu zwiększyła się również nasza wiedza na temat oddziaływań między podjednostkami oraz zmian konformacyjnych rybosomu podczas kolejnych etapów procesu biosyntezy białka [4,5,6]. Jednakże nadal wiele zagadnień tej złożonej maszyny biosyntezy białka pozostaje niewyjaśnionych. Chociaż istnieje kilka modeli, nie jest znany dokładny mechanizm zasadniczej reakcji katalizowanej przez rybosom: syntezy wiązania peptydowego. W artykule tym przedstawiamy różne spojrzenia na tę podstawową reakcję.

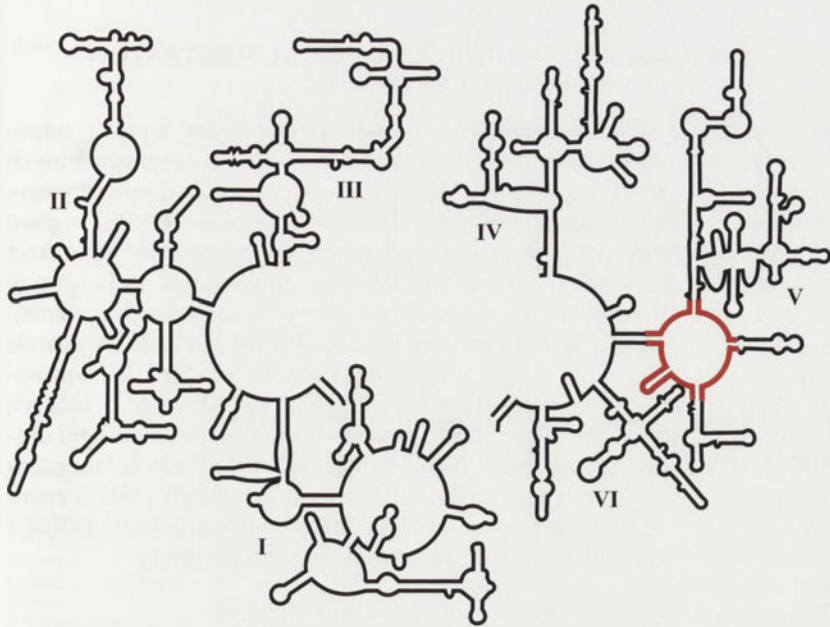
## RYBOSOM JAKO RYBOZYM

Główną funkcją małej podjednostki rybosomalnej jest asocjacja z mRNA i odszyfrowywanie informacji genetycznej zakodowanej w tej cząsteczce [7]. Podstawową rolą dużej podjednostki rybosomalnej jest kataliza wiązania peptydowego oraz uwalnianie nowo zsyntetyzowanego polipeptydu z rybosomu. Obie te reakcje mają miejsce w centrum peptydylotransferazowym (PTC). Na podstawie badań struktury atomowej dużej podjednostki rybosomalnej *Haloarcula marismortui* stwierdzono, że miejsce aktywne rybosomu jest zbudowane wyłącznie z rRNA – tworzą je nukleotydy centralnej pętli domeny V 23S rRNA [1,8,9]. Podobną strukturę miejsca aktywnego obserwowano również w przypadku *Deinococcus radiourans* [10]. W tych obszarach dużej podjednostki występują wysoce zachowane sekwencje 23S rRNA, co świadczy o ich zasadniczej funkcji w procesie translacji (Ryc. 1A i B).

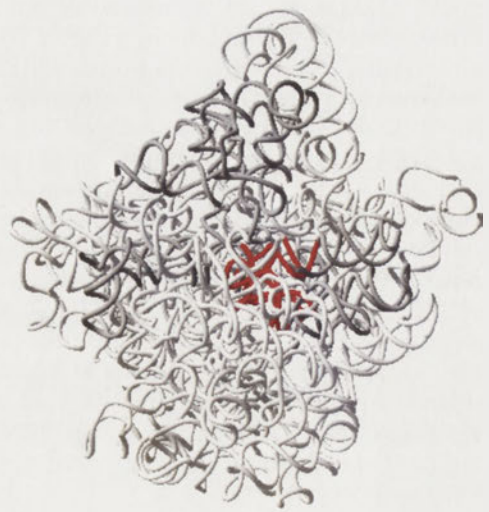
Z domeną V 23S rRNA oddziałuje 15 białek (Ryc. 2A). Najbliżej PTC znajdują się rybosomalne białka L2, L3, L4 i L10e, które penetrują szkielet domeny V 23S rRNA i kierują swe nieglobularne „ogony” w kierunku PTC [8,11]. Jednakże ze struktury krystalicznej podjednostki 50S *H. marismortui* można wnioskować, że nawet najbliższe z białek nie znajduje się w takiej odległości do centrum aktywnego PTC, aby mogło pełnić aktywną funkcję jako katalizator w reakcji syntezy wiązania peptydowego (Ryc. 2B) [8]. Dzięki tym odkryciom można jednoznacznie wnioskować, że to 23S rRNA odgrywa główną rolę w katalizowaniu reakcji polimeryzacji reszt aminokwasowych w rybosomie. Można też sądzić, że białka rybosomalne pełnią rolę stabilizującą, utrzymując odpowiednią strukturę trzeciorzędową domeny V 23S rRNA, warunkującą jej aktywność [12]. Dzięki temu możemy umieścić rybosom na liście naturalnie występujących rybozymów.



A



B



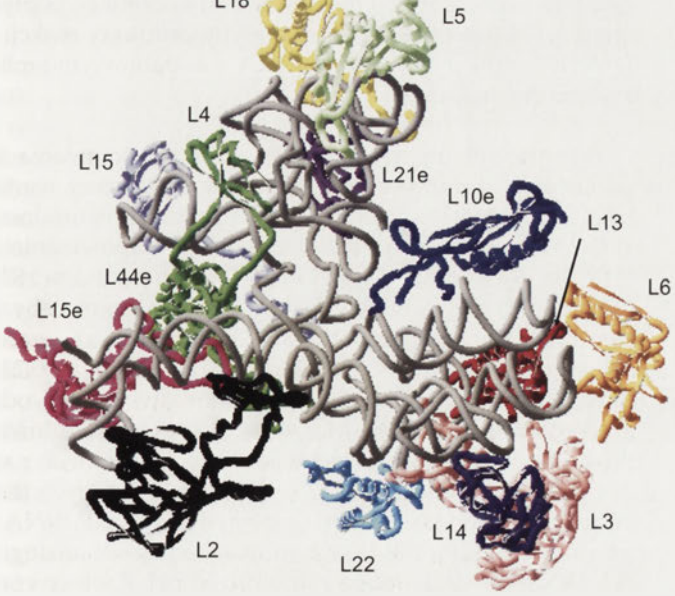
Rycina 1. Lokalizacja PTC w strukturze 23S rRNA: A – struktura II-rzędowa 23S rRNA (numery oznaczają domeny 23S rRNA; na czerwono wyróżniono PTC); B – struktura III-rzędowa 23S rRNA, widok od strony oddziaływania podjednostek (kolorem szarym wyróżniono domenę V, kolorem czerwonym – PTC; struktura 23S rRNA *H. marismortui* pobrana z: <http://www.rcsb.org> [41]).

**SYNTEZA WIĄZANIA PEPTYDOWEGO W RYBOSOMIE**

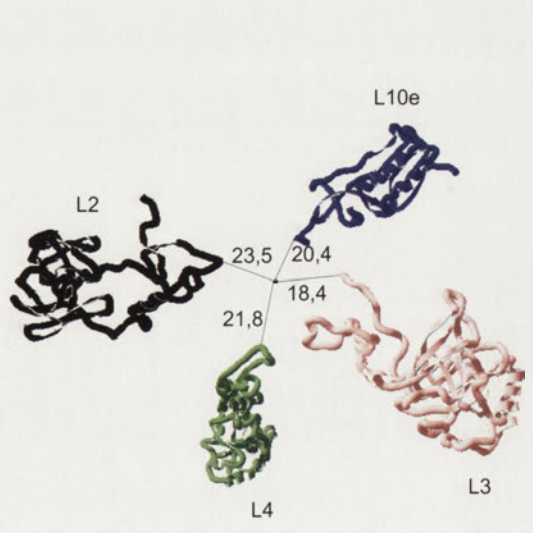
Substraty do utworzenia wiązania peptydowego, tj. aminoacylo-tRNA (AA-tRNA) w rybosomalnym miejscu A i peptydylo-tRNA (P-tRNA) w miejscu P, muszą znajdować się w odpowiedniej orientacji. Za przybranie tej orientacji odpowiedzialne są specyficzne interakcje między cząsteczką tRNA a 23S rRNA i białkami rybosomalnymi małej i dużej podjednostki [13]. Zatem jedną z funkcji PTC jest prawidłowe usytuowanie cząsteczek tRNA, tak aby mogła zająć syntezę wiązania peptydowego. Szczelina miejsca aktywnego

ma wystarczający rozmiar by pomieścić 3' końce cząsteczek tRNA [8]. Usytuowanie cząsteczki P-tRNA w miejscu P jest stabilizowane głównie poprzez oddziaływanie nukleotydów C74 i C75 tRNA z resztami zasad G2253 i G2252 23S rRNA, ulokowanymi w tzw. pętli P. Zasadnicze znaczenie mają również interakcje między A76 i A2450-C2501, tworzącymi tzw. motyw *A-minor* [8,14]. Natomiast cząsteczka AA-tRNA zawdzięcza odpowiednie umiejscowienie w miejscu A, przede wszystkim interakcjom nukleotydu C75 z G2553 pętli A 23S rRNA oraz oddziaływaniom typu *A-minor* między A76 a U2506-G2583 [8,13,15].

A



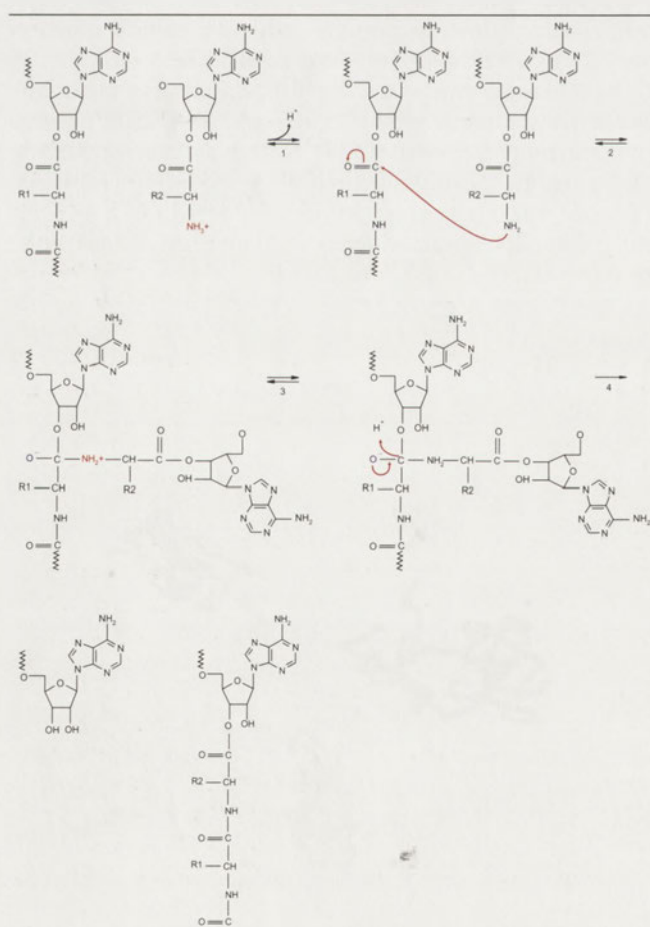
B



Rycina 2. Białka rybosomalne znajdujące się najbliżej PTC (według [8], za zgodą autorów): A – struktura III-rzędowa domeny V 23S rRNA (kolor szary) i oddziałujące z nią białka (pozostałe kolory); B – miejsce aktywne rybosomu z usuniętą cząsteczką rRNA. Zaznaczono najbliższe białka i odległości (w Å) do centrum aktywnego.

Połączenie aminokwasów kowalencyjnym wiązaniem peptydowym zachodzi między grupą  $\alpha$ -aminową AA-tRNA znajdującego się w miejscu A rybosomu a grupą karboksylową P-tRNA w miejscu P (Ryc. 3). W pierwszym etapie grupa  $\alpha$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> ulega deprotonacji i tworzy się nukleofilowa grupa NH<sub>2</sub> (etap 1). pKa tej grupy z aminokwasu cząsteczki AA-tRNA wynosi około 8. Proton pochodzący z tego etapu jest najprawdopodobniej przyjmowany przez cząsteczkę wody. Następnie ma miejsce atak nukleofilowy grupy  $\alpha$ -aminowej AA-tRNA na elektrofilową grupę karbonylową P-tRNA (etap 2). Ta reakcja prowadzi do utworzenia wstępnie protonowanego związku przejściowego, który poprzez deprotonację (etap 3) tworzy związek pośredni – węgiel o tetraedrycznym układzie wiązań. Rozpad związku przejściowego (etap 4), zainicjowany przez oddanie protonu na atom tlenu, prowadzi do powstania produktów reakcji, tj. deacylowanego tRNA (D-tRNA) w miejscu P oraz P-tRNA niosącego dodatkowy aminokwas (+1 aa) w miejscu A [12].

Utworzenie wiązania peptydowego nie wymaga dodatkowej energii, wykorzystywana jest jedynie energia zgromadzona w wiązaniu estrowym łączącym resztę peptydową z grupą 3' hydroksylową cząsteczki tRNA. Natomiast źródłem energii dla syntezy tego ostatniego wiązania jest hydroliza ATP, która jest niezbędna do aminoacylacji tRNA



**Rycina 3.** Mechanizm syntezy wiązania peptydowego (zmodyfikowane według [22]). 1 – deprotonacja grupy NH<sub>3</sub><sup>+</sup>; 2 – atak nukleofilowy grupy NH<sub>2</sub> AA-tRNA na grupę C=O P-tRNA; 3 – deprotonacja związku przejściowego; 4 – utworzenie produktów reakcji.

katalizowanej przez odpowiednią syntetazę aminoacylową [13,16].

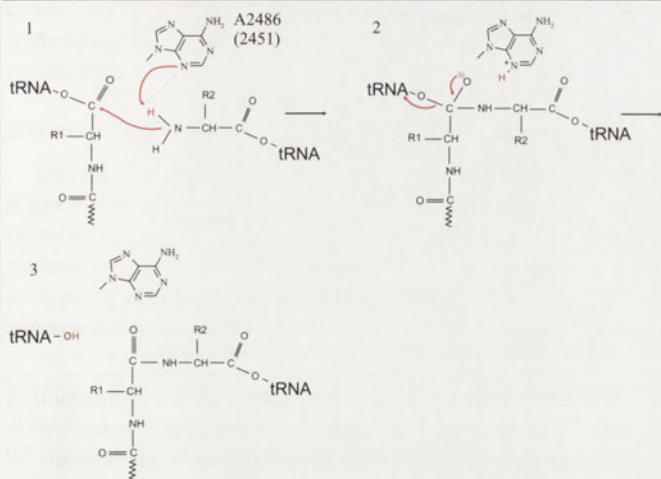
### KATALIZA CHEMICZNA, UDZIAŁ SUBSTRATÓW CZY MOŻE EFEKT ENTROPII?

Nadal otwarte pozostaje pytanie, czy oprócz odpowiedniej orientacji substratów, rybosom wymaga innych czynników do katalizy syntezy wiązania peptydowego. Pochodząca z wczesnych badań hipoteza, że jedna z grup chemicznych rybosomalnego RNA może mieć charakter zasadowy według teorii Lewisa (omawiamy tę koncepcję w następnym podrozdziale) jest w sprzeczności z późniejszymi eksperymentami. Dlatego też uwaga badaczy została zwrócona w innym kierunku. Obecnie istnieje kilka koncepcji mechanizmu syntezy wiązania peptydowego, z których dwie, jak się wydaje, są najbardziej poparte dowodami eksperymentalnymi. Jedna z nich zakłada, że siła katalityczna rybosomu jest związana z redukcją entropii reakcji, natomiast inna przedstawia możliwość uczestniczenia jednej z grup chemicznych substratów w reakcji syntezy.

### KATALIZA CHEMICZNA TWORZENIA WIĄZANIA PEPTYDOWEGO?

Według proponowanego w 2000 r. przez Nissena i Steitza założenia, za aktywność katalityczną odpowiedzialny jest wysoce zachowany nukleotyd (A2451 u *Escherichia coli*, A2486 u *H. marismortui*), znajdujący się najbliżej reagujących grup [8]. Według tej hipotezy, protonacja azotu w pozycji trzeciej (N3) pierścienia nukleotydu A2451 umożliwia stabilizację obdarzonego negatywnym ładunkiem związku pośredniego. A2451 funkcjonowałaby wówczas jako zasada Lewisa (Rysunek 4). W wyniku odebrania protonu przez N3 A2451 z reszty  $\alpha$ -aminowej następowałby nukleofilowy atak grupy  $\alpha$ -aminowej na atom węgla peptydylo-tRNA (etap 1). Uprotonowany N3 A2451 mógłby brać udział w stabilizacji utworzonego związku pośredniego, poprzez wiązanie wodorowe z oksyanionem O<sup>-</sup> (etap 2). Proton zostałby następnie przekazany z N3 na koniec 3' deacylowanego tRNA, związanego w miejscu P, zaraz po odłączeniu od niego nowo utworzonego peptydu (etap 3). W ten sposób powstawałyby produkty reakcji, tj. D-tRNA w miejscu P oraz P-tRNA z dodatkowym aminokwasem w miejscu A.

Aby efektywnie zachodziła reakcja przyjmowania lub oddawania protonu w reakcji katalizy chemicznej, wartość pKa grupy katalitycznej powinna być bliska neutralnemu [17]. Wartości pKa zasad RNA wynoszą odpowiednio 3,5 i 4,2 dla A i C oraz 9,2 dla G i U. Jeśli więc zasada rRNA brałaby aktywny udział w reakcji, wówczas musiałaby nastąpić zmiana wartości pKa. Zaproponowano zatem, że grupy chemiczne w pobliżu A2451, szczególnie G2447, biorą udział w przekazywaniu ładunków, co powoduje zmianę wartości pKa [8]. Model ten ma swoje uzasadnienie, pochodzące już z pierwszych badań biochemicznych z wykorzystaniem rybosomów *E. coli*, przedstawiających dane, że reakcja przenoszenia reszty peptydylowej z P-tRNA na puromycynę (która była w tym doświadczeniu analogiem AA-tRNA) wykazuje silną zależność od pH. Zaobserwowano, że szybkość reakcji wzrastała wraz ze zmianą pH na bardziej zasadowe (w zakresie pH od 6 do 8,5), z pKa równym



**Rycina 4.** Chemiczny model syntezy wiązania peptydowego (zmodyfikowane według [8]). 1 – utworzenie wiązania wodorowego między N3 A2451 23S rRNA a wodorem grupy  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> AA-tRNA i atak nukleofilowy NH<sub>2</sub> AA-tRNA na grupę C=O P-tRNA; 2 – protonacja N3 A2451; utworzenie wiązania wodorowego między wodorem azotu N3 A2451 i atomem tlenu grupy C=O P-tRNA; przekazanie protonu z N3 A2451 na koniec 3'-D-tRNA; 3 – produkty reakcji.

7,5 [18,19]. Wyniki tych eksperymentów uzasadniały hipotezę na temat obecności w rybosomie grupy chemicznej, która w zależności od protonacji wpływałaby na szybkość syntezy wiązania peptydowego. Natomiast w późniejszych badaniach, Muth zademonstrował, że silnie zachowana reszta A2451 23S rRNA w miejscu aktywnym rybosomu posiada pKa o wartości około 7 [20], co jest dalszym potwierdzeniem katalitycznej roli nukleotydu A2451.

W 2002 r. w eksperymentach z zastosowaniem hydroksypuromycyny (Pm-OH) jako kolejnego analogu AA-tRNA, wykazano istnienie dwóch grup zjonizowanych, których pKa wynosiły 6,9 i 7,5. Wartości te przyporządkowano odpowiednio puromycynie i reszcie pochodzącej z rRNA. Dalsze analizy ujawniły, że w rybosomach niosących mutacje A/U w pozycji 2451 nie obserwowano zależności efektywności reakcji syntezy wiązania peptydowego od pH. Sugeruje to, że grupę zjonizowaną niesie nukleotyd A2451 lub inny znajdujący się w bliskim sąsiedztwie [21].

Ponadto w strukturze krystalograficznej dużej podjednostki rybosomalnej przy rozdzielczości 2,4 Å, atom azotu N3 reszty A 2451 znajduje się w bliskim kontakcie z analogiem związku przejściowego [8], a mutacje w tej pozycji są letalne w przypadku *E. coli* [22 i prace tam cytowane]. Natomiast Hansen i inni w 2002 r. stwierdzili, że jedynymi kandydatami do bezpośredniego udziału w katalizie chemicznej wiązania peptydowego w rybosomie (jeśli taka kataliza występuje) są N3 A2451 23S rRNA; grupa 2'-OH A2451 lub 2'-OH substratu w miejscu P (P-tRNA) [23]. Wszystkie te możliwości będą przez nas dyskutowane.

Okazało się jednak, że rola nukleotydu A2451 w katalizowaniu syntezy wiązania peptydowego nie jest jednoznaczna [13,24,25]. Przeprowadzone w 2001 r. przez dwie niezależne grupy badaczy eksperymenty oceniające rolę nukleotydu A2451 w tym procesie wykazały, że mutacje nukleotydu A2451 nie hamują syntezy wiązania peptydowego *in vitro* [26,27,28]. Zaobserwowano tylko niewielkie osłabienie aktywności katalitycznej rybosomów niosących mutacje, w

kilku niezależnych eksperymentach. Nawet występowanie dwóch mutacji jednocześnie w jednej cząsteczce 23S rRNA (A2451U/A2602G) nie eliminowało aktywności rybosomu [29]. Stwierdzono również, że mutacja A2451U, która jest letalna dla *E. coli*, nie powoduje śmiertelności u *Mycobacterium smegmatis*, jednak obserwowano spowolnienie reakcji tworzenia wiązania peptydowego [30]. U tego mikroorganizmu zaobserwowano również inną wartość pKa wynoszącą 8,0 (a nie jak u *E. coli* 7,5). Ponadto, w przeciwieństwie do *E. coli*, nie obserwowano eliminacji grupy zjonizowanej. Stąd też jednoznaczny wniosek, że u *M. smegmatis* A2451 nie jest odpowiedzialna za zależność szybkości reakcji od pH.

Ponadto stwierdzono, że wprowadzenie chemicznych modyfikacji zasady w pozycji 2451 (które eliminowały możliwość tworzenia wiązania wodorowego atomów azotu N1 lub N3 adeniny), a nawet całkowita delecja zasady, ma jedynie marginalny wpływ na tworzenie wiązania peptydowego [31]. Natomiast grupa 2'-OH rybozy w pozycji 2451 wydaje się pełnić ważną rolę w katalitycznej aktywności PTC i ułatwia transpeptydację najprawdopodobniej poprzez koordynację atakującej grupy  $\alpha$ -aminowej. Konserwatywny nukleotyd A2451 może zatem pełnić rolę w odpowiednim umiejscowieniu grupy 2'-hydroksylowej rybozy. Zaobserwowano też, że mutacje w pozycji G2447 nie miały widocznych efektów na wzrost komórek i nie wpływały znacząco na syntezę wiązania peptydowego [26,27,32]. Nie ma zatem podstaw do potwierdzenia udziału reszty G2447 w proponowanym mechanizmie przekazywania ładunków.

Pomimo tak intensywnych badań, nadal trudno jednoznacznie i szczegółowo przedstawić mechanizm syntezy wiązania peptydowego. Dlatego konieczne jest zbadanie większej liczby mutacji 23S rRNA, zarówno kinetycznie jak i strukturalnie. Niewykluczone jest bowiem, że wprowadzenie mutacji w miejsce aktywne rybosomu może powodować zmiany strukturalne, niezależnie od mechanizmu katalitycznego. Jakkolwiek, na podstawie tych wyników można wnioskować, że powinien być brany pod uwagę inny model mechanizmu syntezy wiązania peptydowego niż proponowany przez Nissena i Steitz'a w 2000 r. [8].

#### RYBOSOM JAKO ENZYM WYKORZYSTUJĄCY ENTROPIĘ?

Wyznacznikiem spontaniczności reakcji chemicznych jest funkcja termodynamiczna zwana energią swobodną. Reakcja może zająć spontanicznie tylko wtedy, kiedy zmiana energii swobodnej reakcji ma wartość ujemną. Enzymy natomiast katalizują reakcje termodynamiczne zmniejszając energię aktywacji reakcji. Przyspieszają one reakcje przez dostarczanie nowej drogi reakcji, w której stan przejściowy (stan o najwyższej energii) ma niższą energię swobodną i jest przez to bardziej dostępny niż w reakcjach niekatalizowanych. Istotą katalizy jest selektywna stabilizacja stanu przejściowego, często poprzez zaangażowanie sił polarnych, np. wiązań wodorowych lub interakcji poprzez siły elektrostatyczne. Jeśli zatem rybosom działa na zasadzie chemicznej katalizy, wówczas szybkość reakcji powinna zależeć od redukcji entalpii aktywacji, a rola entropii w stabilizacji stanu pośredniego w tym przypadku powinna być niewielka. Jeśli natomiast synteza wiązania peptydowego jest uzależniona

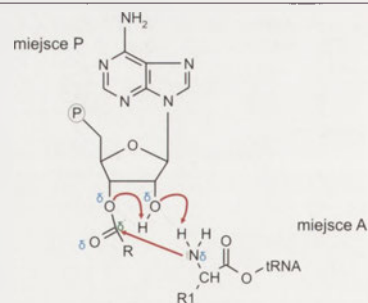
tylko od przyjęcia odpowiedniej pozycji przez substraty w PTC, wówczas szybkość reakcji powinna być uwarunkowana przez entropię [33].

W 2004 r. Sievers i współpracownicy przeprowadzili serię eksperymentów, aby sprawdzić, która z możliwości jest prawdziwa [33]. W tym celu porównano niekatalityczną i rybosomalną reakcję tworzenia wiązania peptydowego. W pierwszej reakcji jako odpowiednik P-tRNA zastosowano estry, dla których wartość pKa reszty kwasu karboksylowego pochodzącego z tych związków była podobna do wartości pKa grupy karbonylowej występującej w rybosomie. Zatem charakter elektrofilowy tych grup był również podobny. Jako odpowiednik substratu w miejscu A (akceptora) zastosowano aminę pierwszorzędową o wartości pKa bardzo podobnej do AA-tRNA. W przypadku reakcji w rybosomie, zastosowano dipeptydylo-tRNA (fMetPhe-tRNA<sup>Phe</sup>) jako substrat w miejscu P (donor) oraz puromycynę (Pm) jako substrat w miejscu A. Wykonano szczegółowe pomiary parametrów kinetycznych reakcji i okazało się, że w przeciwieństwie do większości białkowych enzymów, entalpia aktywacji reakcji w rybosomie ma mniejsze znaczenie niż w roztworze. Zwiększenie szybkości reakcji w rybosomie odbywa się wyłącznie przez obniżanie entropii aktywacji, a ta pochodzi z prawidłowego ułożenia cząsteczek AA-tRNA i P-tRNA. Rezultaty te są potwierdzeniem tezy, że rybosom zwiększa szybkość reakcji syntezy wiązania peptydowego głównie poprzez odpowiednią orientację substratów.

#### KATALIZA SYNTEZY WIĄZANIA PEPTYDOWEGO PRZEZ SUBSTRATY?

Badania nad udziałem poszczególnych grup chemicznych cząsteczek tRNA w tworzeniu wiązania peptydowego trwają już wiele lat. Pierwsze doniesienia sięgają roku 1974. Na podstawie tych wyników dowiedziono, że cząsteczka tRNA<sup>Phe</sup> z delecją grupy 2'-OH A76 może służyć jako substrat do syntezy wiązania peptydowego w miejscu A, ale jest nieaktywna jako donor czyli substrat w miejscu P [34]. Inna grupa badaczy stwierdziła, że cząsteczka tRNA<sup>Lys</sup> pozbawiona grupy 2'-OH A76 nie jest zdolna uczestniczyć w syntezie polilizyny *in vitro* [35].

Aby sprawdzić możliwość udziału grupy 2'-hydroksylowej A76 cząsteczek tRNA w tworzeniu wiązania peptydowego, Barta i współpracownicy zastosowali zmodyfikowaną wersję reakcji fragmentowej z użyciem aminoacylowanej adenozyiny (AcLeuAMP) jako substratu w miejscu P oraz Phe-tRNA jako substratu w miejscu A [36]. Zastosowano kilka pochodnych AcLeuAMP, w których grupa 2'-OH była zablokowana przez grupę metylową lub dodatkową grupę AcLeu. Niektóre pochodne były całkowicie pozbawione grupy 2'-OH. Okazało się, że 2'-deoksy pochodna substratu była nieaktywna w syntezie wiązania peptydowego. Jednak obie pochodne, które posiadały atom tlenu w pozycji 2' wykazywały aktywność, chociaż była ona znacznie niższa niż aktywność AcLeuAMP jako substratu. Z danych tych wynika, że grupa w pozycji 2' rybozy cząsteczki tRNA wpływa na aktywność PTC. Na tej podstawie zaproponowano kolejny model mechanizmu syntezy wiązania peptydowego. Opiera się on na założeniu, że grupa 2'-OH A76 tRNA w miejscu P bierze bezpośredni udział w tworzeniu wiązania peptydowego. W modelu tym, atako-



Rycina 5. Proponowany udział grupy 2'-OH terminalnej rybozy tRNA w miejscu P w katalizie wiązania peptydowego (zmodyfikowane według [36]).

wi nukleofilowemu grupy  $\alpha$ -aminowej tRNA w miejscu A na elektrofilowy atom węgla tRNA w miejscu P, towarzyszy zachodzące równolegle tworzenie wiązania wodorowego. W wiązaniu tym donorem jest grupa  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>, a akceptorem tlen w pozycji 2' rybozy (Ryc. 5). Jednocześnie zachodzi migracja protonu z grupy 2'-OH na atom 3'-O. Reakcje te prowadzą do utworzenia produktów: D-tRNA w miejscu P i P-tRNA w miejscu A. Stwierdzono również, że grupa 2'-OH rybozy jest jedyną funkcjonalną grupą chemiczną w bliskim sąsiedztwie miejsca aktywnego rybosomu [8], której usunięcie wywiera wystarczający wpływ na szybkość transpeptydacji, aby brać pod uwagę jej udział w katalizowaniu tej reakcji.

Potwierdzenie tego modelu dostarczyły wyniki Strobla i współpracowników [37]. Wymieniali oni terminalny nukleotyd końca 3' tRNA<sup>Lys</sup> na 2'-deoksyadenozynę (dA) lub 2'-fluoroadenozynę (fA). Okazało się, że tak zmodyfikowane cząsteczki były aktywne jako substraty w rybosomalnym miejscu A, jednak ich aktywność zanikała gdy były testowane jako substraty w miejscu P. Na podstawie analiz ilościowych oszacowano, że eliminacja grupy 2'-OH A76 tRNA w miejscu P obniża szybkość syntezy wiązania peptydowego co najmniej 10<sup>6</sup>-krotnie. Ostatnio uzyskano struktury krystaliczne PTC ze związanym analogiem stanu przejściowego, w rozdzielczości 2,2 do 2,5 Å [38]. W pracach tych również potwierdzono, że grupa 2'-OH A 76 może mieć aktywny udział w reakcji tworzenia wiązania peptydowego.

Model ten został potwierdzony również przez dodatkowe eksperymenty opierające się na metodach dynamiki molekularnej (ang. *molecular dynamics*, MD) i pomiarach energii półempiryczną metodą wiązań walencyjnych (ang. *empirical valence bond*, EVB) [39]. Przeprowadzono symulacje syntezy wiązania peptydowego, opierając się na znanych strukturach krystalicznych dużych podjednostek rybosomalnych. Zaobserwowano spontaniczne utworzenie stabilnego wiązania wodorowego pomiędzy grupą  $\alpha$ -aminową a 2'-hydroksylową A76 P-tRNA w miejscu P. Co więcej, stwierdzono, że ta grupa hydroksylowa jest w stanie działać jako donor w wiązaniu wodorowym z sąsiadującą grupą 3'-OH, co jest potwierdzeniem sugerowanego wcześniej mechanizmu „przeskakiwania” protonu (ang. *proton shuttle mechanism*). Jednak także i ten model nie jest doskonały. Mianowicie, jeśli kataliza wiązania peptydowego zachodziłaby wyłącznie dzięki obecności grupy 2'-OH substratu, wówczas ta sama grupa mogłaby katalizować tę reakcję bez udziału rybosomu – nie można było by wtedy uznać tego za efekt katalityczny [40]. Dlatego też przy konstruowaniu hipotezy mechanizmu transpeptydacji należy brać pod uwagę dodat-

kowe czynniki, mogące wpływać na tę reakcję w tak złożonym układzie jakim jest rybosom, jak bezpośredni udział substratów lub inne, do dziś nie poznane czynniki.

## UWAGI KOŃCOWE

Dzięki rozwiązaniu struktury rybosomu prokariotycznego z rozdzielczością pojedynczego atomu, wiemy w jaki sposób ponad 3000 nukleotydów rRNA i 27 białek rybosomalnych oddziałuje ze sobą tworząc unikatowy kompleks enzymatyczny, spełniający podstawową rolę w każdej komórce, zarówno pro- jak i eukariotycznej. Problem katalitycznej siły rybosomu nadal nie jest poznany w szczegółach. Spośród istniejących modeli i hipotez na temat tworzenia wiązania peptydowego w rybosomie, nadal nie potrafimy wskazać tego, który odpowiadałby na wszystkie pytania na temat tej specyficznej reakcji. Dlatego tak ważne jest dalsze poznawanie dynamicznej struktury rybosomu, która jest zapewne jedynym kluczem do wyjaśnienia i zrozumienia mechanizmu jego działania.

## PIŚMIENNICTWO

- Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, Steitz TA (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289: 905-920
- Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM Jr, Morgan-Warren RJ, Carter AP, Vornrhein C, Hartsch T, Ramakrishnan V (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407: 327-339
- Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Earnest TN, Cate JH, Noller HF (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292: 883-896
- Rodnina MV, Daviter T, Gromadski K, Wintermeyer W (2002) Structural dynamics of ribosomal RNA during decoding on the ribosome. *Biochimie* 84: 745-754
- Wintermeyer W, Peske F, Beringer M, Gromadski KB, Savelsbergh A, Rodnina MV (2004) Mechanisms of elongation on the ribosome: dynamics of a macromolecular machine. *Biochem Soc Trans* 32: 733-737
- Noller HF (2005) RNA structure: reading the ribosome. *Science* 309: 1508-1514
- Bąkowska K (2005) Funkcja wybranych fragmentów 16S rRNA małej podjednostki rybosomalnej w procesie biosyntezy białka. *Biotechnologia* 2: 206-214
- Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore PB, Steitz TA (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289: 920-930
- Steitz TA, Moore PB (2003) RNA, first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. *Trends Biochem Sci* 28: 411-418
- Harms J, Schluenzen F, Zarivach R, Bashan A, Gat S, Agmon I, Bartels H, Franceschi F, Yonath A (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* 107: 679-688
- Schmeing TM, Seila AC, Hansen JL, Freeborn B, Soukup JK, Scaringe SA, Strobel SA, Moore PB, Steitz TA (2002) A pre-translocational intermediate in protein synthesis observed in crystals of enzymatically active 50S subunits. *Nat Struct Biol* 9: 225-230
- Piotrowska I, Dudzińska B, Twardowski T (2002) Struktura i funkcja rybosomu prokariotycznego. *Postępy Biochem* 48: 2-19
- Polacek N, Mankin AS (2005) The ribosomal peptidyl transferase center: structure, function, evolution, inhibition. *Crit Rev Biochem Mol* 40: 285-311
- Samaha RR, Green R, Noller HF (1995) A base pair between tRNA and 23S rRNA in the peptidyl transferase centre of the ribosome. *Nature* 377: 309-314
- Kim DF, Green R (1999) Base-pairing between 23S rRNA and tRNA in the ribosomal A site. *Mol Cell* 4: 859-864
- Krayevsky AA, Kukhanova MK (1979) The peptidyltransferase center of ribosomes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 23: 1-51
- Rodnina MV, Beringer M, Bieling P (2005) Ten remarks on peptide bond formation on the ribosome. *Biochem Soc Trans* 33: 493-498
- Maden BE, Monro RE (1968) Ribosome-catalyzed peptidyl transfer. Effects of cations and pH value. *Eur J Biochem* 6: 309-316
- Pestka S (1972) Peptidyl-puromycin synthesis on polyribosomes from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 624-628
- Muth GW, Ortoleva-Donnelly L, Strobel SA (2000) A single adenosine with a neutral pKa in the ribosomal peptidyl transferase center. *Science* 289: 947-950
- Katunin VI, Muth GW, Strobel SA, Wintermeyer W, Rodnina MV (2002) Important contribution to catalysis of peptide bond formation by a single ionizing group within the ribosome. *Mol Cell* 10: 339-346
- Rodnina MV, Wintermeyer W (2003) Peptide bond formation on the ribosome: structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* 13: 334-340
- Hansen JL, Schmeing TM, Moore PB, Steitz TA (2002) Structural insights into peptide bond formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11670-11675
- Barta A, Dorner S, Polacek N (2001) Mechanism of ribosomal peptide bond formation. *Science* 291: 203
- Moore PB, Steitz TA (2003) After the ribosome structures: How does peptidyl transferase work? *RNA* 9: 155-159
- Polacek N, Gaynor M, Yassin A, Mankin AS (2001) Ribosomal peptidyl transferase can withstand mutations at the putative catalytic nucleotide. *Nature* 411: 498-501
- Thompson J, Kim DF, O'Connor M, Lieberman KR, Bayfield MA, Gregory ST, Green R, Noller HF, Dahlberg AE (2001) Analysis of mutations at residues A2451 and G2447 of 23S rRNA in the peptidyltransferase active site of the 50S ribosomal subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9002-9007
- Polacek N, Gomez MJ, Ito K, Xiong L, Nakamura Y, Mankin A (2003) The critical role of the universally conserved A2602 of 23S ribosomal RNA in the release of the nascent peptide during translation termination. *Mol Cell* 11: 103-112
- Polacek N, Swaney S, Shinabarger D, Mankin AS (2002) SPARK—a novel method to monitor ribosomal peptidyl transferase activity. *Biochemistry* 41: 11602-11610
- Beringer M, Bruell C, Xiong L, Pfister P, Bieling P, Katunin VI, Mankin AS, Bottger EC, Rodnina MV (2005) Essential mechanisms in the catalysis of peptide bond formation on the ribosome. *J Biol Chem* 36065-36072
- Erlacher MD, Lang K, Shankaran N, Wotzel B, Huttenhofer A, Micura R, Mankin AS, Polacek N (2005) Chemical engineering of the peptidyl transferase center reveals an important role of the 2'-hydroxyl group of A2451. *Nucleic Acids Res* 33: 1618-1627
- Beringer M, Adio S, Wintermeyer W, Rodnina M (2003) The G2447A mutation does not affect ionization of a ribosomal group taking part in peptide bond formation. *RNA* 9: 919-922
- Sievers A, Beringer M, Rodnina MV, Wolfenden R (2004) The ribosome as an entropy trap. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7897-7901
- Hecht SM, Kozarich JW, Schmidt FJ (1974) Isomeric phenylalanyl-tRNAs. Position of the aminoacyl moiety during protein biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 4317-4321
- Wagner T, Cramer F, Sprinzl M (1982) Activity of the 2' and 3' isomers of aminoacyl transfer ribonucleic acid in the *in vitro* peptide elongation on *Escherichia coli* ribosomes. *Biochemistry* 21: 1521-1529
- Dorner S, Polacek N, Schulmeister U, Panuschka C, Barta A (2002) Molecular aspects of the ribosomal peptidyl transferase. *Biochem Soc Trans* 30: 1131-1136
- Weinger JS, Parnell KM, Dorner S, Green R, Strobel SA (2004) Substrate-assisted catalysis of peptide bond formation by the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* 11: 1101-1106

38. Steitz TA (2005) On the structural basis of peptide-bond formation and antibiotic resistance from atomic structures of the large ribosomal subunit. *FEBS Lett* 579: 955-958
39. Trobro S, Åqvist J (2005) Mechanism of peptide bond synthesis on the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 120: 12395-12400
40. Sharma PK, Xiang Y, Kato M, Warshel A (2005) What are the roles of substrate-assisted catalysis and proximity effects in peptide bond formation by the ribosome. *Biochemistry* 44: 11307-11314
41. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissing H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The protein data bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235-242

## Mechanism of peptide bond formation on the ribosome – controversions

Kamilla Bąkowska-Żywicka, Agata Tyczewska, Tomasz Twardowski

Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, 12/14 Noskowskiego St., 61-704 Poznań, Poland  
e-mail: twardows@ibch.poznan.pl

**Key words:** ribosome, rRNA, peptide-bond formation, protein biosynthesis

### ABSTRACT

During past five years there have been published many experimental data concerning structure and function of the ribosome. With the presentation of atomic structures we obtained a new data about composition of peptidyl transferase center. It is now obvious that PTC is composed entirely of rRNA. It is also known that the proper substrate alignment is the major factor for ribosome's catalytic activity. However, more detailed mechanism of peptide bond formation on the ribosome still remains unclear. Several issues remain unsolved. For example, are there any chemical components coming from ribosome itself, that enhance the rate of the reaction? Do intact ribosomes perform peptidyltransfer in the same way as the isolated ribosomal subunits that have been the source of most of the data? In this article we present different opinions and controversions around peptide bond formation on the ribosome.



## Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie ogłasza konkurs na stanowisko KIEROWNIKA PRACOWNI BADAWCZEJ

Do konkursu mogą przystąpić osoby ze stopniem naukowym doktora habilitowanego albo doktora z co najmniej dwuletnim stażem podoktorskim, posiadające znaczący dorobek naukowy.

Oferujemy pracę w największej placówce badawczej Polskiej Akademii Nauk prowadzącej badania w następujących dziedzinach: neurofizjologia, neurobiologia molekularna i komórkowa, biochemia i biologia komórki oraz neuropsychologia. Plany badawcze proponowane przez kandydatów powinny mieścić się w tematyce badań prowadzonych w Instytucie Nenckiego; do konkursu zapraszamy również osoby zajmujące się bioinformatyką i neuroinformatyką.

Pracownia będzie powołana na okres 5-letni, z możliwością przedłużenia kontraktu na czas nieokreślony po pozytywnej ocenie działalności grupy. Instytut Nenckiego zapewni przestrzeń laboratoryjną (do 80 m<sup>2</sup>) dostosowaną do indywidualnych potrzeb wybranego kandydata oraz dostęp do aparatury znajdującej się w Instytucie. Wybrany kandydat będzie miał możliwość zatrudnienia trzech osób.

Zainteresowane osoby prosimy o składanie podań zawierających następujące dokumenty:

- życiorys naukowy
- listę publikacji
- opis planowanych badań (nie więcej niż trzy strony maszynopisu)
- odbliski trzech wybranych prac badawczych
- opinie od trzech samodzielnych pracowników naukowych z poprzednich miejsc pracy.

Dokumenty należy składać do 15 lipca 2006 roku na adres Instytutu Nenckiego (ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa) lub elektronicznie (dyrekcja@nencki.gov.pl), z adnotacją: „Konkurs 2006”.

Informacje o Instytucie Nenckiego są dostępne na stronie internetowej [www.nencki.gov.pl](http://www.nencki.gov.pl), a dodatkowe informacje o warunkach konkursu można uzyskać pod adresem: [a.szewczyk@nencki.gov.pl](mailto:a.szewczyk@nencki.gov.pl)

Zgłoszenia będą rozpatrywane przez Komisję Konkursową powołaną przez Dyrektora Instytutu Nenckiego. Kandydaci mogą być zaproszeni na rozmowę kwalifikacyjną na koszt Instytutu Nenckiego. Rozstrzygnięcie konkursu nastąpi w październiku br.

## STRESZCZENIE

Peroksydacja lipidów jest procesem stale zachodzącym w warunkach fizjologicznych i polegającym na utlenianiu reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład fosfolipidów, będących podstawowymi składnikami błon biologicznych. Proces ten zachodzi zarówno na drodze nieenzymatycznej jak i w wyniku reakcji enzymatycznych, z utworzeniem wielu reaktywnych produktów. Nieenzymatyczne utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych zachodzi na drodze reakcji wolnorodnikowych, podczas gdy enzymatyczna peroksydacja lipidów odnosi się do procesu wytwarzania wodoronadtlenków lipidów w wyniku oddziaływania lipooksygenaz, w których centrum aktywnym związana została cząsteczka tlenu. W niniejszej pracy szczegółowo opisano mechanizmy obydwu procesów ze zwróceniem szczególnej uwagi na produkty końcowe utleniania kwasów tłuszczowych w tym izoprostany i neuroprostany, które uważane są za główne markery nieenzymatycznej peroksydacji lipidów. Omówiono również właściwości i rolę enzymów uczestniczących w procesie enzymatycznej peroksydacji lipidów. Ponadto katalityczne działanie peroksydaz i transferaz glutationowych – enzymów zapobiegających konsekwencjom utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych.

## WPROWADZENIE

Peroksydacja lipidów jest procesem stale zachodzącym w warunkach fizjologicznych i polegającym na utlenianiu reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład fosfolipidów, będących podstawowymi składnikami błon biologicznych. Proces ten zachodzi zarówno na drodze nieenzymatycznej jak i w wyniku reakcji enzymatycznych, z utworzeniem wielu reaktywnych produktów, w tym głównie aldehydów [1].

## NIEENZYMATYCZNA PEROKSYDACJA LIPIDÓW

Podstawowe reakcje zachodzące podczas nieenzymatycznej peroksydacji lipidów zostały przedstawione na rysunku 1 [1]. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (LH) wchodzące w skład fosfolipidów błonowych zawierają reaktywne grupy metylenowe, które łatwo oddają atom wodoru w reakcji z substancjami utleniającymi z utworzeniem rodnika alkilowego ( $L\cdot$ ), posiadającego niesparowany elektron na atomie węgla (związek 1, Ryc. 1) [1]. Peroksydację lipidów mogą zapoczątkować: ozon oraz rodniki: hydroksylowy, nadtlenkowy ( $LOO\cdot$ ), alkoksylowy ( $LO\cdot$ ), alkilowy ( $L\cdot$ ), rodnik wodoronadtlenkowy  $HO_2\cdot$  [1], tlenek i ditlenek azotu, ditlenek siarki [2] oraz anion chloranowy (I) [3]. Również jony metali przejściowych uczestnicząc w wytwarzaniu reaktywnych form tlenu ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ ) przyczyniają się do inicjacji peroksydacji lipidów [4,5,6]. Rodniki alkilowe w reakcji z tlenem cząsteczkowym ulegają przekształceniu w rodniki nadtlenkowe (peroksyłowe  $LOO\cdot$ ) będące pierwotnymi, łatwo ulegającymi przemianom, produktami utlenienia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [7]. Jeśli rodnik nadtlenkowy zlokalizowany jest na końcu układu wiązań podwójnych (związek 2, Ryc. 1) wówczas ulega on redukcji do wodoronadtlenku ( $LOOH$ ) [8]. Powstające w ten sposób wodoronadtlenki skoniugowanych dienów (związek 4, Ryc. 1) są pierwszymi produktami peroksydacji lipidów charakteryzującymi się względną trwałością w nieobecności jonów metali przejściowych [1]. Rodnik nadtlenkowy może zostać zredukowany przez cząsteczkę kwasu tłuszczowego, która przekształca się w rodnik alkilowy ( $L\cdot$ ), rozpoczynający łańcuch reakcji wolnorodnikowych utleniając inne cząsteczki kwasów tłuszczowych. Głównym czynnikiem decydującym o długości łańcucha reakcji wolnorodnikowych w warunkach *in vivo*, jest witamina E występująca w dwuwarstwie lipidowej i redukująca rodniki nadtlenkowe do wodoronadtlenków [9]. Wszystkie wodoronadtlenki lipidów przedstawione na rysunku 1 i ich regio- i stereoizomery mogą być zredukowane przez jony metali przejściowych do rodników alkoksylowych, które ulegają  $\beta$ -rozszczepieniu z utworzeniem bardzo wielu produktów [10, 2]. W ten sposób powstaje szereg związków epoksydowych (np. 2,3-epoksybutanal czy 2,3-epoksy-4-hydroksynonanal), oraz aldehydów nasyconych (np. heksa-

Wojciech Łuczaj

Elżbieta Skrzydlewska

Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej,  
Akademia Medyczna w Białymstoku, Białystok

Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej,  
Akademia Medyczna w Białymstoku, ul.  
Mickiewicza 2a, 15-230 Białystok; e-mail:  
skrzydle@amb.edu.pl, tel.: (085) 748-5707, faks:  
(085) 748-5707

Artykuł otrzymano 22 września 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 12 października 2005 r.

**Słowa kluczowe:** nieenzymatyczna peroksydacja lipidów, enzymatyczna peroksydacja lipidów, lipooksygenazy, fosfolipaza  $A_2$ , peroksydazy glutationowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** AA – kwas arachidonowy, COX-1 - konstytutywna izoforma cyklooksygenazy, COX-2 - indukowalna izoforma cyklooksygenazy, DHA – kwas dokozaheksaenowy, GPxs – peroksydazy glutationowe, GSH- glutation, LOXs – lipooksygenazy, MDA - dialdehyd malonowy

nal, pentanal) i  $\alpha,\beta$ -nienasyconych (np. akroleina, aldehyd krotonowy, 4-hydroksynonenal, 2-heksenal, 2-heptenal, 2-oktenal, 2-nonenal, 2,4-nonadienal, 2,4-dekadial) [10]. Związki te powstają z kwasów tłuszczowych w różnych ilościach w zależności od budowy kwasów oraz warunków utleniania. W ostatnich latach doniesiono o nowym produkcie peroksydacji lipidów – 4-oxo-2-nonenalu, powstającym w wyniku przemiany wodoronadtlenku kwasu linolowego [11]. Różnorodność powstających produktów peroksydacji lipidów przedstawiono na przykładzie związków będących produktami utleniania kwasu arachidonowego (AA) w pozycji 15 (tabela 1).

Jeżeli grupa nadtlenkowa zlokalizowana jest wewnątrz łańcucha węglowodorowego kwasu tłuszczowego (związek 3, Ryc. 1), rodnik ulega reakcji cyklizacji z wytworzeniem cyklicznego nadtlenu (związek 5, Ryc. 1) [12], który może ulegać dalszym przemianom na dwa sposoby. W wyniku przyłączenia tlenu cząsteczkowego przekształca się on w rodnik nadtlenny (związek 6, Ryc. 1) lub może ulec ponownej cyklizacji z wytworzeniem bicyklicznego nadtlenu, który po przyłączeniu kolejnej cząsteczki  $O_2$  i redukcji daje cykliczny endotlenek (związek 7, Ryc. 1) charakteryzujący się strukturalną analogią do nadtlenu prostaglandyny (PGG<sub>2</sub>) [12]. W wyniku chemicznej konwersji bicyklicznej grupy nadtlenkowej tego związku powstają izoprostany i dialdehyd malonowy (MDA), a jako produkty uboczne wytwarzane są jednocześnie 17-węglowe kwasy tłuszczowe (związek 8, Ryc. 1) [13].

Izoprostany reprezentują liczną rodzinę kwasów karboksylowych będących izomerami prostaglandyn, powstają-

cych w wyniku wolnorodnikowej peroksydacji kwasu arachidonowego i innych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (np. kwasu eikozapentanowego i  $\gamma$ -linolenowego) zachodzącej *in vivo* [14]. Mechanizm powstawania izoprostanów z kwasu arachidonowego został przedstawiony na rysunku 2 [15]. Na uwagę zasługuje możliwość tworzenia się izoprostanów na drodze dwóch mechanizmów endonadtlenkowego i dioksetanowego [14,15]. W związku z tym w wyniku utlenienia na drodze wolnorodnikowej z kwasu arachidonowego mogą powstać w różnych ilościach 64 różne izomery [16]. W największej ilości wytwarzany jest izomer 8-izo-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  nazywany także 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (związek typu IV, Ryc. 2). Związki te wytwarzane są *in situ* w fosfolipidach, a następnie uwalniane przez fosfolipazę A<sub>2</sub>.

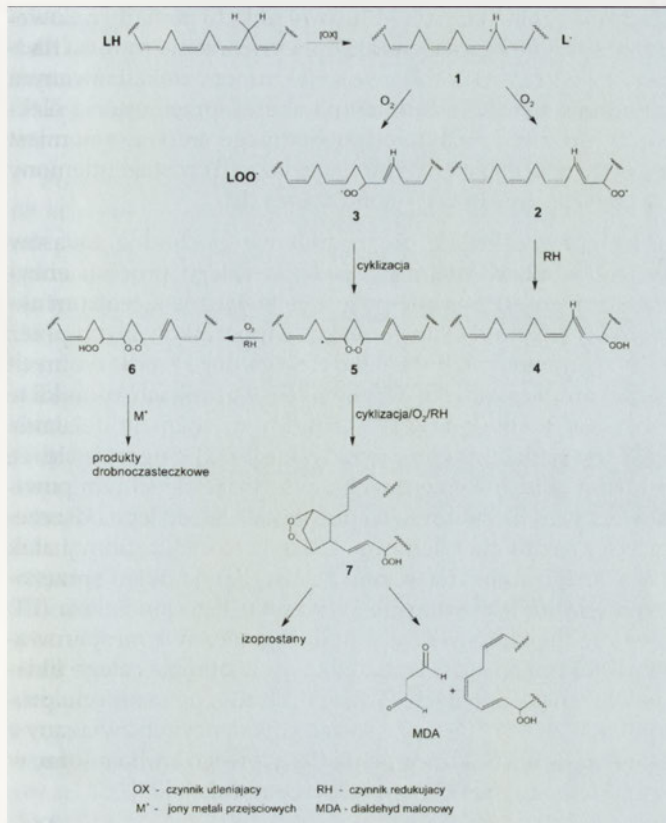
W ostatnich latach zgromadzono wiele dowodów potwierdzających, że izoprostany należą do najbardziej wiarygodnych biomarkerów peroksydacji lipidów i stresu oksydacyjnego zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* [15,17]. Decyduje o tym przede wszystkim fakt, że izoprostany będące specyficznymi produktami peroksydacji lipidów występują w wykrywalnych ilościach jako formy zestrzyfikowane w tkankach, a jako formy wolne w płynach biologicznych [15]. Podwyższoną zawartość izoprostanów stwierdzono w moczu i krwi w różnych stanach patologicznych związanych z nadmiernym wytwarzaniem wolnych rodników takich jak: palenie papierosów, marskość wątroby wywołana alkoholem, nowotwory czy też miażdżyca [18]. Opracowano wiele metod służących do jakościowego i ilościowego oznaczania izoprostanów takich jak: metoda immunologiczna [19], chromatografia gazowa ze spektrometrią masową GC-MS [20] i chromatografia cieczowa ze spektrometrią masową LC-MS/MS [21]. Stwierdzono, że izoprostany nie są jednak końcowymi produktami peroksydacji lipidów, ale mogą ulegać dalszemu metabolizmowi. Ostatnio, wykorzystując znakowany trytem 8-izo-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , udało się ustalić podstawowy metabolit tego związku pojawiający się w moczu człowieka, jakim jest 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-izo-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  [22].

Oprócz izoprostanów, przemiany wolnorodnikowe kwasu arachidonowego mogą prowadzić do innej grupy związków zwanych izofuranami, posiadających podstawiony pierścień tetrahydrofuranowy powstały w wyniku przyłączenia tlenu cząsteczkowego ( $O_2$ ) do pierścienia cyklopentanowego (Ryc. 3) [23]. Czynnikiem decydującym o powstawaniu izoprostanów lub izofuranów jako produktów utleniania kwasów tłuszczowych jest ciśnienie  $O_2$ . Stwierdzono, że wzrost ciśnienia  $O_2$  sprzyja wytwarzaniu izofuranów [24]. Na podstawie badań *in vitro* z wykorzystaniem izotopu tlenu <sup>18</sup>O zaproponowano dwa mechanizmy prowadzące do wytwarzania tych związków [23]. Pierwszy obejmuje rozerwanie pierścienia cyklicznego nadtlenu, drugi zaś uwzględnia hydrolizę związku epoksydowego.

Tabela 1. Produkty peroksydacji kwasu arachidonowego w pozycji 15 (uszeregowane wg masy cząsteczkowej).

Masa cząst.	Wzór	Nazwa
354	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	kwas 11,14,15-trihydroksy-5,8,12-eikozatrienowy
336	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	kwas 15-hydroperoksy-5,8,11,13-eikozatetraenowy (15-HPETE)
336	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	kwas 11-hydroksy-15-okso-5,8,12-eikozatrienowy
336	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	kwas 14,15-epoksy-11-hydroksy-5,8,12-eikozatrienowy
336	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	kwas 9,15-dihydroksy-5,7,11,13-eikozatetraenowy
336	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	kwas 5,11-dihydroksy-6,8,12,14-eikozatetraenowy
318	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	kwas 15-hydroksy-5,8,11,13-eikozatetraenowy (15-HETE)
316	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	kwas 15-okso-5,8,11,13-eikozatetraenowy (15-KETE)
278	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	kwas 15-hydroksy-16-okso-5,8,11,13-heksadecatetraenowy
248	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	kwas 15-okso-5,8,11,13-pentadecatetraenowy
172	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	kwas 4-hydroksy-2-nonenowy
168	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	4,5-epoksy-2-dekenal
156	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	4-hydroksy-2-nonenal (4-HNE)
146	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	kwas 2-hydroksyheptanowy
130	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	2-hydroksyheptanal
100	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	Heksanal
72	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	dialdehyd malonowy (MDA)



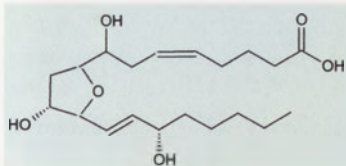


Rycina 1. Mechanizm nieenzymatycznej peroksydacji lipidów.

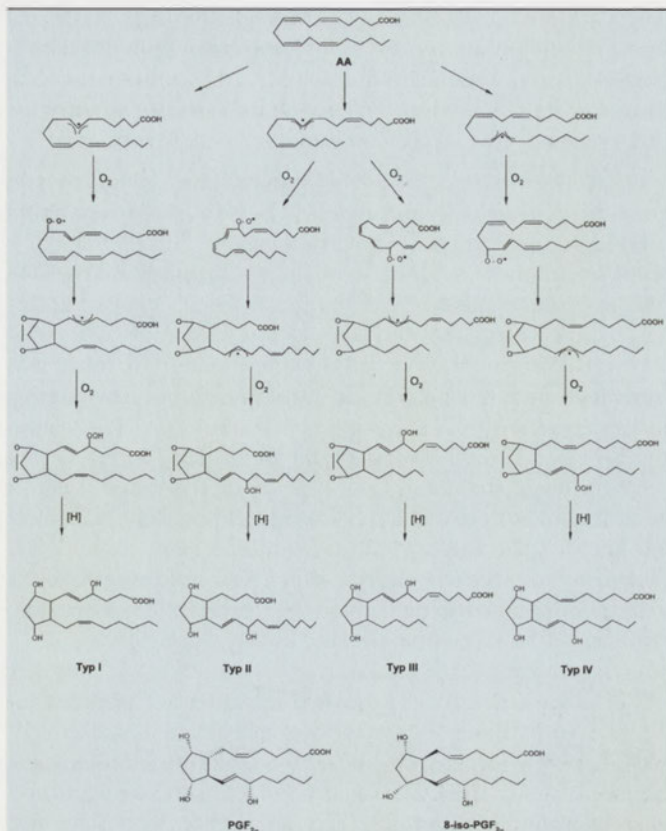
Na działanie wolnych rodników bardziej podatny niż kwas arachidonowy jest kwas dokozaheksaenowy (DHA), który posiada więcej wiązań podwójnych. Niedawno stwierdzono, że w wyniku jego utleniania wytwarzane są związki o strukturze zbliżonej do izoprostanów, nazywane neuroprostanami ze względu na fakt, że powstają w neuronach mózgu człowieka, gdzie DHA stanowi 25-35% wszystkich kwasów tłuszczowych (Ryc. 4) [24,25]. Większa ilość wiązań podwójnych w DHA decyduje o tym, że w wyniku jego przemian powstaje osiem regioizomerów a nie cztery, jak ma to miejsce w przypadku izoprostanów. W konsekwencji można otrzymać aż 128 izomerów neuroprostanów [24]. Neuroprostany zidentyfikowano w płynie mózgoworodzeniowym zdrowego człowieka [26]. Stwierdzono, że ich ilość wzrasta w przypadku chorób neurodegeneracyjnych, a zwłaszcza u pacjentów z chorobą Alzheimera. Pomiar poziomu neuroprostanów uznano za lepszy wskaźnik uszkodzeń neuronalnych aniżeli pomiar poziomu izoprostanów [27].

### ENZYMATYCZNA PEROKSYDACJA LIPIDÓW

Niezależnie od opisanego powyżej procesu nieenzymatycznej peroksydacji lipidów, w organizmie, proces oksydacyjnej modyfikacji lipidów może zachodzić także pod wpływem działania enzymów. Pojęcie enzymatycznej



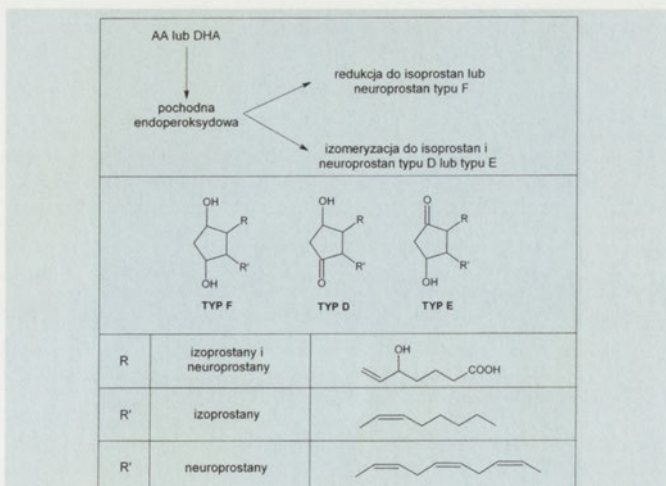
Rycina 3. Przykładowa struktura związku z grupy izofuranów [AC-Δ<sup>13</sup>-9-IsoF].



Rycina 2. Schemat mechanizmu wytwarzania izoprostanów.

peroksydacji lipidów odnosi się do procesu wytwarzania wodoronadtlenków lipidów w wyniku oddziaływania na wielonienasycone kwasy tłuszczowe enzymu, w którego centrum aktywnym związana została cząsteczka tlenu.

Zachodzenie peroksydacji enzymatycznej jest ograniczone faktem, że większość enzymów zapoczątkowujących proces peroksydacji działa tylko na wolne kwasy tłuszczowe [28]. Natomiast w zdrowych tkankach wolne kwasy tłuszczowe nie występują lub obecne są jedynie w ilościach śladowych [28]. Wolnych kwasów tłuszczowych podatnych na działanie enzymów dostarcza jednak fosfolipaza A<sub>2</sub> [29], która hydrolizuje wiązanie estrowe w pozycji sn-2 glicerolo-

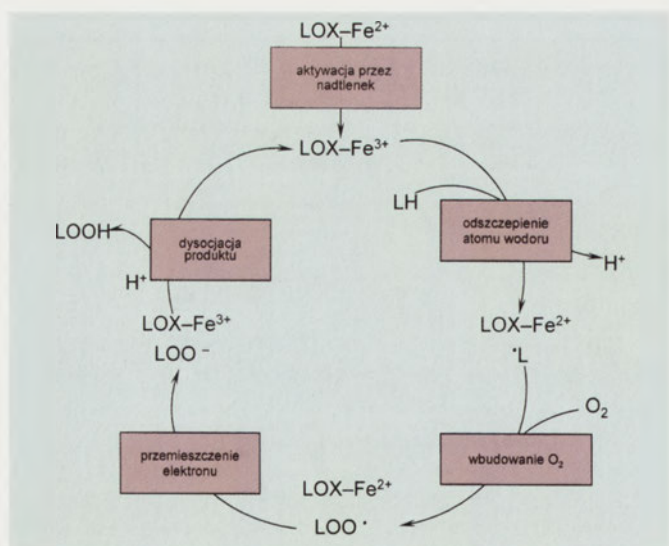


Rycina 4. Schemat reakcji powstawania oraz struktury chemiczne izoprostanów i neuroprostanów.

wego szkieletu fosfolipidów, w której zazwyczaj zlokalizowane są wielonienasycone kwasy tłuszczowe [30]. Fosfolipaza A<sub>2</sub> usuwa również z dwuwarstwy lipidowej utlenione fosfolipidy błonowe i w ten sposób uczestniczy również w procesach naprawczych błon biologicznych [31].

Właściwą peroksydację enzymatyczną rozpoczynają enzymy z grupy lipooksygenaz (LOXs), które katalizują utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z wytworzeniem ich odpowiednich wodoronadtlenków. Do dzisiaj podano blisko 20 pełnych sekwencji genów kodujących lipooksygenazy występujące w organizmach zwierzęcych, którym przyporządkowano siedem różnych izoform tego enzymu [32,33]. Ze względu na pokrewieństwo filogenetyczne lipooksygenazy podzielono na cztery grupy: 5-LOXs, 12-LOXs typu płytkowego, 12/15-LOXs typu retikulocytarnego oraz LOXs typu epidermalnego. Pośród wszystkich izoform LOX tylko 12/15-lipooksygenaza jest zdolna do utleniania reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład fosfolipidów będących składnikami błon biologicznych i lipoprotein [33]. Pozostałe izoformy działają tylko na wolne kwasy tłuszczowe.

Wykazano, że proces peroksydacji musi być poprzedzony aktywacją lipooksygenazy, w czasie której jon żelaza (II) zlokalizowany w centrum aktywnym enzymu utleniany jest do jonu żelaza (III) [32]. Najczęściej dochodzi do tego pod wpływem nadtlenków [28]. Właściwy proces peroksydacji lipidów składa się z trzech etapów [28]. Pierwszy rozpoczynający całą przemianę etap polega na stereoselektywnym usunięciu atomu wodoru z węgla alilowej grupy metylenowej, co prowadzi do wytworzenia rodnika alkilowego (L<sup>•</sup>) kwasu tłuszczowego (Ryc. 5). Uważa się, że wodór odszczepiany jest jako proton natomiast elektron wyłapywany jest przez jon żelaza (III), który w konsekwencji zostaje zredukowany do jonu żelaza (II). Drugi etap przemian prowadzący do powstawania LOOH, związany jest ze zmianą lokalizacji elektronu w obrębie łańcucha węglowego kwasu tłuszczowego, możliwą dzięki istnieniu sprzężonych wiązań podwójnych charakteryzujących się izomerią typu *cis* [1]. Na etapie trzecim ma miejsce wbudowanie tlenu czą-

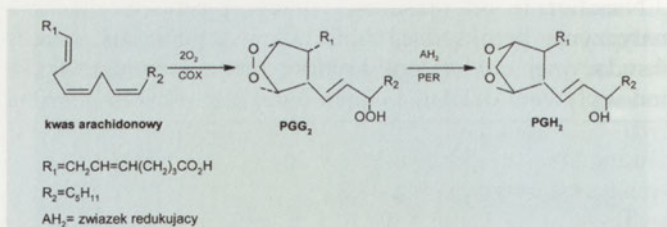


Rycina 5. Mechanizm działania lipooksygenaz.

steczkowego w pozycji C-1 lub C-4 układu pentadienylowego w wyniku czego dochodzi do wytworzenia rodnika nadtlenkowego z niesparowanym elektronem zlokalizowanym na atomie tlenu. Rodnik ten na skutek przeniesienia elektronu ulega redukcji do odpowiedniego anionu, natomiast zawarty w obrębie enzymu jon żelaza (II) zostaje utleniony do postaci wyjściowej – jonu żelaza (III).

Należy podkreślić, że rodnikowe pochodne kwasów tłuszczowych wytwarzane podczas całego procesu enzymatycznego przeważnie pozostają związane z centrum aktywnym enzymu. Dlatego reakcji zapoczątkowanych przez LOX nie można traktować jako efektywnego źródła wolnych rodników, aczkolwiek w pewnych warunkach rodniki te mogą być uwolnione [34]. Dokładny mechanizm działania LOX jest nadal przedmiotem dyskusji [32]. Sugeruje się, że centrum aktywne enzymu charakteryzuje się silnym powinowactwem do protonu, co przyczynia się do jego odszczenia z grupy metylenowej. Ułatwia to elektrofilowy atak związanego z enzymem jonu żelaza (III) na układ sprzężonych wiązań podwójnych. W wyniku tego jon żelaza (III) ulega redukcji i powstaje rodnik organiczny z niesparowanym elektronem zdelokalizowanym w obrębie całego układu wiązań podwójnych. Z drugiej strony, po usunięciu protonu, jon żelaza (III) może zostać kowalencyjnie związany z atomem węgla na końcu pentadienylowego karboanionu, w wyniku czego nie dochodzi do jego redukcji [28].

Enzymatyczna peroksydacja wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest również procesem zapoczątkującym powstawanie wielu biologicznie aktywnych związków takich jak prostanoidy: prostaglandyny, tromboksany i leukotrieny. Uwolniony przez fosfolipazę A<sub>2</sub> kwas arachidonowy stanowi wyjściowy substrat w syntezie prostanoidów zachodzącej z udziałem cyklooksygenaz, enzymów katalizujących utlenianie kwasu arachidonowego [35]. W ostatnich latach wyodrębniono dwie izoformy tego enzymu: konstytutywną (COX-1) i indukowalną (COX-2), pojawiającą się pod wpływem czynników zapalnych takich jak endotoksyna, cytokiny prozapalne, czynniki mitogenne oraz niektóre hormony [36]. Za wytwarzanie prostaglandyn w większym stopniu odpowiedzialna jest izoforma COX-2 [37]. W wyniku jej działania początkowo z pozycji 13-*pro(S)* kwasu arachidonowego oderwany jest atom wodoru a w pozycji C-11 rodnika pentadienylowego zostaje przyłączona cząsteczka tlenu O<sub>2</sub> (Ryc. 6). Zostaje wytworzony w ten sposób rodnik nadtlenkowy, który ulega dwukrotnej cyklizacji, co w konsekwencji prowadzi do wytworzenia rodnika alkilowego z mostkiem nadtlenkowym zlokalizowanym wewnątrz cząsteczki [35]. Rodnik ten po przyłączeniu cząsteczki tlenu w pozycji C-15 przekształcony zostaje w rodnik nadtlenkowy,



Rycina 6. Mechanizm wytwarzania eikozanoidów z kwasu arachidonowego przy udziale cyklooksygenazy.

z którego w procesie redukcji wytworzony zostaje wodoronadtlenek prostaglandyny G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>). Następnie wodorotlenek ten zostaje zredukowany do pochodnej alkoholowej (PGH<sub>2</sub>), która przy udziale izomeraz zostaje przekształcona w prostaglandyny i tromboksan B<sub>2</sub> [35].

Porównując obydwa procesy peroksydacji lipidów można stwierdzić, że proces enzymatyczny znacznie różni się od przemian zachodzących podczas nieenzymatycznego cyklu reakcji, np. wytworzone w procesie przemian enzymatycznych wodoronadtlenki lipidów wykazują chiralność [38]. Ważniejsza jest jednak możliwość zakończenia wytwarzania wolnych rodników w procesie enzymatycznym w odróżnieniu od nieenzymatycznej peroksydacji lipidów, w której ma miejsce stała prolongacja łańcucha reakcji wolnorodnikowych. W trakcie peroksydacji enzymatycznej, wytworzone rodniki nadtlenkowe lipidów zostają przekształcone w aniony, w wyniku czego dochodzi do wyczerpania substratu zawierającego niesparowany elektron, a tym samym do zahamowania generacji wodoronadtlenków [38]. Wbrew dotychczasowym opiniom ciąg przemian enzymatycznych i nieenzymatycznych prowadzących do peroksydacji fosfolipidów błonowych nie zachodzi niezależnie od siebie. Obydwa procesy wyzwalają się wzajemnie. Reakcja enzymatyczna z udziałem lipooksygenaz rozpoczyna się wtedy, gdy stężenie wodoronadtlenków lipidów przekroczy submikromolową graniczną wartość [38]. Taka ilość wodoronadtlenków wytwarzana jest w procesie peroksydacji nieenzymatycznej i wykorzystywana jest jako starter dla enzymatycznej przemiany kwasów tłuszczowych z udziałem lipooksygenaz. Z drugiej strony reakcje katalizowane przez lipooksygenazy mogą inicjować nieenzymatyczną peroksydację reszt kwasów tłuszczowych fosfolipidów. W trakcie cyklu katalizowanego przez lipooksygenazę, wytwarzane jako produkty przejściowe rodniki alkilowe i nadtlenkowe, mogą opuścić centrum aktywne enzymu. Uwolnione nadtlenkowe rodniki lipidów zdolne są do zainicjalizowania peroksydacji poprzez odszczepienie wodoru od *bis*-alilowych grup metylenowych obecnych w łańcuchach reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład fosfolipidów [30]. Ponadto wodoronadtlenki lipidów, powstałe w wyniku działania lipooksygenaz w obecności pewnych katalizatorów (takich jak związki kompleksowe metali przejściowych czy semichinony), mogą ulec przemianie w reaktywne rodniki nadtlenkowe i alkoksylowe, które ponownie przez odszczepienie wodoru mogą inicjować nieenzymatyczny proces peroksydacji [30].

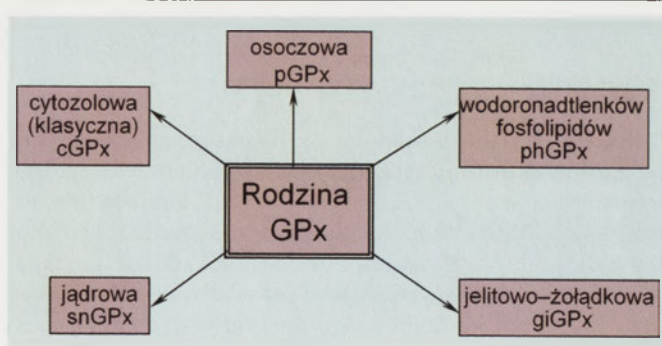
## ROLA PEROKSYDAZ GLUTATIONOWYCH W ZAPOBIEGANIU SKUTKOM PEROKSYDACJI LIPIDÓW

Końcowymi produktami peroksydacji lipidów powstającymi w największych ilościach są  $\alpha,\beta$ -nienasycone aldehydy o niskich masach cząsteczkowych, charakteryzujące się dłuższym czasem półtrwania niż reaktywne formy tlenu i zdolnością do dyfuzji do odległych nawet obszarów komórki względem miejsc ich powstawania. Przemieszczając się na swej drodze powodują uszkodzenie komórki, dzięki czemu można je traktować jako wtórne przekaźniki peroksydacji lipidów [10]. Aldehydy te mogą reagować z grupami aminowymi i tiolowymi wielu innych związków ważnych biologicznie takich jak białka i DNA. W reakcje z

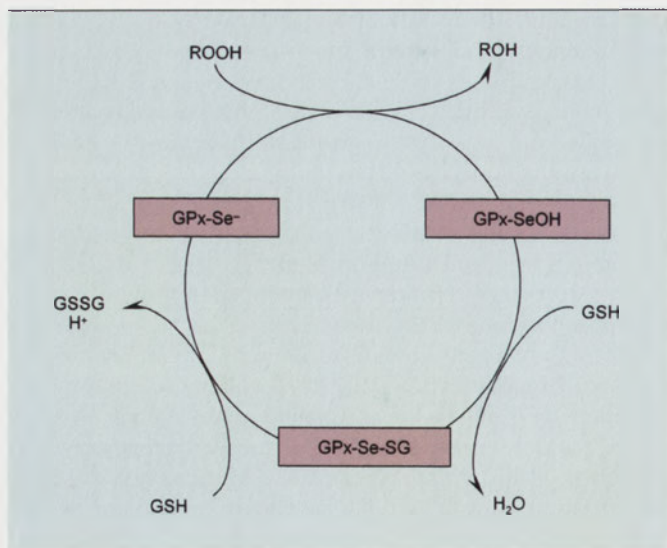
resztami aminokwasowymi białek łatwo wchodzi dialdehyd malonowy oraz 4-hydroksy-2-nonenal w wyniku czego wytwarzane są pochodne karbonylowe białek [10]. Dobrze poznano reakcje addycji Michaelisa 4-hydroksy-2-nonenalu z grupą  $\epsilon$ -aminową lizyny, grupą sulfhydrylową cysteiny i grupą imidazolową histydyny z utworzeniem odpowiednio drugorzędowej aminy, tioestru i czwartorzędowej pochodnej amin [39,40]. Produkty peroksydacji lipidów reagują z resztami lizylowymi apolipoproteiny B cząsteczki LDL [10]. W wyniku reakcji  $\alpha,\beta$ -nienasyconych aldehydów z zasadami purynowymi i pirymidynowymi DNA, wytwarzanych jest szereg połączeń prowadzących m.in. do hamowania replikacji i transkrypcji DNA [10,41]. Należy też podkreślić, że aldehydy powstające w wyniku peroksydacji lipidów wchodząc w reakcje z DNA i białkami wykazują przy tym właściwości zarówno toksyczne jak i mutagenne [10,42,43]. Stwierdzono, że najbardziej toksycznym produktem peroksydacji lipidów jest 4-hydroksy-2-nonenal [44]. Właściwości mutagenne zarówno w stosunku do komórek bakteryjnych jak i zwierzęcych wykazuje akroleina, aldehyd krotonowy jak też MDA [45], przy czym związkiem najbardziej mutagennym jest MDA [44].

Bezpośrednim jak i odległym konsekwencjom peroksydacji lipidów przeciwdziałają enzymy z rodziny peroksydaz glutationowych (GPxs). Enzymy te w kooperacji z glutationem (GSH) jako kosubstratem, zdolne są do redukcji zarówno organicznych jak i nieorganicznych wodoronadtlenków z wytworzeniem odpowiednich związków hydroksylowych [28]. Znane są dwa typy peroksydaz glutationowych: zawierające selen i niezawierające selenu w centrum aktywnym.

Peroksydazy glutationowe zależne od selenu zawierają w centrum aktywnym selenocysteinę – aminokwas, który uczestniczy w cyklu reakcji katalizowanych przez ten enzym [28,46]. Do tej pory zidentyfikowano pięć izoform zależnej od selenu peroksydazy glutationowej (Ryc. 7). Wśród izoform peroksydazy glutationowej zależnej od selenu tylko peroksydaza glutationowa wodoronadtlenków fosfolipidów (phGPx) posiada zdolność redukcji wodoronadtlenków znajdujących się w obrębie fosfolipidów błonowych [28]. Pozostałe izoformy katalizują tylko redukcję wolnych wodoronadtlenków. Podczas reakcji zachodzącej z udziałem peroksydazy glutationowej (Ryc. 8) selen utlenia się przez wodoronadtlenek do pochodnej kwasu selenowego (GPx-SeOH), która następnie ulega redukcji [47,48]. Jeżeli związkiem redukującym jest GSH dochodzi



Rycina 7. Rodzina peroksydaz glutationowych zależnych od selenu.



Rycina 8. Mechanizm działania peroksydaz glutationowych zależnych od selenu.

do utworzenia formy selenodisulfidowej (R-Se-SG), która pod wpływem działania drugiej cząsteczki glutationu ulega zredukowaniu do formy wyjściowej peroksydazy glutationowej GPx. Należy jednak podkreślić, że działanie peroksydaz (w tym także pHGPx) nie jest w stanie odwrócić chemicznych zmian wywołanych peroksydacją. Jedynie można mówić o zmniejszeniu prawdopodobieństwa wytwarzania reaktywnych produktów w tym także wolnych rodników. Dzięki redukcji reaktywnych wodoronadtlenków lipidów do ich odpowiednich pochodnych hydroksylowych. Jednak hydrofilowe grupy hydroksylowe tych związków zaburzają również strukturę błony w podobnym stopniu jak grupy nadtlenkowe, a jedynym sposobem na likwidację strukturalnych uszkodzeń błony jest hydroliza prowadząca do odtrawienia cząsteczki kwasu.

Drugą grupą enzymów odpowiedzialnych za usuwanie produktów peroksydacji lipidów są S-transferazy glutationowe dawniej uznawane za peroksydazy glutationowe niezależne od selenu [49,50]. Enzymy te nie zawierają selenu i katalizują reakcję sprzężenia glutationu z wieloma związkami elektrofilowymi, między innymi aldehydami będącymi produktami peroksydacji lipidów w tym, przede wszystkim z 4-hydrokso-2-nonenalem [51,52]. Reakcje tego typu prowadzą do powstawania S-koniugatów glutationu, które usuwane są na zewnątrz komórki. Niektóre z S-transferaz glutationowych (zwłaszcza należące do klasy alfa) zdolne są również do katalizowania reakcji redukcji wodoronadtlenków lipidów podobnie jak peroksydazy glutationowe zależne od selenu, lecz w odróżnieniu od nich nie katalizują reakcji redukcji nadtlenku wodoru [49].

Powyższe dane wskazują, że peroksydazy glutationowe zdolne są do zapobiegania skutkom utleniania lipidów zarówno na etapie pośrednim, poprzez katalityczną redukcję wodoronadtlenków lipidów z udziałem peroksydaz glutationowych zależnych od selenu, jak też na etapie końcowym, dzięki wytwarzaniu przy udziale S-transferaz glutationowych koniugatów glutationu z drobnocząsteczkowymi aldehydami, będącymi końcowymi produktami peroksydacji lipidów.

## LITERATURA

- Porter NA (1986) Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Acc Chem Res* 19: 262-268
- Dix TA, Aikens J (1993) Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem Res Toxicol* 6: 2-18
- Panaseko OM (1997) The mechanism of hypochlorite-induced lipid peroxidation. *Biofactors* 6: 181-190
- Sarkar S, Yadav P, Trivedi R, Bansal AK, Bhatnagar D (1995) Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rats tissues. *J Trace Elem Med Biol* 9: 144-149
- Minotti G (1993) Sources and role of iron in lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 6: 134-146
- Glass GA, Stark AA (1997) Promotion of glutathione- $\gamma$ -glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation by copper and ceruloplasmin: The requirement for iron and the effects of antioxidants and antioxidant enzymes. *Environ Mol Mutagen* 29: 73-80
- Marnett LJ (1999) Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424: 83-95
- Pryor WA (1986) Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 48: 657-667
- Waldeck AR, Stocker R (1996) Radical-initiated lipid peroxidation in low density lipoproteins: insights obtained from kinetic modeling. *Chem Res Toxicol* 9: 954-964
- Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I (2004) Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 43: 200-227
- Lee SH, Blair IA (2000) Characterization of 4-oxo-2-nonenal as a novel product of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 13: 698-702.
- Pryor WA, Stanley JP (1975) A suggested mechanism for the polyunsaturated fatty acids. Non-enzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem* 40: 3615-3617
- Morrow JD, Roberts LJ 2nd (1996) The isoprostanes-current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol* 51: 1-9
- Rokach J, Khanapure SP, Hwang SW, Adiyamen M, Lawson JA, FitzGerald GA (1997) The isoprostanes perspective. *Prostaglandins* 54: 823-851
- Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA (1999) Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation *in vivo*. *J Biol Chem* 274: 24441-24444
- de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med* 26: 202-226
- Griffiths HR, Moller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, Cooke M, Coolen S, Haenen G, Hoberg AM, Loft S, Lunec J, Olinski R, Parry J, Pompella A, Poulsen H, Verhagen H, Astley SB (2002) Biomarkers. *Mol Aspects Med* 23: 101-208
- Morrow JD, Chen Y, Brame CJ, Yang J, Sanchez SC, Xu J, Zeckert WE, Awad JA, Roberts LJ (1999) The Isoprostanes: unique prostaglandin – like products of free radical initiated lipid peroxidation. *Drug Metab Rev* 31: 117-139
- Wang Z, Ciabattoni G, Creminon C, Lawson J, Fitzgerald GA, Patrono C, Maclouf J (1995) Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub> alpha excretion in man. *J Pharmacol Exp Ther* 275: 94-100.
- Lee CY, Jenner AM, Halliwell B (2004) Rapid preparation of human urine and plasma samples for analysis of F<sub>2</sub>-isoprostanes by gas chromatography-mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 696-702
- Li H, Lawson JA, Reilly M, Adiyaman M, Hwang S-W, Rokach J, FitzGerald GA (1999) Quantitative high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of the four classes of F<sub>2</sub>-isoprostanes in human urine. *PNAS* 96: 13381-13386.
- Roberts LJ, Morrow JD (1997) The generation and action of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta* 1345: 121-135
- Fessel JP, Porter NA, Moore KP, Sheller JR, Roberts LJ 2nd (2002) Discovery of lipid peroxidation products formed *in vivo* with a substituted

- tetrahydrofuran ring (isofurans) that are favored by increased oxygen tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16713-16718
24. Roberts LJ 2nd, Fessel JP (2004) The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran pathways of lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 128: 173-186
  25. Skinner ER, Watt C, Besson JA, Best PV (1993) Differences in the fatty acid composition of the grey and white matter of different regions of the brains of patients with Alzheimer's disease and control subjects. *Brain* 116: 717-725
  26. Roberts LJ 2nd, Montine TJ, Markesbery WR, Tapper AR, Hardy P, Chemtob S, Dettbarn WD, Morrow JD (1998) Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) *in vivo* from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* 273: 13605-13612
  27. Reich EE, Markesbery WR, Roberts LJ 2nd, Swift LL, Morrow JD, Montine TJ (2001) Brain Regional Quantification of F-Ring and D-/E-Ring Isoprostanes and neuroprostanes in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 158: 293-297
  28. Kühn H, Borchert A (2002) Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med* 33: 154-172
  29. Murakami M, Yoshihara K, Shimbara S, Lambeau G, Singer A, Gelb MH, Sawada M, Inagaki N, Nagai H, Kudo I (2002) Arachidonate release and eicosanoid generation by group IIE phospholipase A(2). *Biochem Biophys Res Commun* 292: 689-696
  30. Nigam S, Schewe T (2000) Phospholipase A<sub>2</sub>s and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1488: 167-181
  31. Cheeseman KH (1993) Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspects Med* 14: 191-197
  32. Brash AR (1999) Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 274: 23679-23682
  33. Kühn H, Thiele BJ (1999) The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett* 449: 7-11
  34. Kühn H, Belkner J, Wiesner R, Brash AR (1990) Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase. *J Biol Chem* 265: 18351-18361
  35. Marnett LJ (2000) Cyclooxygenase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 4: 545-552
  36. Brooks P, Emery P, Evans JF, Fenner H, Hawkey CJ, Patrono C, Smolen J, Breedveld F, Day R, Dougados M, Ehrlich EW, Gijon-Baños J, Kvien TK, Van Rijswijk MH, Warner T, Zeidler H (1999) Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Rheumatology* 38: 779-788
  37. Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA (1999) Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem* 274: 22903-22906
  38. Spittler G (2001) Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Exp Gerontol* 36: 1425-1457
  39. Nadkarni DV, Sayre LM (1995) Structural definition of early lysine and histidine adduction chemistry of 4-hydroxynonenal. *Chem Res Toxicol* 8: 284-291
  40. Uchida K, Stadtman ER (1993) Covalent modification of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate. *J Biol Chem* 268: 6388-6393
  41. Hemminki K, Dipple A., Shuker DEG, Kadlubar FF, Segerbäck D, Bartsch H (1994) DNA adducts: identification and biological significance. *IARC Sci Publ* 125: 1-478
  42. Benamira M, Johnson K, Chaudhary A, Bruner K, Tibbetts C, Marnett LJ (1995) Induction of mutations by replication of malondialdehyde-modified M13 DNA in *Escherichia coli*: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced. *Carcinogenesis* 16: 93-99
  43. Bartsch H, Nair J, Owen RW (2002) Exocyclic DNA adducts as oxidative stress markers in colon carcinogenesis: potential role of lipid peroxidation, dietary fat and antioxidants. *Biol Chem* 383: 915-921
  44. Esterbauer H, Eckl P, Ortner A (1990) Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res* 238: 223-233
  45. Eckl P, Esterbauer H (1989) Genotoxic effects of 4-hydroxynonenals. *Adv Biosci* 76: 141-157
  46. Brigelius-Flohé R (1999) Tissue specific function of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27: 951-965
  47. Flohé L (1997) Selen im peroxidstoffwechsel. *Med Klin* 92, suppl. III: 5-7
  48. Maiorino M, Aumann KD, Brigelius-Flohé R, Doria D, van den Heuvel J, McCarthy J, Roveri A, Ursini F, Flohé L (1995) Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol Chem Hoppe Seyler* 376: 651-660
  49. Ketterer B, Meyer DJ (1989) Glutathione transferases: a possible role in the detoxication and repair of DNA and lipid hydroperoxides. *Mutat Res* 214: 33-40.
  50. Sata F, Yamada H, Kondo T, Gong Y, Tozaki S, Kobashi G, Kato EH, Fujimoto S, Kishi R (2003) Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 9: 165-169
  51. Boon PJ, Marinho HS, Oosting R, Mulder GJ (1999) Glutathione conjugation of 4-hydroxy-trans-2,3-nonenal in the rat *in vivo*, the isolated perfused liver and erythrocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 159:214-223
  52. Laurent A, Perdu-Durand E, Alary J, Debrauwer L, Cravedi JP (2000) Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic product of lipid peroxidation, in rat precision-cut liver slices. *Toxicol Lett* 114: 203-214

## The present-day look at lipid peroxidation

Wojciech Łuczaj, Elżbieta Skrzydlewska 

Department of Analytical Chemistry, Medical Academy of Białystok, 15-230 Białystok 8, P.O. Box 14, Poland

e-mail: skrzydle@amb.edu.pl

**Key words:** nonenzymatic lipid peroxidation, enzymatic lipid peroxidation, lipoxygenases, phospholipase A<sub>2</sub>, glutathione peroxidases

### ABSTRACT

Lipid peroxidation occurs in physiological conditions and it consists in oxidation of polyunsaturated fatty acids, which are basic biological membrane components. There are two pathway of lipid peroxidation: nonenzymatic and enzymatic. Both of the processes result in generation of various reactive products. Nonenzymatic lipid peroxidation consists in free radical oxidation of polyunsaturated fatty acids while in enzymatic lipid peroxidation the generation of lipid hydroxyperoxides is achieved by insertion of an oxygen molecule at the active centre of lipoxygenase. In this manuscript mechanisms of two processes are described in details. We concentrate on final products of oxidation fatty acids: isoprostanes and neuroprostanes which are regarded as the most important biomarkers of lipid peroxidation as well as on the role of enzymes participating in enzymatic lipid peroxidation process. Moreover we discuss catalytic activity of glutathione peroxidases and transferases – enzymes preventing results of oxidation polyunsaturated fatty acids.

Tomasz Popławski

Janusz Błasiak

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: januszb@biol.uni.lodz.pl, tel./faks: (042) 635 44 84

Artykuł otrzymano 20 lipca 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 14 września 2005 r.

**Słowa kluczowe:** rekombinacja homologiczna, pęknięcia dwuniciowe DNA, naprawa DNA, uszkodzenia DNA, wymiana nici, konwersja genu, Rad51, MRN, Rad52

**Wykaz skrótów:** BIR (ang. *break induced repair*) – naprawa indukowana pęknięciem nici DNA, BLM (ang. *Bloom syndrome protein*) – białko związane z występowaniem zespołu Bloom; BRCA1 (ang. *breast cancer associated protein 1*) – produkt genu podatności na raka piersi; DNA-PK (ang. *DNA-dependent protein kinase*) – kinaza białkowa zależna od DNA; HJ (ang. *Holliday junction*) – struktura Hollidaya; HRR (ang. *homologous recombination repair*) – system naprawy przez rekombinację homologiczną; IR – promieniowanie jonizujące; Ku70, Ku80 – podjednostki autoantygenu Ku; MRE11 (ang. *meiotic recombination*) – białko człowieka uczestniczące w rekombinacji mejotycznej; MRN – kompleks białkowy MRE11/RAD50/NBS1; NBS1 (ang. *Nijmegen breakage syndrome*) – białko związane z występowaniem zespołu Nijmegen; NHEJ (ang. *nonhomologous end-joining*) – system naprawy przez niehomologiczne łączenie końców DNA; PARP (ang. *poly[ADP-ribose] polymerase*) – polimeraza poli(ADP-rybozy); RPA – białko replikacyjne A; Rad51, Rad52, Rad54 – białka uczestniczące w naprawie DNA przez rekombinację homologiczną; SSA (ang. *single strand annealing*) – naprawa przez dopasowywanie pojedynczych nici; XRCC1, XRCC2, XRCC3, XRCC4 (ang. *X-ray cross complementation*) – białka grup komplementacyjnych naprawy uszkodzeń indukowanych promieniowaniem jonizującym

## STRESZCZENIE

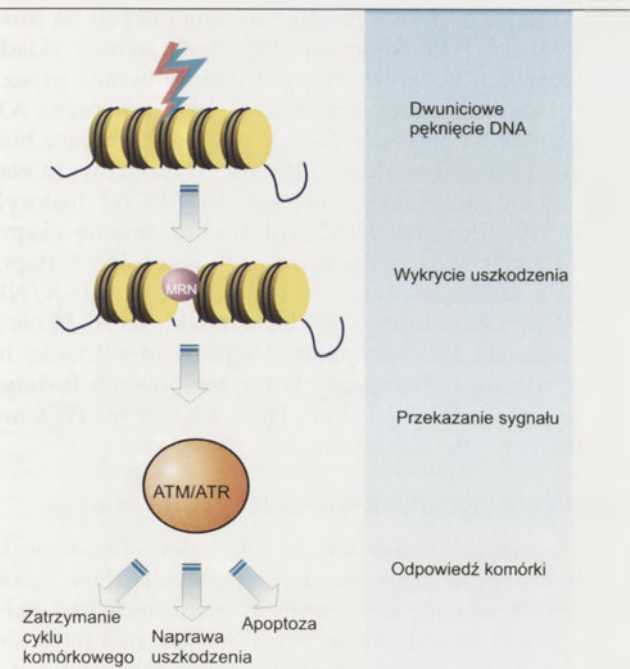
Pęknięcia dwuniciowe DNA (DSB) są uszkodzeniami szczególnie niebezpiecznymi dla komórki. Ze względu na mnogość egzo- i endogennych czynników powodujących powstawanie DSB efektywność ich naprawy ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórki i zapobiega fragmentacji DNA, translokacji chromosomów i ich delecji. W komórkach ssaków pęknięcia dwuniciowe naprawiane są z udziałem trzech systemów naprawy: przez niehomologiczne łączenie końców (NHEJ), rekombinację homologiczną (HRR) i wydłużanie pojedynczych nici (SSA). W HRR pierwotna informacja genetyczna ulega odтворzeniu na matrycy nieuszkodzonego homologicznego DNA. Pierwsza faza HRR jest inicjowana przez kompleks białkowy MRN, aktywujący białko ATM oddziałujące z białkami HRR. Główne białka HRR u ssaków to kompleksy MRN, RPA, Rad51 i jego paralogi Rad51, Rad52, Rad54.

## WPROWADZENIE

Pęknięcia dwuniciowe DNA (ang. *double strand breaks*, DSBs), przez które zazwyczaj rozumie się pęknięcia dwóch nici DNA położone naprzeciwko siebie lub przesunięte względem siebie na niewielką odległość, należą do najgroźniejszych uszkodzeń DNA i zachodzą w komórce człowieka z częstotliwością około 10 na dzień. Nienaprawione mogą powodować utratę integralności genomu poprzez fragmentację chromosomów, która może prowadzić do translokacji. Do czynników pochodzenia zewnętrznego powodujących DSBs zalicza się przede wszystkim promieniowanie jonizujące oraz niektóre związki chemiczne, w tym bleomycynę (BLM) i jej pochodne, metanosulfonian metylu (MMS) i neokarzinostatynę (NCS). Do czynników endogennych należą przede wszystkim wolnorodnikowe produkty metabolizmu komórki. Pęknięcia dwuniciowe DNA powstają także w wyniku zablokowania widełek replikacyjnych lub zatrzymania aktywności topoizomerazy klasy II (enzymów, które powodują zmianę stanu topologicznego DNA przez wprowadzenie pęknięcia dwuniciowego DNA, przemieszczenie DNA przez „bramkę” stworzoną przez pęknięcie oraz ligację) i procesów naprawy innych uszkodzeń DNA. Źródłem DSBs mogą być także zdarzenia zachodzące przy udziale nukleaz komórkowych podczas mejozy lub rekombinacji V(D)J w czasie dojrzewania limfocytów [1]. Nienaprawione pęknięcia dwuniciowe DNA powodują amplifikację lub utratę części materiału genetycznego komórki, co może prowadzić do transformacji nowotworowej, poprzez aktywację onkogenów, inaktywację genów supresorowych lub utratę heterozygotyczności [2]. Naprawa pęknięć dwuniciowych DNA jest procesem wieloetapowym zachodzącym przy udziale wielu białek i obejmującym wykrycie uszkodzenia, przekazanie o nim sygnału oraz zapoczątkowanie reakcji naprawczej (Ryc. 1, Tabela 1).

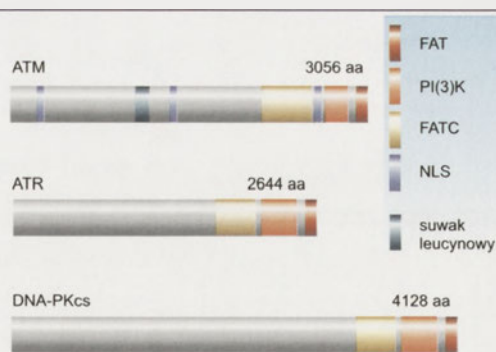
## ATM – KLUCZOWE BIAŁKO W ZAPOCZĄTKOWANIU NAPRAWY DWUNICIOWYCH PĘKNIĘĆ DNA

Głównym białkiem biorącym udział w przekazywaniu sygnałów w odpowiedzi na dwuniciowe pęknięcia DNA jest kinaza białkowa ATM, należąca do rodziny kinaz serynowo-treoninowych człowieka spokrewnionych z kinazami fosfatydylo-3-inozytoli (PIKK) [3]. Do tej samej rodziny należą białka ATR oraz podjednostka katalityczna kinazy białkowej zależnej od DNA, DNA-PKcs (Ryc. 2) [4]. DNA-PKcs bierze udział w naprawie pęknięć dwuniciowych przez niehomologiczne łączenie końców (NHEJ), natomiast ATR zapoczątkowuje reakcję komórki na uszkodzenia DNA spowodowane przez promieniowanie i zablokowane widełki replikacyjne. Ponadto ATR uczestniczy w przekazywaniu sygnałów generowanych przez ATM w odpowiedzi na DSB. Obie kinazy mają wiele wspólnych substratów, przy czym w początkowej fazie reakcji na uszkodzenie DNA są one fosforylowane przez kinazę ATM, a następnie podtrzymywane w stanie aktywnym przez białko ATR [5].



**Rycina 1.** Etapy odpowiedzi komórki na pęknięcia dwuniciowe DNA. Uszkodzenia DNA są wykrywane przez kompleks MRN, który przekazuje informację o uszkodzeniu DNA kinazie ATM oraz ATR. ATM aktywuje wiele szlaków, których końcowym etapem jest zatrzymanie cyklu komórkowego, naprawa DNA lub apoptoza.

W nieszkodzonych komórkach ATM występuje w jądrze w postaci homodimerów lub multimerów. Pęknięcie dwuniciowe DNA prowadzi do autofosforylacji i aktywacji ATM, które gromadzi się w miejscu wystąpienia DSB, wiążąc się z przylegającą do miejsca uszkodzenia chromatyną [6]. Substratami dla ATM są białka, które poprzez fosforylację mogą być aktywowane, zmieniać stabilność lub lokalizację wewnątrzkomórkową [7]. Jednym z pierwszych białek, które aktywuje ATM jest białko Nbs1 [8]. Białko to jest jednym ze składników kompleksu MRN złożonego z białek Mre11, Rad50 oraz NBS1 (Ryc. 3). Aktywne białko Nbs1 pośredniczy w aktywacji białek punktu kontrolnego fazy S i zatrzymaniu cyklu komórkowego. Ponadto Nbs1 bierze udział w szlaku prowadzącym do aktywacji białek Chk2, FANCD2 oraz SMC1 przez kinazę ATM. Również kolejne białko kompleksu MRN, Mre11, ulega aktywacji przez fosforylację



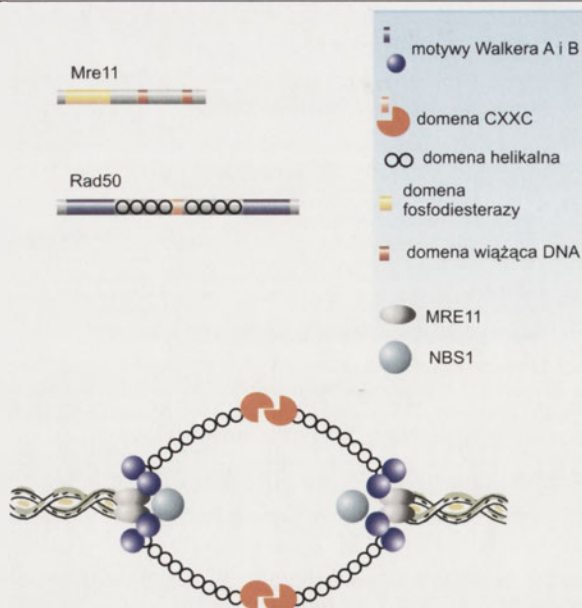
**Rycina 2.** Strukturalna organizacja białka ATM. ATM jest dużym białkiem, które należy do rodziny kinaz serynowo-treoninowych spokrewnionych z kinazami fosfatydylo-3-inozytolu. Dla porównania na rysunku zamieszczono dwóch innych przedstawicieli tej rodziny: kinazy ATR oraz DNA-PK.

przez ATM w odpowiedzi na dwuniciowe pęknięcia DNA. Do tej pory nie zidentyfikowano miejsca fosforylacji białka Mre11 przez białko ATM. Fosforylacja MRN wskazuje, że rola tego kompleksu białkowego w odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA polega na przekazywaniu sygnału zainicjowanego przez białko ATM [8]. Niedawno odkryto, że kompleks MRN jest odpowiedzialny za wykrycie pęknięcia DNA i zapoczątkowanie procesu jego naprawy przez aktywację szlaków zależnych od ATM [9, 10]. Komórki bez MRN wykazują szereg właściwości charakterystycznych dla komórek z nieprawidłowym białkiem ATM: nadwrażliwość na czynniki uszkadzające DNA oraz brak zahamowania cyklu komórkowego w odpowiedzi na DSBs DNA [11]. Wyniki tych obserwacji sugerują, że prawidłowa rola ATM w komórce, jako białka sygnalizującego dwuniciowe pęknięcie DNA i warunkującego jego usunięcie, zależy od kompleksu MRN. Powstanie skupisk MRN, niezależnych od białka ATM, w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące zaobserwowano już po 10 min od ekspozycji [12]. Lokalizacja tego kompleksu w miejscach uszkodzenia DNA jest niezależna od białka ATM. W komórkach pozbawionych białek Nbs1 lub Mre11 zaobserwowano wolniejszą kinetykę autofosforylacji ATM w porównaniu do komórek ze wszystkimi składnikami kompleksu MRN. Również fosforylacja Nbs1 przez ATM ma miejsce w pobliżu końców uszkodzonego DNA, co wskazuje na wspólną lokalizację tych białek [10]. Można zatem przypuszczać, że (i) kompleks MRN wiąże się z DNA w miejscu pęknięcia obu nici, (ii) białko Mre11 przekształca koniec DNA formując jednoniciowe zakończenie

Tabela 1. Białka drożdży i człowieka uczestniczące w naprawie pęknięć dwuniciowych DNA.

Klasa funkcjonalna białek	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Homo sapiens</i>
Detektory uszkodzenia DNA	Mre11/Rad50/Xrs2 Rfa1/Rfa2/Rfa3 Rad24/Rfc2-5	Mre11/Rad50/Nbs1 Rpa1/Rpa2/Rpa3 Rad17/Rfc2-5
Białka punktów kontrolnych cyklu komórkowego	Ddc1/Mec3/Rad17 Mec1/Ddc2 Tel1	Rad9/Hus1/Rad1 ATR/ATRIP* ATM
Przebieźniki sygnału	Mrc1, Rad9	BRCA1, MDC1, 53BP1
Kinazy efektorowe	Rad53, Chk1	Chk1, Chk2
Białka HRR	Rad52, Rad51, Rad55/Rad57, Rad54, Rad59, Rdh54	Rad52, Rad51, Rad51B, Rad51C, Rad51D, Xrcc2, Xrcc3, Rad54, Rad52B, Rad54B
Białka NHEJ	Yku70/Yku80, Dnl4/Lif1	Ku70/Ku80, Lig4/Xrcc4, DNA-PKcs, Artemis

\*ATRIP (ang. *ATR-interacting protein*) – białko oddziałujące z białkiem ATR



Rycina 3. Schematyczne przedstawienie kompleksu MRN człowieka związanego z końcami DNA. Kompleks MRN wiąże się z DNA poprzez białko Mre11. Końce DNA są utrzymywane w bliskiej odległości od siebie poprzez połączenie dwóch monomerów białka Rad50.

3', (iii) ATM łączy się z kompleksem MRN i ulega aktywacji poprzez autofosforylację i monomeryzację, (iv) ATM fosforyluje substraty w miejscu uszkodzenia DNA.

Również inne białka mogą brać udział w aktywacji ATM po wystąpieniu pęknięć dwuniciowych DNA. Zaobserwowano, że białko MDC1 jest niezbędne do zależnej od MRN aktywacji ATM po działaniu promieniowania jonizującego. Inna sytuacja ma miejsce w przypadku niskich dawek promieniowania, gdzie partnerem dla kompleksu MRN w procesie aktywacji ATM jest białko wiążące p53, 53BP1 [13]. Aktywne białko ATM stymuluje inne białka, w tym H2AX, będący wariantem histonu H2A [14]. Proces ten prowadzi do wytworzenia skupisk (*foci*) białek, które biorą udział w naprawie bądź przekazywaniu sygnału w komórce o uszkodzeniu DNA [15]. W odcinkach chromatyny zawierającej  $\gamma$ -H2AX obserwuje się skupiska białek: 53BP1, NBS1, BRCA1 oraz MDC1 [14].

Sygnał o uszkodzeniu DNA zapoczątkowany przez ATM jest przekazywany dalej przy udziale innych białek, w tym BRCA1, niezbędnego do fosforylacji SMC1 oraz Chk1 przez ATM [16]. BRCA1 jest również składnikiem kompleksu naprawczego BASC (ang. *BRCA1-associated genome surveillance complex*), w skład którego wchodzi: ATM; składniki systemu naprawy niesparowanych zasad MSH2, MSH6, MLH1; białko związane z zespołem Blooma BLM; kompleks MRN i czynnik replikacyjny C (RFC). Rola BASC w odpowiedzi komórki na pęknięcia dwuniciowe nie została jeszcze do końca poznana [17].

W konsekwencji stymulacji ATM przez pęknięcia dwuniciowe DNA następuje aktywacja punktów kontrolnych fazy S i G2/M. Zatrzymanie cyklu komórkowego daje komórce dodatkowy czas na naprawę uszkodzeń DNA. Proces naprawy podlega również regulacji przez kinazę ATM. Fosforylacja BRCA1 przez Chk2 powoduje akty-

wację szlaku naprawy pęknięć dwuniciowych na drodze rekombinacji homologicznej [18]. Podstawowy składnik tego systemu, białko Rad51, jest fosforylowane przez kinazę c-Abl, która wcześniej ulega aktywacji przez ATM. Substratem dla aktywnej kinazy c-Abl jest również białko BRCA1, które oddziałuje z BRCA2. W końcowym etapie tego szlaku przekazywania sygnału BRCA2 fosforyluje Rad51 [19]. Ponadto ATM wpływa na zmianę ekspresji genów związanych z naprawą uszkodzeń DNA poprzez regulację szlaku zależnego od białek c-jun oraz IKK/NF $\kappa$ B [20]. Dość zaskakującym wydaje się fakt, że ATM nie jest niezbędne do życia komórki. Najprawdopodobniej inne białka należące do rodziny kinaz białkowych fosfotydylo-3-inozytolu, takie jak ATR, DNA-PK czy też ATX mogą przejmować rolę ATM.

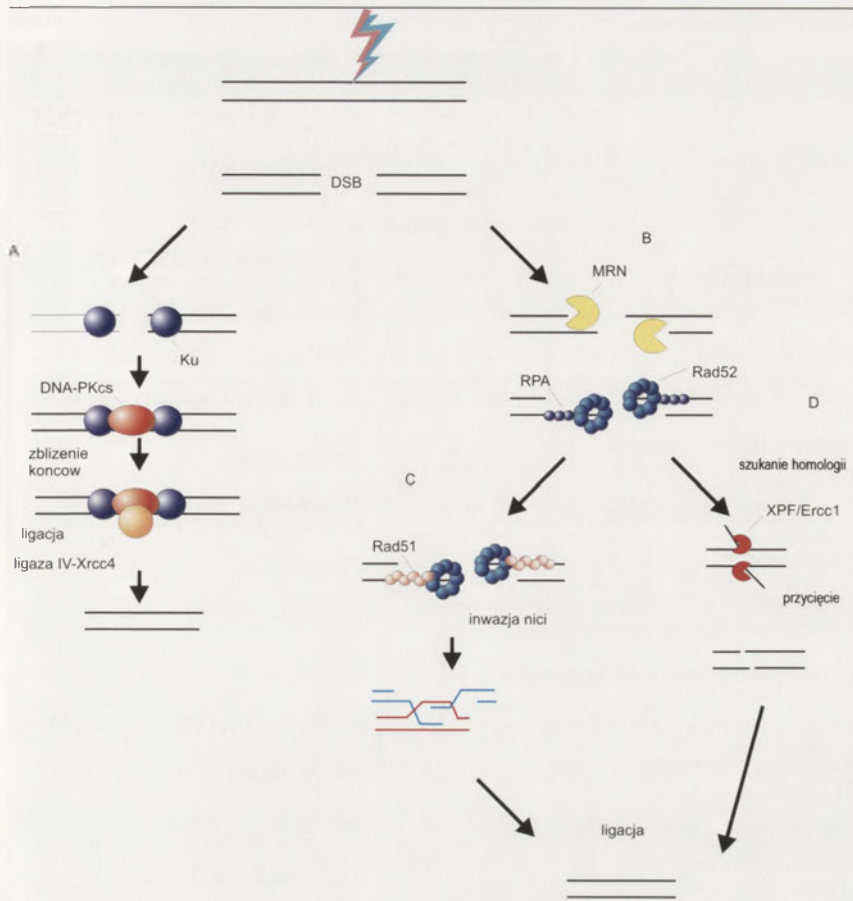
## NAPRAWA PĘKNIĘĆ DWUNICIOWYCH DNA

W komórkach eukariotycznych zidentyfikowano trzy systemy naprawy pęknięć dwuniciowych DNA: łączenie niehomologicznych końców (ang. *non-homologous end-joining*, NHEJ), dopasowanie pojedynczych nici (ang. *single strand annealing*, SSA) i naprawę przez rekombinację homologiczną (ang. *homologous recombination repair*, HRR) (Ryc. 4). W procesach NHEJ i SSA uszkodzone końce DNA są łączone po uprzedniej modyfikacji, która może prowadzić do zmiany, w tym utraty, informacji genetycznej, podczas gdy rekombinacja homologiczna odtwarza pierwotną strukturę DNA [1]. W komórkach ssaków DSBs są naprawiana głównie przez NHEJ, podczas gdy u drożdży głównym systemem naprawy pęknięć dwuniciowych jest HRR (Ryc. 5) [21].

## NAPRAWA DNA PRZEZ ŁĄCZENIE NIEHOMOLOGICZNYCH KOŃCÓW

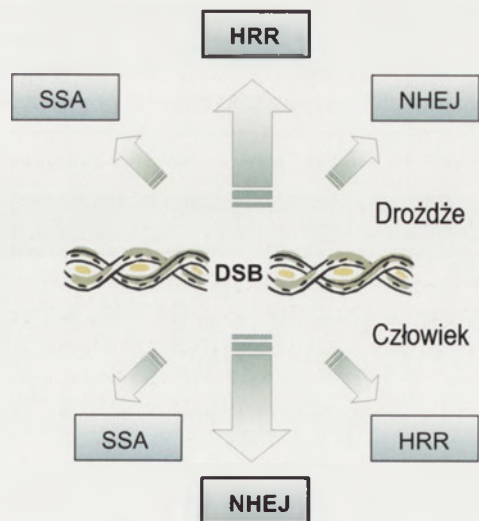
W procesie naprawy pęknięć dwuniciowych DNA przez łączenie niehomologicznych końców, zakończenia uszkodzonych fragmentów DNA są zbliżane do siebie, modyfikowane w celu umożliwienia ich połączenia i następnie łączone poprzez ligację. W komórkach eukariotycznych proces łączenia odpowiednich końców DNA (w przypadku wystąpienia wielu dwuniciowych pęknięć DNA) jest ułatwiony dzięki strukturze chromatyny, która tworząc zakotwiczone w macierzy jądrowej pętle DNA ułatwia zbliżenia właściwych końców DNA (lub też uniemożliwia oddalenie końców uszkodzonych od siebie) [22]. Pierwszym etapem NHEJ jest związanie białek Ku z końcami DNA i zabezpieczenie DNA przed degradacją przez egzonukleazy. W kolejnym etapie do białek Ku dołącza się podjednostka katalityczna kinazy białkowej zależnej od DNA (DNA-PKcs), która służy jako molekularny most zbliżając do siebie dwa końce DNA. Jeżeli końce mogą podlegać ligacji, ostatnim etapem naprawy DSBs przez NHEJ jest ich połączenie przez kompleks XRCC4/ligaza DNA IV, w przeciwnym razie końce DNA ulegają przekształceniom. Analiza sekwencji DNA w miejscach uszkodzenia naprawionych przez białka systemu NHEJ wykazała, że w większości przypadków dopasowywane są do siebie fragmenty DNA o długości kilku nukleotydów na zasadzie mikrohomologii pomiędzy łączonymi odcinkami DNA. Konsekwencją naprawy NHEJ opartej na mikrohomologii są zmiany w pierwotnej informacji genetycznej [21].





**Rycina 4.** Naprawa pęknięć dwuniciowych przez łączenie niehomologicznych końców (NHEJ) (a), rekombinację homologiczną (HRR) (c), i dopasowanie pojedynczych nici (SSA) (d). Po lokalizacji pęknięcia DNA komórka wybiera szlak naprawy. Końcowy etap NHEJ to połączenie końców DNA przez kompleks Ligaza4/Xrcc4. Jeżeli końce nie mogą ulec bezpośredniej ligacji są najpierw modyfikowane z udziałem białek Ku, DNA-PKcs oraz Artemis. W przypadku wyboru naprawy rekombinacyjnej końce są przycinane przez kompleks MRN, który odsłania jednoniciowe zakończenie 3'. Następnie końce są zabezpieczone przed atakiem nukleaz przez połączenie z białkiem RPA oraz Rad52. Jeżeli w pobliżu miejsca uszkodzenia znajdują się sekwencje powtórzone następuje naprawa przez SSA, w efekcie której fragment znajdujący się między sekwencjami powtórzonymi jest tracony. W przypadku braku sekwencji powtórzonych w miejscu pęknięcia odbywa się naprawa z udziałem białek HRR. Do końca 3' przyłącza się białko Rad51, następuje inwazja nici na homologiczny fragment DNA z wytworzeniem pętli D. Druga nić z uszkodzonego fragmentu DNA może również dokonać inwazji z wytworzeniem dwóch struktur Hollidaya (HJ). Struktury HJ przesuwają się wzdłuż nici i następnie są rozcinane. W efekcie naprawy HRR następuje odtworzenie uszkodzonej informacji genetycznej na matrycy homologicznego fragmentu DNA.

Naprawa pęknięć dwuniciowych DNA przez dopasowanie pojedynczych nici jest często traktowana jako szczególny przypadek HRR. Podstawowe składniki tego szlaku naprawy to białka: Rad50, Mre11 i Nbs1. hRad50 jest białkiem, które ma zdolność do wiązania się z DNA. hRad50 i Mre11 są składnikami kompleksu białkowego, który formuje się w miejscu wystąpienia uszkodzenia DNA. Warunkiem koniecznym dla powstania tego kompleksu jest fosforylacja obu białek, która zachodzi przy udziale Nbs1. Białko to również potęguje właściwości nukleolityczne powstałego kompleksu MRN, który dzięki temu może rozciąć struktury szpilki do włosów w DNA. Ponadto Nbs1, poprzez oddziaływanie z histonem  $\gamma$ -H2AX, utrzymuje kompleks naprawczy w miejscu uszkodzenia [14]. Mre11 jest egzonukleazą 3'-5', która usuwa uszkodzone zakończenia DNA, generując jednoniciowe końce DNA, które są następnie dopasowywane do siebie na zasadzie homologii [11]. Obszar homologii może mieć wielkość od kilkunastu do kilkuset nukleotydów, a proces dopasowywania nici jest przeprowadzany przez Rad52 oraz białko RPA (ang. *replication protein A*). Rad52 wiąże się z końcem 3' jednoniciowego DNA chroniąc tym samym zakończenie nici przed atakiem egzonukleaz. Białko RPA przyłącza się do jednoniciowego DNA od końca 3'. Jego rola polega na usunięciu struktur drugorzędowych, które mogłyby stanowić zawadę przestrzenną w procesie łączenia dwóch nici DNA. Kolejnym etapem jest odcięcie wystających poza obszar homologii fragmentów jednoniciowych. Proces ten jest przeprowadzany przez kompleks XPF/Erc1 [23]. U drożdży *S. cerevisiae* do wydajnego przycięcia fragmentów niehomologicznych niezbędny jest heterodimer Msh2/Msh3, składający się z białek systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (MMR), odpowiedzialnych za usuwanie krótkich wypętleń nici (do 12 nukleotydów) [24]. Prawdopodobnie rola heterodimeru Msh2/Msh3 w naprawie pęknięć dwuniciowych poprzez SSA u drożdży polega na stabilizacji wystających niehomologicznych fragmentów DNA, przez co mogą być one odcinane przez odpowiednik kompleksu XPF/Erc1 człowieka, składającego się z Rad1 i Rad10, występujący w drożdżach. Do tej pory brak jest doniesień, które wskazywałyby na podobną rolę homologów białek Msh2/Msh3 drożdży, występujących u człowieka w procesie dopasowania pojedynczych nici. Rola tego heterodimeru nie ogranicza się tylko do udziału w procesie przycinania niehomologicznych końców. Jeżeli dopasowywane do siebie sekwencje homologiczne różnią



**Rycina 5.** Szlaki naprawy pęknięć dwuniciowych DNA u ssaków oraz drożdży. Grubszymi strzałkami zaznaczono dominujące systemy naprawy pęknięć dwuniciowych DNA.

Tabela 2. Białka człowieka biorące udział w naprawie DNA przez rekombinację homologiczną.

Białko	Właściwości i funkcje	Oddziaływanie z innymi białkami
Rad50	wiąże się z DNA, zwiększa aktywność Mre11	Mre11, Nbs1, BRCA1, BLM, PCNA
Mre11	egzonukleaza 3'-5', endonukleaza ssDNA, otwiera struktury szpilki do włosów, wiąże się z DNA	Mlh1, Ku70, BLM
Nbs1	stabilizuje i zwiększa aktywność MRN, odpowiada za wiązanie MRN do miejsca uszkodzenia	Sp100, Trf1, Trf2, E2f1
Rad51	wiąże się z DNA, przeprowadza wymianę nici oraz łączenie homologicznych nici w sposób zależny od ATP	Rad51C, Rad52, Rad54, WRN, XRCC3, c-Abl, p53, BRCA1, BRCA2, Ubl1, Pir51, Rpb1
Rad51B	kinaza białkowa, wiąże się z DNA, ATPaza zależna od DNA	Rad51C
Rad51C	wiąże się z DNA, ATPaza zależna od DNA, bierze udział w wymianie nici oraz łączeniu homologicznych nici razem z Xrcc3	Rad51, Rad51B, Rad51D, Xrcc3
Rad51D	wiąże się z DNA, ATPaza zależna od DNA, bierze udział w wymianie nici oraz łączeniu homologicznych nici razem z Xrcc2	Rad51C, Xrcc2
Rad52	wiąże się z DNA, uczestniczy w wymianie nici oraz łączeniu homologicznych nici DNA.	RPA, Rad51, Rad52, Ubl1, Xpb, Xpd, c-Abl, Rad52, Ube2I/Ubc9
Rad54	wiąże się z DNA, ATPaza zależna od DNA, rozwija helise DNA, modyfikuje strukturę nukleosomów	Rad51, Mus81
Xrcc2	wiąże się z DNA, bierze udział w łączeniu homologicznych nici w parze z Rad51D	Rad51D
Xrcc3	wiąże się z DNA, bierze udział w łączeniu homologicznych nici w parze z Rad51C	Rad51C
BRCA1	koordynuje działania MRN, reguluje naprawę przez rekombinację homologiczną	Rad50, Rad51, ATM, BRCA2, p53
BRCA2	reguluje naprawę przez rekombinację homologiczną, uczestniczy w procesie naprawy poprzez kontakt z Rad51	BRCA1, Rad51
RuvBL1	helikaza zależna od DNA, bierze udział w przemieszczaniu struktury Hollidaya	RPA
RPA	bierze udział w formowaniu kompleksu naprawczego, usuwa struktury drugorzędowe na jednoniciowym DNA	Rad51, Rad52, p53, PCNA

się kilkoma nukleotydami, powstają niesparowania oraz wypętlenia, które następnie są usuwane przez system MMR [25]. Końcowym etapem SSA jest ligacja końców, jednakże u człowieka nie zidentyfikowano dotychczas enzymu przeprowadzającego ten etap.

SSA u ssaków zachodzi z dużą częstością przy naprawie DSBs we fragmentach genomu zawierających sekwencje powtórzone. Ich obecność umożliwia bowiem dopasowanie homologicznych pojedynczych nici DNA do siebie. SSA charakteryzuje się niską dokładnością, ponieważ fragment DNA znajdujący się pomiędzy miejscem uszkodzenia a sekwencjami homologicznymi jest tracony [26].

#### NAPRAWA DNA PRZEZ REKOMBINACJĘ HOMOLOGICZNĄ W KOMÓRKACH SSAKÓW

Białka uczestniczące w naprawie DNA człowieka przez rekombinację homologiczną wymienione są w tabeli 2. W inicjacji naprawy bierze udział kompleks MRN, który usuwając jedną nić DNA wytwarza jednoniciowy DNA, który dokonuje inwazji homologicznego fragmentu DNA [27]. Podstawowym białkiem uczestniczącym w tym procesie jest Rad51, będące eukariotycznym homologiem białka RecA *E. coli*. Rad51, podobnie jak RecA, formuje wraz z jednoniciowym DNA nukleofilamenty, poszukuje homologii i tworzy kompleks trójniciowy, w którym łańcuch dokonujący inwazji jest umieszczony w większym rowku DNA nieuszkodzonej helisy DNA. Mutacje w genie kodującym Rad51 są śmiertelne, w przeciwieństwie do genu kodującego Rad52. Podobny efekt na przeżywalność komórki, jak w przypadku mutacji genu kodującego Rad51,

zaobserwowano dla genów kodujących inne białka systemu HRR: Rad51B, Rad51D, Rad50, Mre11 oraz Nbs1 [28,29]. Obserwacje te wskazują, że sprawny system rekombinacji homologicznej, w przeciwieństwie do SSA, jest niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania komórki.

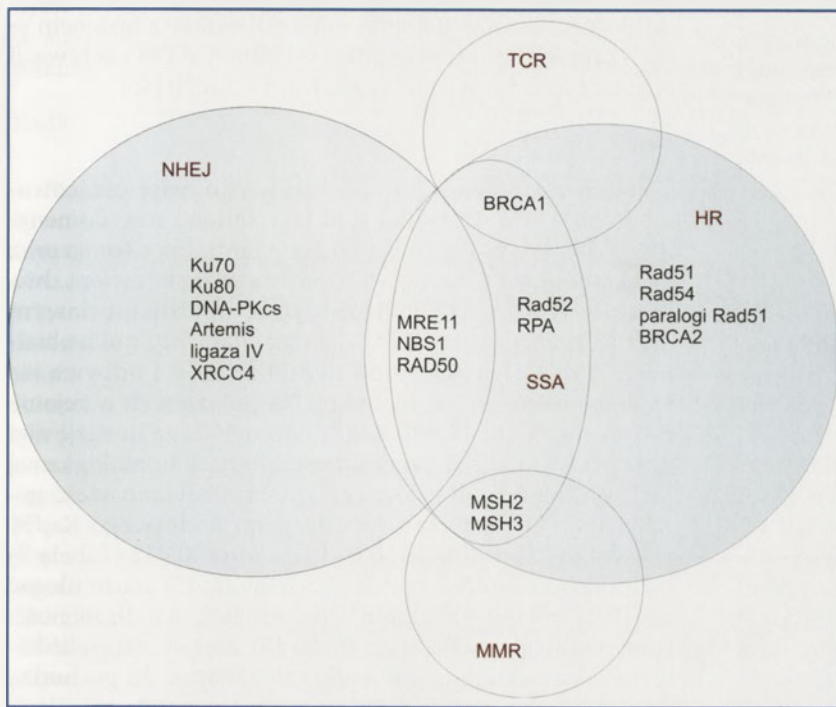
W naprawie pęknięć dwuniciowych DNA przez rekombinację homologiczną jednoniciowy DNA dokonuje, promowanej przez Rad51, inwazji na homologiczny fragment DNA. W procesie rekombinacji jako homolog wybierane są najczęściej siostrzane chromatydy, a nie homologiczne chromosomy. Wynika to prawdopodobnie z faktu bezpośredniej bliskości uszkodzonej nici i siostrzanej chromatydy [30]. Ponadto naprawa pęknięć dwuniciowych na macierzy DNA chromosomu homologicznego może powodować utratę heterozygotyczności poprzez delecję jednego z

Tabela 3. Rodzina białek Rad51 występująca u drożdży oraz człowieka.

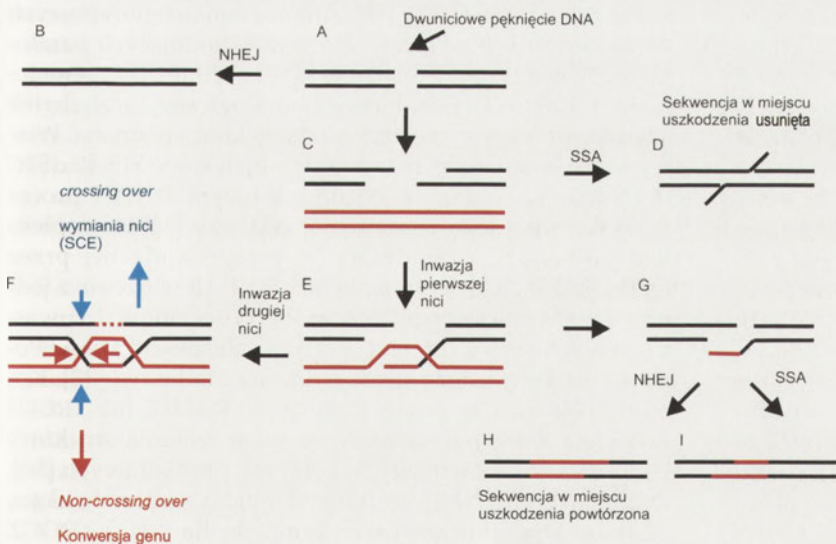
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Homo sapiens</i>
Ortologi	Rad51	Rhp51	Rad51
Paralogi	Rad55	Rhp55	Rad51B
	Rad57	Rhp57	Rad51C
	DMC1	Rlp1	Rad51D
		Dmc1	XRCC2
			XRCC3
			DMC1

dwóch alleli tego samego genu prowadzącą do jego homozygotyczności. Proces ten może prowadzić do inaktywacji genów supresorowych transformacji nowotworowej [31]. Warunkiem niezbędnym do wytworzenia trójniciowego kompleksu synaptycznego jest aby od jednoniciowego zakończenia uszkodzonego DNA zostało odłączone RPA,

którego rola jest analogiczna do tej, jaką to białko spełnia w procesie SSA, a w jego miejsce przyłączone Rad51. Proces ten jest przeprowadzany przez kompleks białkowy złożony z paralogów Rad51: Rad51B, Rad51C, Rad51D i XRCC2 (Tabela 3) [32]. Dzięki nim następuje przełamanie bariery energetycznej związanej z wyższym powinowactwem RPA niż Rad51 do jednoniciowego DNA. Oprócz tego kompleks zbudowany z paralogów białka Rad51 umożliwia wiązanie białka Rad51 z DNA w miejscach zawierających lukę w jednej nici DNA [33]. Ponieważ takie miejsca powstają w wyniku naprawy uszkodzeń DNA przez wycinanie nukleotydów (NER), wydaje się prawdopodobne, że naprawa uszkodzeń wywołanych na przykład przez związki sieciujące może odbywać się na drodze rekombinacji homologicznej [33]. Hipotezę tę wydają się potwierdzać ostatnie doniesienia o stymulacji rekombinacji homologicznej przez związek sieciujący DNA – cisplatynę [34]. Innym białkiem biorącym udział w procesie wiązania Rad51 z jednoniciowym fragmentem DNA jest BRCA2, którego aktywność jest regulowana przez białka anemii Falconiego [35].



Rycina 6. Współdziałanie białek należących do różnych systemów naprawy DNA w usuwaniu pęknięć dwuniciowych DNA.



Rycina 7. Naprawa rekombinacyjna pęknięć dwuniciowych (a). (b) NHEJ jest szybkim systemem naprawy pęknięć dwuniciowych, który powoduje zmiany w sekwencji naprawianej. (c) Końce DNA mogą być nacinane przez egzonukleazę z wytworzeniem jednoniciowego zakończenia 3'. (d) Jeżeli w pobliżu miejsca uszkodzenia znajdują się sekwencje powtórzone to służą jako sekwencje homologiczne w naprawie SSA. W takim przypadku fragment pomiędzy sekwencjami powtorzonymi jest tracony. (e) Inwazja na homologiczny fragment DNA z wytworzeniem pętli D. (f) wydłużanie pojedynczej nici może prowadzić do inwazji drugiej nici i powstania dwóch struktur Hollidaya (HJ). (g) Kolejnym etapem jest przecięcie nici DNA w obrębie struktury Hollidaya prowadzące do wymiany nici (kolor niebieski) bądź konwersji genu (kolor czerwony). (h) wydłużanie pojedynczej nici może powodować rozpad struktury HJ. Jeżeli w obrębie zsyntetyzowanej nici znajdują się sekwencje powtórzone zachodzi połączenie końców przez SSA (i), w innym przypadku uwolnione końce są łączone przez NHEJ (h). W wyniku tych zdarzeń dochodzi do duplikacji (h) bądź utraty informacji genetycznej (i).

Inwazja nici na homologiczny fragment DNA przeprowadzana przez Rad51 jest połączona przez Rad54, należące do rodziny białek Swi2/Snf2, które mają zdolność przebudowy chromatyny [36]. Rad54 zmienia właściwości topologiczne DNA przez wprowadzenie superskrętów, a aktywność zarówno Rad54 jak i Rad51 jest regulowana przez jony wapnia [37]. Kolejnym etapem HRR jest synteza DNA na matrycy nieuszkodzonej cząsteczki DNA przeprowadzana na końcu 3'. Struktura Hollidaya powstała w wyniku inwazji uszkodzonej nici, przesuwa się wzdłuż homologicznej cząsteczki DNA wraz z wydłużaniem jednoniciowego końca 3' uszkodzonego fragmentu DNA. Jeśli ruch struktury Hollidaya odbywa się w kierunku syntezy nowej nici, to po dościsnięciu polimerazy następuje uwolnienie jednoniciowego fragmentu DNA, który jest homologiczny do sekwencji na drugim końcu uszkodzonej cząsteczki DNA i może być naprawiany w procesie SSA. Końcowy produkt takiej naprawy, nie będzie pozbawiony części sekwencji, ponieważ jednoniciowy, nowosyntetyzowany odcinek DNA wykracza znacznie poza miejsce uszkodzenia. Tak przeprowadzona naprawa DSBs prowadzi do konwersji genu, która może powodować utratę heterozygotyczności i przyczyniać się do rozwoju transformacji nowotworowej. Analiza sekwencji nukleotydowej w miejscach naprawy pęknięć dwuniciowych wykazała obecność sekwencji tandemowo powtórzonych, które powstają, gdy wydłużony koniec 3' DNA jest naprawiany z udziałem białek systemu NHEJ [38]. Jest to kolejny przykład współdziałania systemów naprawy uszkodzeń DNA (Ryc. 6).

W procesie alternatywnym do uwolnienia wydłużanej nici, dochodzi do inwazji drugiego końca na homologiczny odcinek DNA z wytworzeniem drugiej struktury Hollidaya. Powstający heterodupleks zawiera dwie struktury Hollidaya, które mogą być rozłączane z lub bez *crossing-over*. *Crossing-over* powoduje wymianę nici, podczas gdy naprawa bez niego prowadzi do konwersji genu (Ryc. 7). Ponieważ analiza produktów rekombinacji homologicznej w odpowiedzi na podwójne pęknięcia DNA nie wykazała zjawiska wymiany siostrzanych chromatyd, SCE, związanego z wymianą nici, można przypuszczać, że głównym sposobem rozłączania heterodupleksów DNA jest proces bez *crossing-over* [30].

## BIĄŁKA REKOMBINACJI HOMOLOGICZNEJ

Mre11, Rad50, Nbs1

Białka Mre11, Rad50, Nbs1 wchodzące w skład kompleksu MRN są zbudowane odpowiednio z 708, 1312 i 754 aa, a ich masa wynosi 81, 153 i 95 kDa. Mre11 występuje w komórce w formie kompleksów multimerycznych i odpowiada za właściwości enzymatyczne kompleksu MRN. Mre11 jest egz nukleazą 3'-5' modyfikującą dwuniciowy DNA oraz endonukleazą jednoniciowego DNA [39]. Za właściwości enzymatyczne Mre11 odpowiedzialne są cztery motywy występujące w jego części N-końcowej oraz jony Mn<sup>2+</sup> [39]. Mre11 wykazuje większe powinowactwo do jedno- w porównaniu z dwuniciowym DNA [40]. W połączeniu z białkami Rad50 i Nbs1, Mre11 otwiera struktury szpilki do włosów i rozwija dwuniciową helisę DNA. Ponadto białko to pośredniczy w łączeniu dwóch komplementarnych, jednoniciowych nici DNA. Ta aktywność Mre11 zależy od obecności białka RPA [8].

Rad50 należy do rodziny białek biorących udział w utrzymaniu struktury chromosomu (ang. *structural maintenance of chromosome*, SMC) [41]. Ma ono dwa motywy Walkera: A i B, które biorą udział w przyłączaniu i hydrolizie ATP. Do tej pory nie została wyjaśniona rola ATP w aktywności białka Rad50. Wyniki badań z użyciem drożdży sugerują, że MRX, odpowiednik kompleksu białkowego MRN człowieka, po przyłączeniu cząsteczki ATP do występującego u człowieka homologu białka Rad50 drożdży, wykazuje dodatkowe właściwości odcinania jednoniciowych końców 3' DNA [42]. Białko Rad50 tworzy dimer poprzez motyw Cys-XX-Cys, gdzie jako łącznik pomiędzy dwoma cysteinami występuje cynk [43]. Z powstałym kompleksem białkowym złożonym z dwóch cząsteczek Rad50 wiąże się heterodimer Mre11 za pośrednictwem  $\alpha$ -helikalnych domen białka Rad50 otaczających motyw Cys-XX-Cys. Tak powstały kompleks złożony z dwóch cząsteczek Rad50 oraz dwóch cząsteczek Mre11 ma dwa miejsca aktywne odpowiedzialne za wiązanie oraz przekształcanie końców DNA, dzięki czemu może zbliżyć do siebie dwa uszkodzone końce DNA [43]. Analiza biochemiczna białka Nbs1 wykazała istnienie trzech domen odpowiedzialnych za funkcje tego białka: części N-końcowej (aa 1-196), centralnej (aa 278-343) oraz C-końcowej (aa 665-693). W części N-końcowej zidentyfikowano dwie domeny FHA oraz BRCT, które są odpowiedzialne za tworzenie skupisk zawierających białka naprawcze w miejscu uszkodzenia DNA oraz aktywację punktu kontrolnego fazy S [44]. Cen-

tralny region Nbs1 zawiera dwa miejsca fosforylacji przez kinazę ATM w odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA [45]. Domena C-końcowa białka NBS1 zapewnia kontakt z białkiem Mre11, jej inaktywacja prowadzi do nabycia przez komórkę nadwrażliwości na promieniowanie jonizujące oraz zaburza jądrową lokalizację kompleksu MRN [44]. Nbs1 pełni rolę białka regulatorowego w MRN, które decyduje o jego lokalizacji poprzez oddziaływanie z histonem  $\gamma$ -H2AX, przekazywaniu sygnału od kinazy ATM i aktywacji enzymatycznej heterodupleksu Mre11-Rad50 [46].

Rad51

Rad51 zbudowane jest z 339 aa a jego masę oszacowano na 36,9 kDa. W białku tym wyróżniono trzy domeny: długą domenę N-końcową, domenę centralną rdzenia oraz krótką domenę C-końcową. Domena rdzenia zwiera dwa motywy Walkera A i B. Rad51 wiąże się z dwuniciowym oraz jednoniciowym DNA, tworząc filamenty nukleobiałkowe. Proces ten zależy od hydrolizy ATP i odbywa się za pośrednictwem regionów białka położonych w rejonie N-końcowym (aa 19-83). Rad51 odpowiada za inwazję nici oraz ich wymianę w procesie rekombinacji homologicznej [47]. W komórkach człowieka zidentyfikowano sześć genów, których podobieństwo do genu kodującego Rad51 pozwoliło zakwalifikować je do rodziny *Rad51* (Tabela 3) [47]. Ponadto mRNA białek z rodziny Rad51 może ulegać alternatywnemu składaniu, co zwiększa ich liczebność. Geny kodujące białka rodziny Rad51 zostały zakwalifikowane jako paralogi genu *Rad51*, co oznacza, że pochodzą od wspólnego przodka. Do tej pory nasza wiedza o roli i funkcji większości białek z rodziny Rad51 jest niepełna. Wyniki badań z użyciem techniki dwu- i trzyhybrydowej sugerują, że paralogi Rad51 człowieka oddziałują ze sobą tworząc heterodupleksy [48]. Analiza zmian fenotypowych spowodowanych wyłączeniem genów kodujących paralogi Rad51 wskazuje, że białka te są niezbędne do zapewnienia prawidłowej rekombinacji homologicznej, aczkolwiek ich rola w tym procesie nie została do końca poznana. Wiadomo, że kompleks składający się z białek Rad51B-Rad51C ma zdolności wiązania z jednoniciowym DNA i proces ten uaktywnia jego właściwości ATP-azy [49]. Kompleks Rad51B-Rad51C pośredniczy w przeprowadzanej przez białka Rad51/RPA wymianie nici. Rad51B wiąże się z jedno- oraz dwuniciowym DNA w obecności jonów dwuwartościowych i ma zdolności ATPazy zależnej od DNA. Ponadto białko to wiąże się ze strukturą Hollidaya [32]. Komórki pozbawione genów kodujących Rad51C lub XRCC3 wykazują zmniejszoną zdolność do rozcinania struktury Hollidaya w porównaniu do komórek prawidłowych [50]. Oprócz tego rozcięcie struktury Hollidaya przez helikazę BLM jest stymulowane przez kompleks Rad51D i XRCC2. Wyniki tych badań sugerują, że paralogi Rad51 biorą udział w końcowym etapie rekombinacji homologicznej – rozcinaniu struktury Hollidaya [51].

Rad51B, w przeciwieństwie do pozostałych paralogów Rad51, ma właściwości kinazy białkowej. Jego ekspresja jest indukowana w odpowiedzi komórki na promieniowanie jonizujące oraz UV i powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1. Substratami dla Rad51B są p53, cyklina E, kinaza cdk2 oraz białka histonowe [52]. Dane te wskazują,

że Rad51B może pełnić funkcje białka przekazującego sygnał o uszkodzeniu DNA.

Analiza *in silico* sekwencji aminokwasowej Rad51D wskazuje na obecność w tym białku domeny helisa-szpilka do włosów-helisa, HhH-GPD [53]. Motyw ten jest charakterystyczny dla rodziny białek związanych z naprawą uszkodzeń DNA przez wycinanie zasad (BER) [54]. Obserwacje te sugerują, że Rad51D może pełnić funkcje glikozylazy i  $\beta$ -liazy.

#### Rad52

Białko Rad52 jest zbudowane z 418 aa, a analiza sekwencji aminokwasowej Rad52 pochodzącego od człowieka oraz myszy wykazała 50% podobieństwo, przede wszystkim w obszarze N-końcowym (aa 1-212). Region ten odpowiada za wiązanie Rad52 z jedno- i dwuniciowym DNA. Wyniki badań z użyciem mikroskopii elektronowej sugerują, że Rad52 wiąże się z jednoniciowym DNA poprzez strukturę pierścienia o średnicy około 10 nm. Kompleksy Rad52 tworzą z jednoniciowym DNA struktury przypominające koraliki na sznurku, których „koralik” jest zbudowany z 9 albo 16 cząsteczek Rad52. W drugim przypadku tworzenie struktury pierścienia odbywa się przez połączenie 11 białek Rad52 poprzez fragmenty N-końcowe, które są odpowiedzialne również za łączenie dwóch homologicznych pojedynczych nici DNA oraz przyłączenie kolejnych monomerów Rad52. W obrębie białka Rad52 zidentyfikowano drugą domenę odpowiedzialną za łączenie kolejnych cząsteczek. Znajduje się ona w części C-końcowej i prawdopodobnie służy do budowy struktur innych niż pierścienie o średnicy 10 nm [55]. Ten region białka jest odpowiedzialny także za wytworzenie połączenia pomiędzy Rad51 a Rad52 [56]. Białko Rad52 uczestniczy w naprawie pęknięć dwuniciowych DNA w czasie transkrypcji, oddziałując z dwoma podjednostkami czynnika transkrypcyjnego TFIIH: Xpb oraz Xpd poprzez fragment C-końcowy, którego rola polega na zatrzymaniu transkrypcji i promowaniu naprawy DSBs przez HRR [57]. Hipotezę tą potwierdzają badania wskazujące na stymulację rekombinacji homologicznej przez transkrypcję w komórkach *S. cerevisiae* [58].

#### Rad54

Białko Rad54 o masie 83,4 kDa jest zbudowane z 747 aa. Zidentyfikowano w nim siedem motywów charakterystycznych dla białek o aktywności helikazy i ATPazy zależnej od DNA, należących do rodziny Swi2/Snf2. Do tej rodziny należą białka biorące udział w przebudowie chromatyny, segregacji chromosomów, regulacji transkrypcji, naprawy DNA oraz rekombinacji. Hydroliza ATP przez Rad54 jest konieczna dla procesu naprawy uszkodzeń DNA oraz rekombinacji. Rad54 uczestniczy w inwazji homologicznej nici z wytworzeniem struktury pętli D. Energia uzyskana z hydrolizy ATP jest potrzebna do przekształcenia struktury DNA poprzez wprowadzenie ujemnych oraz dodatnich superskręceń [59]. Wprowadzenie ujemnych superskręceń prowadzi do lokalnej denaturacji i wytworzenia otwartej struktury DNA. Proces ten jest stymulowany przez białko Rad51 oraz kompleks złożony z Rad51 i RPA oraz ssDNA [59]. Wyniki eksperymentów *in vitro* wskazują, że do inwa-

zji nici na homologiczny fragment DNA i wytworzenia pętli D konieczne jest współdziałanie pomiędzy białkami Rad51 i Rad54 [60]. Rad54 pełni dodatkową rolę w rekombinacji homologicznej: przesuwając nukleosomy wzdłuż DNA, dzięki czemu zapewnia miejsce dla działania białek systemu HRR [61]. Proces ten zależy od hydrolizy cząsteczki ATP i jest wzmacniany przez obecność filamentów Rad51 umieszczonych na jednoniciowym DNA.

#### REGULACJA HRR

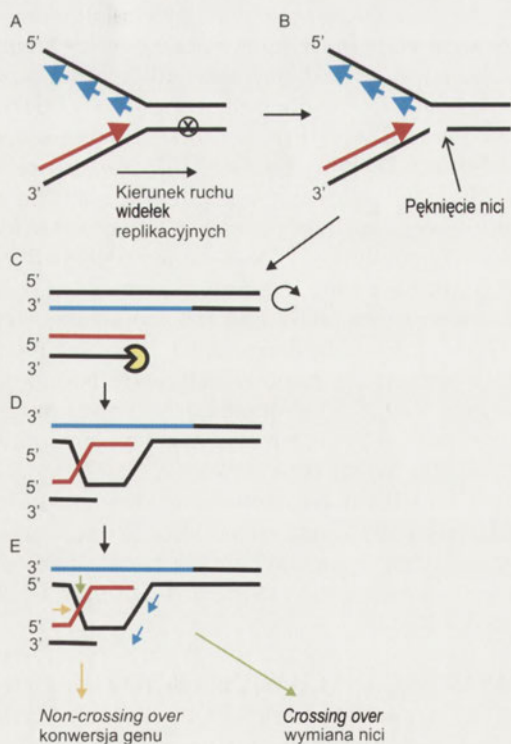
Rekombinacja homologiczna jest efektywnym i charakteryzującym się wysoką dokładnością systemem naprawy uszkodzeń DNA. Naprawa w szlaku HRR wymaga jednak znacznie więcej czasu niż w systemie NHEJ. Czy jest to jedyny powód, dla którego większość DSBs jest naprawiana przez NHEJ? Należy pamiętać, że HRR do naprawy potrzebuje nieuszkodzonego, homologicznego, dwuniciowego fragmentu DNA. Siostrzane chromatydy, które służą jako matryca do odtworzenia DNA są obecne w komórce w późnej fazie S oraz G2, zatem w fazie G0 oraz G1 cyklu komórkowego NHEJ będzie dominującym systemem naprawy. Hipotezę tą potwierdzają doniesienia wskazujące, że właściwości kinazy kluczowego białka NHEJ, DNA-PK, oraz zdolności do formowania skupisk naprawczych są większe w fazie G1 niż w pozostałych fazach cyklu komórkowego [62,63]. Ponadto naprawa pęknięć dwuniciowych przez HRR zachodzi z największą efektywnością w późnej fazie S [64]. Częstotliwość naprawy DSBs przez HRR była w tej fazie cyklu odpowiednio 39 oraz 24 razy większa niż w fazach M oraz G1/G0.

Kluczowym etapem, w którym komórka dokonuje wyboru szlaku naprawy jest etap modyfikacji końców nici w miejscu uszkodzenia. Wybór systemu naprawy DSB u drożdży pomiędzy HRR a NHEJ zależy od obecności w komórce kinazy zależnej od cykliny 1 (CDK1) [65]. Stężenie tej kinazy jest największe w fazie S oraz G2, zatem w tych etapach cyklu komórkowego do miejsca uszkodzenia będą docierać, za pośrednictwem kinazy CDK1, elementy białkowe systemu HRR. Zgodnie z inną hipotezą, o przewadze w komórkach ssaków systemu NHEJ nad HR (i pośrednio wyborze drogi naprawy) decyduje okres czasu, który jest niezbędny do inicjacji pierwszego etapu rekombinacji homologicznej, czyli nacięcia nici z wytworzeniem wolnych końców 3'. Długi okres potrzebny na ten etap czyni wolne końce DNA dostępnymi dla składników systemu NHEJ, które mogą ubiegać białka HRR w naprawie uszkodzenia. Hipotezę tę potwierdzają wyniki badań sugerujące, że o wyborze drogi naprawy decyduje współzawodnictwo pomiędzy dwoma kluczowymi elementami systemów NHEJ oraz HRR: białkami Ku oraz Rad51.

#### NAPRAWA ZŁAMANYCH WIDEŁEK REPLIKACYJNYCH

Wyniki badań z zastosowaniem warunkowych mutantów Rad51 sugerują, że HRR jest systemem, który bierze udział w usuwaniu uszkodzeń DNA podczas replikacji. Komórki z wyłączonym genem *Rad51* akumulowały pęknięcia DNA podczas pierwszej rundy replikacyjnej i charakteryzowały się zatrzymaniem cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G2/M w odpowiedzi na uszkodzenia

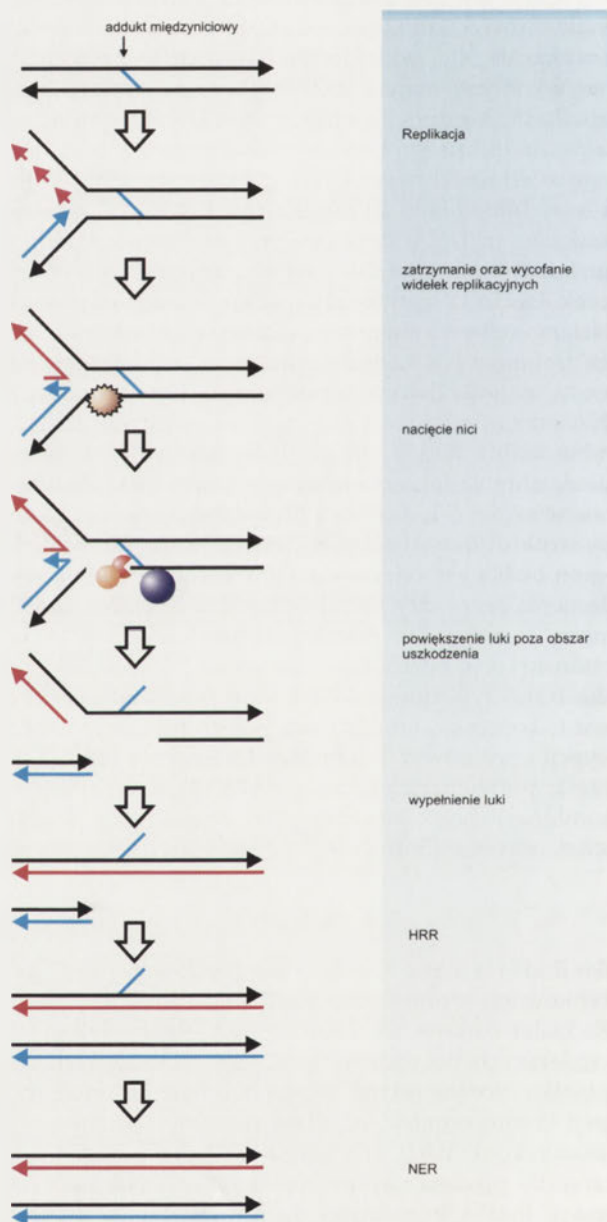
DNA. Wyniki tych badań sugerują, że sprawny system HR jest odpowiedzialny za naprawę pęknięć DNA, które zdarzają się podczas fazy S cyklu komórkowego. Podwójne pęknięcia DNA podczas replikacji powstają w przypadku napotkania przez widełki replikacyjne pęknięcia jednej nici. Takie uszkodzenia powoduje oddysocjowanie kompleksu replikacyjnego od DNA i rozpoczęcie replikacji DNA indukowanej pęknięciem (ang. *break induced replication*, BIR) zależnej od systemu HRR [66]. W odróżnieniu od naprawy dwuniciowego pęknięcia DNA, kiedy do dyspozycji systemu HRR są dwa końce DNA, BIR jest indukowana przez jeden koniec DNA (Ryc. 8) [67]. Wznowienie replikacji następuje po wypełnieniu luki w potomnej cząsteczce DNA spowodowanej przerwaniem procesu replikacji i następującej po tym zdarzeniu inwazji zakończenia uszkodzonego DNA na drugą homologiczną cząsteczkę DNA powstałą na nieuszkodzonej nici matrycowego DNA. Znaczna ilość zjawisk SCE zachodzących w komórkach z wyłączonymi genami kodującymi białka odpowiedzialne za naprawę pęknięć jednoniciowych (*XRCC1*, *PARP-1*) sugeruje, że rozcięcie jednej struktury Hollidaya powstałej podczas BIR następuje na drodze *crossing-over* i przebiega z wymianą nici [68]. Naprawa BIR odbywa się głównie z udziałem białka Rad51, aczkolwiek wyniki badań z wykorzystaniem drożdży wskazują, że również białko Rad52 jest odpowiedzialne za naprawę około 5% zdarzeń BIR. Sugeruje się, że naprawa BIR z udziałem Rad52 może przebiegać w ściśle określonych, specyficznych regionach chromosomu i wymaga obecności białka Rad59 [66].



**Rycina 8.** Naprawa złamanych widełek replikacyjnych przez HRR (naprawa z jednym końcem DNA). (a) Widełki replikacyjne napotykają pęknięcie nici (b) jeden koniec DNA jest utworzony po oddysocjowaniu kompleksu replikacyjnego (c) luka w matrycowym DNA zostaje wypełniona (kolor niebieski), koniec jest trawiony przez MRN z odsłonięciem jednej nici od strony 3' (kolor czerwony) (d) inwazja nici na matrycowy DNA z wytworzeniem struktury HJ (e) rozcięcie HJ i odtworzenie kompleksu replikacyjnego. Efektem rozcięcia struktury HJ jest konwersja genu (kolor żółty) lub wymiana nici (kolor zielony).

## NAPRAWA WEWNĄTRZNICIOWYCH WIĄZAŃ KRZYŻOWYCH

Wiele związków dwufunkcyjnych tworzy wewnątrznicowe wiązania krzyżowe. Tego rodzaju uszkodzenia DNA są usuwane wspólnie przez systemy NER i HRR (Ryc. 9). Wiązania krzyżowe indukują pęknięcia DNA podczas replikacji DNA, prawdopodobnie z powodu złamania widełek replikacyjnych oraz następującego po tym zdarzeniu ataku nukleaz. Kompleks XPF-ERCC1 degraduje jedną ze związanych nici w kierunku 3' → 5' z wytworzeniem adduktu przylegającego do DSB [69]. Powstała luka jest wypełniana



**Rycina 9.** Naprawa adduktów międzyniciowych przez HRR oraz NER. Widełki replikacyjne po napotkaniu adduktu międzyniciowego wycofują się poza obszar uszkodzenia. Egzonukleazy nacinają jedną uszkodzoną nić. Powstała przerwa w jednej nici DNA jest powiększana przez kompleks endonukleolityczny, a luka w cząsteczce DNA jest wypełniana przez polimerazę DNA. Odtworzenie widełek replikacyjnych i ominięcie uszkodzonej zasady przez kompleks replikacyjny następuje z udziałem białek system HRR analogicznie jak w przypadku naprawy złamanych widełek replikacyjnych. Uszkodzony nukleotyd zostaje wycięty przez NER.

przez polimerazę DNA. W kolejnym etapie zachodzi naprawa BIR przeprowadzana przez białka HRR: Rad51, Rad52, XRCC2, XRCC3 oraz RPA [69]. Ostatnim etapem naprawy wiązań wewnątrznicowych jest usunięcie adduktu przez system NER.

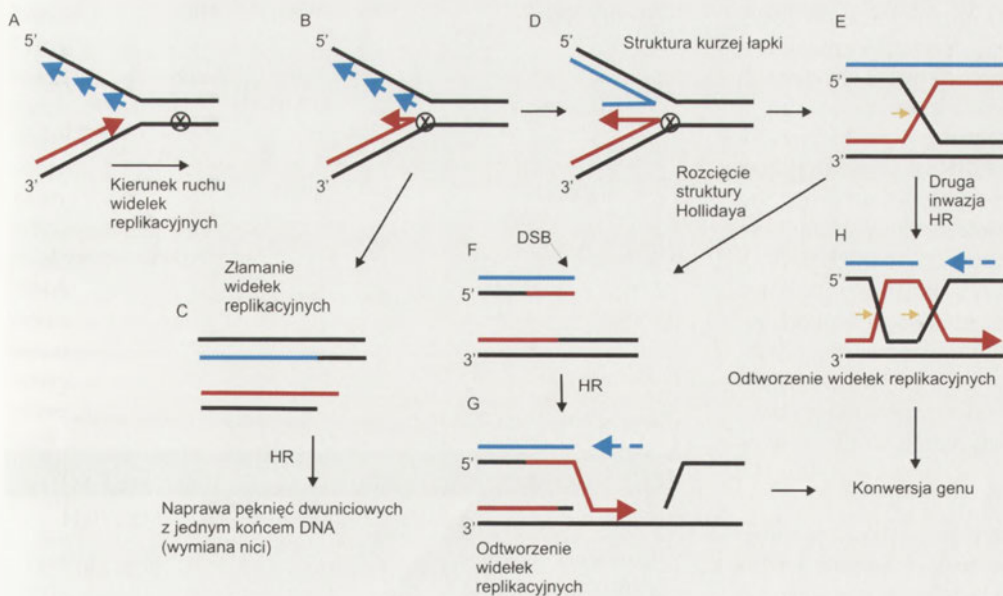
## NAPRAWA ZATRZYMANEJ WIDEŁKI REPLIKACYJNEJ

Cechą charakterystyczną komórek z uszkodzonymi genami kodującymi elementy systemu HRR jest oprócz wrażliwości na czynniki indukujące pęknięcia dwuniciowe, również nadwrażliwość na czynniki chemiczne, które zatrzymują widełki replikacyjne podczas semikonserwatywnej syntezy DNA. Ponadto czynniki blokujące ruch widełek replikacyjnych indukują rekombinację homologiczną oraz powodują powstanie skupisk głównego białka HRR, Rad51 [70]. Hydroksymocznik jest związkami, który zatrzymuje widełki replikacyjne poprzez blokowanie aktywności reduktazy rybonukleotydowej, odpowiedzialnej za przekształcanie rybonukleotydów do dezoksyrybonukleotydów, których brak powoduje zatrzymanie syntezy DNA i powstanie pęknięć dwuniciowych w miejscu zatrzymania widełek replikacyjnych lub w ich pobliżu. Takie uszkodzenia DNA są naprawiane przez HRR i NHEJ [70]. Pęknięcia dwuniciowe DNA nie są obserwowane w komórkach poddanych inkubacji z dTTP: czynnikiem, który zmniejsza pulę dCTP w komórce i blokuje proces replikacji. W tym przypadku naprawa uszkodzeń DNA w pobliżu widełek replikacyjnych jest przeprowadzana tylko z udziałem systemu HRR. Wyniki tych obserwacji sugerują, że NHEJ bierze udział tylko w naprawie uszkodzeń DNA, które zatrzymują widełki replikacyjne i zostają przekształcone w DSBs. Pozostałe uszkodzenia są naprawiane przez rekombinację ho-

mologiczną lub syntezę poprzez miejsce uszkodzenia (ang. *trans-lesions synthesis*) lub jego ominięcie [71].

Naprawa zatrzymanych widełek replikacyjnych na drodze rekombinacji homologicznej zaczyna się od wycofania widełek z miejsca uszkodzenia (Ryc. 10). Powstała w ten sposób struktura przypomina kurzą łapkę (ang. *chicken-foot*) i jest analogiczna do struktury Hollidaya charakterystycznej dla procesu rekombinacji homologicznej. Wycofanie się widełek replikacyjnych jest spowodowane najprawdopodobniej przez wzrost napięcia torsyjnego DNA po zatrzymaniu replikacji, ale jak dotąd brak jest danych eksperymentalnych potwierdzających tę hipotezę. Proces cofania widełek replikacyjnych dotyczy w pierwszej kolejności jednej nici, która może być substratem dla kompleksu o właściwościach endonukleazy złożonego z białek Mus81/Eme1, który ulega aktywacji podczas zatrzymania widełek replikacyjnych [72]. Powstały produkt jest identyczny z tym, jaki powstaje w wyniku naprawy złamanych widełek replikacyjnych. Efektem tej naprawy jest zawsze wymiana nici na drodze rekombinacji homologicznej.

Odtworzenie widełek replikacyjnych ze struktury Hollidaya po całkowitym ich wycofaniu następuje przez przemieszczenie się rozgałęzienia lub rozcięcie struktury Hollidaya. Procesy te są kontrolowane przez białko p53 i wymagają udziału białka BLM (przemieszczenie się rozgałęzienia) lub kompleksu białkowego złożonego z białek Rad51/Rad54 (rozcięcie struktury Hollidaya) [73,74]. Przemieszczenie się rozgałęzienia jest połączone z syntezą DNA i naprawą uszkodzonego DNA. Konsekwencją tego procesu jest wznowienie replikacji bez rekombinacji i zachowanie stabilności genomu. Rozcięcie struktury Hollidaya może przebiegać z wytworzeniem pęknięcia nici i



**Rycina 10.** Naprawa zatrzymanych widełek replikacyjnych przez HRR. (a) Widełki replikacyjne napotykać uszkodzenie DNA (b) Uszkodzenie DNA powoduje zatrzymanie widełek replikacyjnych w miejscu uszkodzenia (c) Uszkodzenie może być przekształcane w pęknięcie, kierując naprawę na drogę naprawy indukowanej pęknięciem (BIR) (d) Widełki replikacyjne mogą wycofać się z miejsca uszkodzenia tworząc strukturę kurzej łapki. Taka struktura przypomina strukturę Hollidaya (HJ) (e), która może być rozcinana (f), a następnie z udziałem białek HR są odtwarzane widełki replikacyjne (g), (h) przesuwanie struktury Hollidaya może powodować inwazję drugiej nici z wytworzeniem dwóch HJ. Ich rozcięcie prowadzi do konwersji genu.

jednego końca DNA lub też w sposób klasyczny połączony z wytworzeniem drugiej struktury Hollidaya. W pierwszym przypadku prowadzi to do wznowienia replikacji, analogicznie jak przy naprawie BIR z użyciem jednego końca DNA przez białka systemu HRR. Ponieważ proces ten generuje pęknięcie DNA, które może spowodować śmierć komórki, u eukariontów faworyzowana jest druga forma naprawy z wytworzeniem drugiej pary struktury Hollidaya. Wynikiem jej zawsze jest konwersja genu, która może powodować niestabilność genomu. Wybór drogi naprawy znajduje się pod kontrolą białka p53, które jest uznawane powszechnie za strażnika integralności genomu, między innymi poprzez faworyzowanie wznowienia procesu replikacji przez białko BLM po zatrzymaniu widełek replikacyjnych. Dlatego w wielu komórkach nowotworo-

Tabela 4. Substraty oraz produkty szlaku naprawy uszkodzeń DNA przez rekombinację homologiczną.

Czynnik uszkodzający	Uszkodzenia DNA	Szlak naprawy	Produkt rekombinacji
Promieniowanie jonizujące, enzymy restrykcyjne, Inhibitory topoiizomerazy II	Pęknięcie dwuniciowe z dwoma końcami	HRR, NHEJ	Delecja, konwersja genu, duplikacje
Kamptotecyna (inhibitor topoiizomerazy I)	Zakończenie nici DNA (jeden koniec DNA)	HRR, NHEJ	SCE, delecje
Hydroksymocznik, tymidyna	Zatrzymane widełki replikacyjne	HR	SCE, konwersja genu

wych pozbawionych prawidłowego białka p53 obserwuje się wysoki stopień niestabilności genomowej, do którego przyczynia się również proces wznowienia replikacji po naprawie uszkodzenia w szlaku HRR.

Uszkodzenia DNA, które powodują zatrzymanie widełek replikacyjnych są również naprawiane z udziałem szlaku zależnego od białka Rad6. Centralną rolę w tym systemie naprawy pełnią u drożdży białka Sgs1 oraz Srs2. U drożdży zidentyfikowano ponadto kolejną drogę naprawy uszkodzeń DNA powodujących zatrzymanie widełek replikacyjnych zależną od białka Mgs1. Najprawdopodobniej obydwie drogi naprawy występują również w komórkach ssaków, gdzie zidentyfikowano odpowiedniki drożdżowych białek Sgs1 oraz Mgs1.

Substraty oraz produkty systemu naprawy uszkodzeń DNA przez rekombinację homologiczną przedstawiono w tabeli 4.

#### CHOROBY CZŁOWIEKA ZWIĄZANE Z ZABURZENIAMI HRR

Prawidłowa naprawa pęknięć dwuniciowych jest warunkiem koniecznym integralności genomu. Nienaprawione, bądź błędnie naprawione DSBs, mogą być przyczyną rearanżacji chromosomalnych, takich jak translokacje, insercje, delecje, które z kolei mogą prowadzić do transformacji nowotworowej poprzez zmiany w protoonkogenach, genach supresorowych i mutatorowych, a także poprzez ekspresję onkogennych białek fuzyjnych. Komórki z mutacjami w genach kodujących białka systemu HRR oraz genach białek pełniących funkcje regulatorowe charakteryzują się niestabilnością genomową oraz zwiększoną wrażliwością na czynniki uszkodzające DNA w stosunku do komórek prawidłowych (Tabela 5). Zaburzenia naprawy pęknięć dwuniciowych DNA zaobserwowano u osób, u których zidentyfikowano autosomalne zespoły chorobowe przedstawione w tabeli 6. U osób tych obserwuje się bezwład mięśni, zaburzenia funkcjonowania układu odpornościowego oraz wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia wielu nowotworów złośliwych [2].

Zwiększone ryzyko zachorowania na nowotwory może być również bezpośrednim efektem mutacji genów kodujących białka systemu HRR. Przykładem nowotworu, u podłoża którego są zmiany w sekwencji genu uczestniczącego w naprawie DSB przez HRR jest rak piersi, którego jedną z przyczyn są mutacje genów kodujących białka BRCA1 i BRCA2. Również mutacje w innych genach kodujących kluczowe białka HRR (Rad51, Rad52, Rad54 i Rad54B) zostały powiązane z wystąpieniem nowotworów, aczkolwiek

Tabela 5. Fenotyp mutantów ze zmienionymi genami kodującymi białka biorące udział w naprawie pęknięć dwuniciowych przez rekombinację homologiczną.

Gen	Fenotyp mutantów
<i>Rad51</i>	Mutacja letalna w etapie zarodkowym
<i>Rad52</i>	Zmniejszona wydajność naprawy DSBs przez HRR
<i>Rad54</i>	Komórki wrażliwe na promieniowanie, zmniejszona wydajność rekombinacji homologicznej
<i>XRCC2, XRCC3</i>	Komórki wrażliwe na związki sieciujące
<i>Rad50</i>	Komórki wrażliwe na promieniowanie, zmniejszona wydajność rekombinacji homologicznej
<i>Mre11</i>	Mutacja śmiertelna na etapie zarodka
<i>NBS1</i>	Komórki wrażliwe na promieniowanie

Tabela 6. Zespoły chorobowe charakteryzujące się nadwrażliwością na czynniki uszkodzające DNA oraz niestabilnością genomu.

Zespół	Skrót	Białko	Wrażliwość
<i>Ataxia telangiectasia</i>	AT	ATM	promieniowanie jonizujące (IR)
Zespół podobny do <i>Ataxia telangiectasia</i>	ATLD	Mre11	IR
Zespół Nijmegen	NBS	NBS1	IR
Anemia Falconiego	FA	FANCD2	IR + czynniki wytwarzające wiązania międzyniciowe DNA
Zespół Blooma	BS	BLM	IR + MMS
Zespół Wernera	WS	WRN	IR+ inhibitory topoiizomerazy 1
Zespół Rothmunda-Thomsona	RTS	RECQL4	?

Tabela 7. Nowotwory charakteryzujące się translokacjami chromosomów.

Nowotwór	Skrót	Translokacja	Białko fuzyjne
Chłoniak Burkitta	BL	t(8;14)(q24;q32)	MYC/IgH
Przewlekła białaczka szpikowa	CML	t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL
Desmoplastyczny nowotwór drobno-okrągłokomórkowy	DSRCT	t(11;22)(p13;q12)	EWS/WT1

w tym przypadku ten związek nie jest tak bezpośredni jak w przypadku BRCA1 [75].



Innym przykładem nowotworów, których przyczyną są zaburzenia HRR są nowotwory spowodowane przez translokacje fragmentów chromosomów. Najczęstszą przyczyną takich translokacji jest nieefektywna naprawa pęknięć dwuniciowych DNA. Do takich chorób zalicza się między innymi szereg białaczek i chłoniaków (Tabela 7).

## UWAGI KOŃCOWE

Rekombinacja homologiczna jest procesem, którego właściwe działanie jest niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania komórki, między innymi poprzez udział w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA, stanowiących bardzo poważne zagrożenie dla komórki i całego organizmu. Głównymi funkcjami systemu naprawy DNA przez rekombinację homologiczną jest zapewnienie prawidłowej segregacji chromosomów w czasie mejozy oraz naprawa pęknięć dwuniciowych. Wszystkie czynniki powodujące powstanie DSBs aktywują systemy naprawy HRR, SSA i NHEJ. Wyniki dotychczasowych badań wskazują jednak, że system HRR, w przeciwieństwie do NHEJ, jest pobudzany nie tylko w odpowiedzi na czynniki powodujące powstanie DSBs, ale również szereg czynników o innym działaniu na DNA. HRR jest aktywowany przez związki alkilujące, jony metali ciężkich, promieniowanie UV czy związki sieciujące. Czynniki te nie zawsze muszą wywoływać DSBs, nawet pośrednio i wtórnie. A zatem czy prawdą jest, że rekombinacja homologiczna jest systemem, który naprawia pęknięcia dwuniciowe DNA? Wszystkie związki aktywujące rekombinację homologiczną mogą interferować z procesem replikacji i tym samym aktywować HRR. Nie można jednak wykluczyć, że system rekombinacji jest związany z naprawą szerszej gamy uszkodzeń DNA, niż do tej pory sądziliśmy. Naprawa pęknięć dwuniciowych z dwoma końcami przez rekombinację homologiczną, naprawa pęknięć dwuniciowych z jednym końcem czy też naprawa zatrzymanych widełek replikacyjnych to przecież trzy odmienne mechanizmy naprawy, różniące się od siebie zarówno czynnikiem sprawczym, mechanizmem naprawy, jak i końcowym produktem. W najbliższym czasie główny kierunek badań powinien skoncentrować się na identyfikacji wszystkich składników poznanych do tej pory szlaków naprawy uszkodzeń DNA z udziałem białek HRR oraz wzajemnych powiązaniach pomiędzy białkami uczestniczącymi w naprawie uszkodzeń DNA. Rosnąca ilość doniesień o aktywacji składników HRR przez szereg czynników o heterogennym charakterze chemicznym powinna skłonić do poszukiwania ewentualnych nowych szlaków naprawy uszkodzeń DNA wywołanych przez te związki z udziałem systemu rekombinacji homologicznej.

## PIŚMIENNICTWO

1. Karagiannis TC, El-Osta A (2004) Double-strand breaks: signaling pathways and repair mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 61: 2137-2147
2. Thompson LH, Schild D (2002) Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* 509: 49-78
3. Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3: 155-168
4. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934

5. Hammond EM, Giaccia AJ (2004) The role of ATM and ATR in the cellular response to hypoxia and re-oxygenation. *DNA Repair* 3: 1117-1122
6. Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421: 499-506
7. Shiloh Y, Andegeko Y, Tsarfaty I (2004) In search of drug treatment for genetic defects in the DNA damage response: the example of ataxia-telangiectasia. *Semin Cancer Biol* 14: 295-305
8. Paull TT, Lee JH. (2005) The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle* 4: 737-740
9. Cerosaletti K, Concannon P (2004) Independent roles for nibrin and Mre11-Rad50 in the activation and function of Atm. *J Biol Chem* 279: 38813-38819
10. Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 22: 5612-5621
11. van den Bosch M, Bree RT, Lowndes NF (2003) The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Rep* 4: 844-859
12. Lukas C, Falck J, Bartkova J, Bartek J, Lukas J (2003) Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol* 5: 255-260
13. Mochan TA, Venere M, DiTullio RA Jr, Halazonetis TD (2003) 53BP1 and NFB1/MDC1-Nbs1 function in parallel interacting pathways activating ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in response to DNA damage. *Cancer Res* 63: 8586-8591
14. Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A (2004) H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair* 3: 959-967
15. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273: 5858-5868
16. Ting NS, Lee WH (2004) The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever. *DNA Repair* 3: 935-944
17. Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J (2000) BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14: 927-939
18. Zhang J, Willers H, Feng Z, Ghosh JC, Kim S, Weaver DT, Chung JH, Powell SN, Xia F (2004) Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 24: 708-718
19. Powell SN, Kachnic LA (2003) Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation. *Oncogene* 22: 5784-5791
20. Li N, Banin S, Ouyang H, Li GC, Courtois G, Shiloh Y, Karin M, Rotman G (2001) ATM is required for I $\kappa$ B kinase (IKK) activation in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 276: 8898-8903
21. Pastwa E, Błasiak J (2003) Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim Pol* 50: 891-908
22. Wang H, Zeng ZC, Bui TA, Sonoda E, Takata M, Takeda S, Iliakis G (2001) Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene* 20: 2212-2224
23. Sargent RG, Meservy JL, Perkins BD, Kilburn AE, Intody Z, Adair GM, Nairn RS, Wilson JH (2000) Role of the nucleotide excision repair gene ERCC1 in formation of recombination-dependent rearrangements in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 28: 3771-3778
24. Popławski T, Błasiak J (2003) Mismatch repair. *Postępy Biochem* 49: 126-135
25. Sugawara N, Goldfarb T, Studamire B, Alani E, Haber JE (2004) Heteroduplex rejection during single-strand annealing requires Sgs1 helicase and mismatch repair proteins Msh2 and Msh6 but not Pms1. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9315-9320
26. Schildkraut E, Miller CA, Nickoloff JA (2005) Gene conversion and deletion frequencies during double-strand break repair in human cells are controlled by the distance between direct repeats. *Nucleic Acids Res* 33: 1574-1580

27. Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, van Gent DC, Shiraishi T, Verkaik NS, vanHeems D, Ito E, Nakamura A, Sonoda E, Takata M, Takeda S, Matsuura S, Komatsu K (2002) Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature* 420: 93-98
28. Pittman DL, Schimenti JC (2000) Midgestation lethality in mice deficient for the RecA-related gene, Rad51d/Rad51l3. *Genesis* 26: 167-173
29. Deans B, Griffin CS, Maconochie M, Thacker J (2000) Xrcc2 is required for genetic stability, embryonic neurogenesis and viability in mice. *EMBO J* 19: 6675-6685
30. Johnson RD, Jasin M (2000) Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J* 19: 3398-3407
31. Tischfield JA (1997) Loss of heterozygosity or: how I learned to stop worrying and love mitotic recombination. *Am J Hum Genet* 61: 995-999
32. Sigurdsson S, Van Komen S, Bussen W, Schild D, Albala JS, Sung P (2001) Mediator function of the human Rad51B-Rad51C complex in Rad51/RPA-catalyzed DNA strand exchange. *Genes Dev* 15: 3308-3318
33. Masson JY, Tarsounas MC, Stasiak AZ, Stasiak A, Shah R, McIlwraith MJ, Benson FE, West SC (2001) Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Dev* 15: 3296-3307
34. Raaphorst GP, Li LF, Yang DP, LeBlanc JM (2005) Cisplatin sensitization by concurrent mild hyperthermia in parental and mutant cell lines deficient in homologous recombination and non-homologous endjoining repair. *Oncol Rep* 14: 281-285
35. D'Andrea AD, Grompe M (2003) The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 3: 23-34
36. Raschle M, Van Komen S, Chi P, Ellenberger T, Sung P (2004) Multiple interactions with the Rad51 recombinase govern the homologous recombination function of Rad54. *J Biol Chem* 279:51973-51980
37. Mazina OM, Mazin AV (2004) Human Rad54 protein stimulates DNA strand exchange activity of hRad51 protein in the presence of Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem* 279: 52042-52051
38. Richardson C, Jasin M (2000) Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 20: 9068-9075
39. D'Amours D, Jackson SP (2002) The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 317-327
40. de Jager M, Dronkert ML, Modesti M, Beerens CE, Kanaar R, van Gent DC (2001) DNA-binding and strand-annealing activities of human Mre11: implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res* 29: 1317-1325
41. Hirano T (2002) The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev* 16: 399-414
42. Trujillo KM, Sung P (2001) DNA structure-specific nuclease activities in the *Saccharomyces cerevisiae* Rad50\* Mre11 complex. *J Biol Chem* 276: 35458-35464
43. Hopfner KP, Craig L, Moncalian G, Zinkel RA, Usui T, Owen BA, Karcher A, Henderson B, Bodmer JL, McMurray CT, Carney JP, Petrini JH, Tainer JA (2002) The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* 418: 562-566
44. Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, Matsuura S, Nakamura A, Shiraishi T, Masnada D, Delia D, Komatsu K (2001) The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for hRAD50[middle dot]hMRE11[middle dot]NBS1 complex DNA repair activity. *J Biol Chem* 276: 12-15
45. Gatei M, Young D, Cerosaletti KM, Desai-Mehta A, Spring K, Kozlov S, Lavin MF, Gatti RA, Concannon P, Khanna K (2000) ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet* 25: 115-119
46. Kobayashi J, Tauchi H, Sakamoto S, Nakamura A, Morishima K, Matsuura S, Kobayashi T, Tamai K, Tanimoto K, Komatsu K (2002) NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol* 12: 1846-1851
47. Kawabata M, Kawabata T, Nishibori M (2005) Role of recA/RAD51 family proteins in mammals. *Acta Med Okayama* 59: 1-9
48. Schild D, Lio YC, Collins DW, Tsomondo T, Chen DJ (2000) Evidence for simultaneous protein interactions between human Rad51 paralogs. *J Biol Chem* 275: 16443-16449
49. Miller KA, Yoshikawa DM, McConnell IR, Clark R, Schild D, Albala JS (2002) RAD51C interacts with RAD51B and is central to a larger protein complex in vivo exclusive of RAD51. *J Biol Chem* 277: 8406-8411
50. Yokoyama H, Kurumizaka H, Ikawa S, Yokoyama S, Shibata T (2003) Holliday junction binding activity of the human Rad51B protein. *J Biol Chem* 278: 2767-2772
51. Liu Y, Masson JY, Shah R, O'Regan P, West SC (2004) RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science* 303: 243-246
52. Havre PA, Rice M, Ramos R, Kmiec EB (2000) HsRec2/Rad51L1, a protein influencing cell cycle progression, has protein kinase activity. *Exp Cell Res* 254: 33-44
53. Pagni M, Iseli C, Junier T, Falquet L, Jongeneel V, Bucher P (2001) trEST, trGEN and Hits: access to databases of predicted protein sequences. *Nucleic Acids Res* 29: 148-151
54. Bruner SD, Norman DP, Fromme JC, Verdine GL (2000) Structural and mechanistic studies on repair of 8-oxoguanine in mammalian cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65: 103-111
55. Ranatunga W, Jackson D, Lloyd JA, Forget AL, Knight KL, Borgstahl GE (2001) Human RAD52 exhibits two modes of self-association. *J Biol Chem* 276: 15876-15880
56. Kagawa W, Kurumizaka H, Ishitani R, Fukai S, Nureki O, Shibata T, Yokoyama S (2002) Crystal structure of the homologous-pairing domain from the human Rad52 recombinase in the undecameric form. *Mol Cell* 10: 359-371
57. Liu J, Meng X, Shen Z (2002) Association of human RAD52 protein with transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 1191-1196
58. Freedman JA, Jinks-Robertson S (2002) Genetic requirements for spontaneous and transcription-stimulated mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 162: 15-27
59. Sigurdsson S, Van Komen S, Petukhova G, Sung P (2002) Homologous DNA pairing by human recombination factors Rad51 and Rad54. *J Biol Chem* 277: 42790-42794
60. Solinger JA, Heyer WD (2001) Rad54 protein stimulates the postsynaptic phase of Rad51 protein-mediated DNA strand exchange. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8447-8453
61. Alexeev A, Mazin A, Kowalczykowski SC (2003) Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the Rad51-ssDNA nucleoprotein filament. *Nat Struct Biol* 10: 182-186
62. Burma S, Chen DJ (2004) Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair* 3: 909-918
63. Saleh-Gohari N, Helleday T (2004) Strand invasion involving short tract gene conversion is specifically suppressed in BRCA2-deficient hamster cells. *Oncogene* 23: 9136-9141
64. Saleh-Gohari N, Helleday T (2004) Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Res* 32: 3683-3688
65. Ira G, Pelliccioli A, Balija A, Wang X, Fiorani S, Carotenuto W, Liberi G, Bressan D, Wan L, Hollingsworth NM, Haber JE, Foiani M (2004) DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* 431: 1011-1017
66. Haber JE (2000) Lucky breaks: analysis of recombination in *Saccharomyces*. *Mutat Res* 451: 53-69
67. Davis AP, Symington LS (2004) RAD51-dependent break-induced replication in yeast. *Mol Cell Biol* 24: 2344-2351
68. Caldecott KW, Tucker JD, Thompson LH (1992) Construction of human XRCC1 minigenes that fully correct the CHO DNA repair mutant EM9. *Nucleic Acids Res* 20: 4575-4579

69. Mu D, Bessho T, Nechev LV, Chen DJ, Harris TM, Hearst JE, Sancar A (2000) DNA interstrand cross-links induce futile repair synthesis in mammalian cell extracts. *Mol Cell Biol* 20: 2446-2454
70. Lundin C, Erixon K, Arnaudeau C, Schultz N, Jenssen D, Meuth M, Helleday T (2002) Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 22: 5869-5878
71. Lundin C, Schultz N, Arnaudeau C, Mohindra A, Hansen LT, Helleday T (2003) RAD51 is involved in repair of damage associated with DNA replication in mammalian cells. *J Mol Biol* 328: 521-535
72. Doe CL, Ahn JS, Dixon J, Whitby MC (2002) Mus81-Eme1 and Rqh1 involvement in processing stalled and collapsed replication forks. *J Biol Chem* 277: 32753-32759
73. Karow JK, Constantinou A, Li JL, West SC, Hickson ID (2000) The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of Holliday junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6504-6508
74. Constantinou A, Tarsounas M, Karow JK, Brosh RM, Bohr VA, Hickson ID, West SC (2000) Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest. *EMBO Rep* 1: 80-84
75. De la Torre C, Pincheira J, Lopez-Saez JF (2003) Human syndromes with genomic instability and multiprotein machines that repair DNA double-strand breaks. *Histol Histopathol* 18: 225-243

## DNA homologous recombination repair in mammalian cells

Tomasz Popławski, Janusz Błasiak

Department of Molecular Genetics, University of Łódź, 12/16 Banacha St., 90-237 Łódź, Poland  
e-mail: januszb@biol.uni.lodz.pl

Key words: DNA double strand breaks, DNA repair, ATM, Homologous DNA recombination

### ABSTRACT

DNA double-strand breaks (DSBs) are the most serious DNA damage. Due to a great variety of factors causing DSBs, the efficacy of their repair is crucial for the cell's functioning and prevents DNA fragmentation, chromosomal translocation and deletion. In mammalian cells DSBs can be repaired by non-homologous end joining (NHEJ), homologous recombination (HRR) and single strand annealing (SSA). HRR can be divided into the first and second phase. The first phase is initiated by sensor proteins belonging to the MRN complex, that activate the ATM protein which target HRR proteins to obtain the second response phase - repair. HRR is precise because it utilizes a non-damaged homologous DNA fragment as a template. The key players of HRR in mammalian cells are MRN, RPA, Rad51 and its paralogs, Rad52 and Rad54.

ZARZĄD GŁÓWNY POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO NA POSIEDZENIU W DNIU 31 MAJA 2006 ROKU PRYZNAŁ DOROCZNĄ NAGRODĘ IM. BOLESŁAWA SKARŻYŃSKIEGO ZA NAJLEPSZY ARTYKUŁ OPUBLIKOWANY W ROKU POPRZEDNIM W KWARTALNIKU „POSTĘPY BIOCHEMII” ZESPOŁOWI W SKŁADZIE:

Stanisław Kowalczyk, Emilia Hadowska i Anna Piekarska

Tytuł artykułu: „Roślinne układy ubikwitylacji i degradacji białek w proteasomach – kluczowe elementy hormonalnych szlaków sygnałowych”, opublikowany w tomie 51, zeszyt nr 2, str. 171-187.

Jednocześnie Zarząd Główny uznał za wyróżniający się artykuł autorów:

Katarzyny Bugały, Marka Żywickiego, Emilii Wyszko, Mirosławy Z. Barciszewskiej i Jana Barciszewskiego pod tytułem „Przełączniki RNA, opublikowany w tomie 51, zeszyt nr 2, str. 111-119.

# Rola kompleksu IL-6/sIL-6R oraz jego naturalnego inhibitora sgp130 w modulowaniu procesu zapalnego

Daria Augustyniak<sup>1,✉</sup>

Grażyna Majkowska-Skropek<sup>1</sup>

Barbara Basiewicz-  
Worsztynowicz<sup>2</sup>

Adam Jankowski<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Immunologii, Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław  
<sup>2</sup>Katedra Propedeutyki Pediatrii i Klinika Immunologii i Reumatologii Wieku Rozwojowego, Akademia Medyczna, Wrocław

✉Pracownia Immunologii, Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; e-mail: august@microb.uni.wroc.pl, tel. (071) 3756-296

Artykuł otrzymano 22 listopada 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 3 stycznia 2006 r.

**Słowa kluczowe:** kompleks IL-6/sIL6R, sgp130, konwersja receptorów, zapalenie, infiltracja, apoptoza, chemokiny

**Wykaz skrótów:** CBM – domena wiążąca ligand (ang. *cytokine binding module*); CXCR4 – receptor chemokin CXC typu 4; ENA-78 – epitelialny peptyd aktywujący neutrofile (ang. *epithelial neutrophil-activating peptide-78*); FLIP – białka hamujące kaspazę 8; FND – domena podobna do fibronektyny typu III (ang. *fibronectin-like domain*); GCP-2 – białko chemotaktyczne dla granulocytów (ang. *granulocyte chemotactic protein-2*); GRO- $\alpha$  – onkogen związany ze wzrostem (ang. *growth-factor oncogen- $\alpha$* ); HBV – wirus zapalenia wątroby typu B (ang. *hepatitis B virus*); HCV – wirus zapalenia wątroby typu C (ang. *hepatitis C virus*); IFN- $\gamma$  – interferon gamma; IGD – domena immunoglobulinopodobna (ang. *immunoglobulin-like domain*); IL-6 – interleukina 6; IP-10 – białko indukowane przez interferon (ang. *interferon inducible protein*); MAPK – kinaza MAP; MCP-1 – białko chemotaktyczne dla monocytów (ang. *monocyte chemoattractant protein-1*); PIAS – białkowe inhibitory aktywnych STAT (ang. *proteins inhibitors of activated STAT*); PMN – leukocyty krwi o jądrach segmentowanych (ang. *polymorphonuclear cells*); RZS – reumatoidalne zapalenie stawów; SDF-1 – czynnik pochodzący z komórek zrębowych (ang. *stromal cell-derived factor-1*); sgp130 – rozpuszczalna forma receptora gp130; SHP2 – fosfataza fosfotyrozyny zawierająca domene SH2 (ang. *SH2-domain containing phosphotyrosine phosphatase*); sIL-6R – rozpuszczalny receptor dla IL-6; SOCS – inhibitory sygnału cytokinowego (ang. *suppressors of cytokine signaling*); STAT – czynniki transkrypcyjne; TNF- $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ); WZJG – wrzodzące zapalenie jelita grubego

## STRESZCZENIE

Kompleks IL-6/sIL-6R należy do jednego z najbardziej plejotropowych układów ligand-receptor. Poprzez regulację migracji a także apoptozy leukocytów, odgrywa on kluczową rolę w modulowaniu procesu zapalnego. Z jednej strony, przyczynia się do wyciszenia ostrej reakcji zapalnej, warunkując tym samym utrzymanie homeostazy organizmu. Z drugiej, jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za jej przekształcenie w reakcję chroniczną, leżącą u podłoża patogenezy przewlekłych chorób zapalnych. Niniejsza praca przedstawia aktualny stan wiedzy na temat budowy, funkcji, mechanizmów powstawania oraz działania kompleksu IL-6/sIL-6R i jego naturalnego inhibitora sgp130 we wspomnianych procesach.

## WPROWADZENIE

Zapalenie ostre jest zespołem reakcji wywołanych uszkodzeniem tkanek, procesem krzepnięcia i uczynnieniem układu dopełniacza, któremu towarzyszy wzrost przepływu krwi, wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych oraz akumulacja leukocytów w miejscu zranienia. Jest to złożony proces wieloczynnikowy, na który składa się współistnienie i współdziałanie licznych aktywatorów i inhibitorów. Te biologicznie czynne substancje regulują odpowiedź organizmu na czynniki uszkodzające lub drażniące pochodzenia zewnętrznego lub wewnętrznego [1,2]. Konsekwencją zapalenia jest zazwyczaj korzystny i ściśle czasowo określony proces, mający na celu eliminację szkodliwego czynnika oraz przywrócenie integralności uszkodzonej tkanki. W warunkach nieprawidłowych jednakże proces ten przybiera postać reakcji przewlekłej, która prowadzi do zwłóknienia i martwicy, a w efekcie do nieodwracalnej przebudowy struktury i funkcji danej tkanki.

Do zapaleń ostrych prowadzą typowe infekcje bakteryjne, zranienia i stłuczenia, do przewlekłych natomiast: długotrwałe zakażenie patogenami wewnątrzkomórkowymi np. *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Helicobacter pylori*, *Leishmania donovani* itp, wirusami hepatotropowymi np. HBV i HCV, długotrwała ekspozycja na czynniki fizyczne o małej toksyczności (np. sylikon) a także reakcje autoimmunologiczne czy alergiczne.

Osiągnięcia ostatnich kilku lat ujawniły wiele z mechanizmów molekularnych leżących u podłoża rozwoju zapalenia. Celem niniejszego artykułu jest próba odpowiedzi na trzy nurtujące pytania: 1) W którym momencie niewątpliwie korzystny proces zapalny przechodzi w stan patologiczny o przedłużonej manifestacji klinicznej; 2) Jaką rolę w regulacji tego zjawiska pełni kompleks IL-6/sIL-6R oraz receptor sgp130; 3) Jaki jest związek opisywanego układu z patogenezą wybranych przewlekłych chorób zapalnych.

## INTERLEUKINA 6 (IL-6)

IL-6 jest plejotropową interleukiną należącą do rodziny cytokin IL-6, uwalnianą między innymi przez monocyty, makrofagi, limfocyty T i B, komórki śródbłonka, fibroblasty, komórki dendrytyczne, osteoblasty, keratynocyty oraz astrocyty. Wielokierunkowość jej oddziaływań polega na modulacji wielu zjawisk fizjologicznych jak choćby proliferacji, różnicowania czy apoptozy. Efekty wszechstronnych działań IL-6 zaobserwować można w centralnym układzie nerwowym, układzie immunologicznym ale też w procesach krwiotworzenia, nowotworzenia, metabolizmu kości czy wreszcie w reakcji zapalnej. Ze względu na szerokie spektrum działania, funkcjonowanie IL-6 stało się układem modelowym wielu mediatorów sygnalizacji międzykomórkowej.

Gen kodujący IL-6 o długości 5 kb składa się z 5 eksonów oraz 4 intronów i jest zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 7 (7p21). Sekwencja aminokwasowa obejmuje 212 reszt i zawiera 27-aminokwasowy peptyd sygnałowy oraz

dwa potencjalne miejsca N-glikozylacji. Struktura krystalograficzna białka wykazała istnienie dwóch przeciwbieżnie ułożonych par, zawierających ściśle upakowane  $\alpha$  helisy, o długości od 15 do 22 aminokwasów każda, nazwanych A-B, C-D i wykazujących orientację *górną-górną-dół-dół* oraz istnienie trzeciej krótszej pętli zawierającej dwie przeciwbieżne helisy B-C.

IL-6 posiada swoje homologi w zakresie sekwencji aminokwasowej u ponad 12 gatunków kręgowców, z wyjątkiem ryb. Również ludzki wirus z rodzaju *Herpes 8*, będący czynnikiem etiologicznym mięsaka Kaposiego, koduje funkcjonalny homolog tej cytokiny o nazwie vIL-6 [3,4]

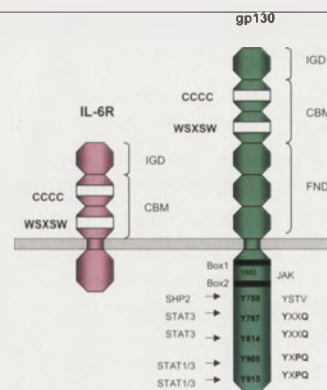
## KOMPLEKS RECEPTORA INTERLEUKINY-6

### RECEPTORY BŁONOWE: IL-6R $\alpha$ I gp130

W układzie klasycznym IL-6 oddziałuje poprzez specyficzny multimeryczny kompleks receptora, który składa się z dwóch transbłonowych glikoprotein. Pierwszą stanowi niesygnalny receptor IL-6R $\alpha$  znany również jako podjednostka  $\alpha$  IL-6R, gp80 czy CD126. Nie uczestniczy on bezpośrednio w aktywacji komórki zaś jego podstawowa funkcja sprowadza się do związania swoistego liganda. Drugą glikoproteiną jest gp130 (synonimy: podjednostka  $\beta$  IL-6R, IL-6R $\beta$ , CD130), odpowiedzialny za uruchomienie wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału do aktywacji [4].

W regionie zewnątrzkomórkowym, receptory IL-6R $\alpha$  i gp130 składają się z domeny immunoglobulinopodobnej IGD przy N-końcu oraz z tak zwanej domeny wiążącej ligand CBM zawierającej dwa charakterystyczne motywy: motyw 4 cystein (CCCC) oraz zachowaną sekwencję Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS), gdzie X oznacza dowolny aminokwas. Składowa gp130 posiada dodatkowo w tym regionie 3 domeny podobne do fibronektyny typu III, położone najbliżej błony komórkowej. Taka lokalizacja wskazuje na stabilizującą funkcję domen fibronektynopodobnych dla powstających w trakcie pobudzenia receptorowych kompleksów. Domena cytoplazmatyczna IL-6R $\alpha$  jest krótka, składa się z 82 aminokwasów i nie bierze udziału w transdukcji sygnału komórkowego. Domena cytoplazmatyczna gp130 jest znacznie dłuższa, i podobnie jak w przypadku innych receptorów dla cytokin, znajdują się w niej regiony wiążące cytoplazmatyczną kinazę tyrozynową JAK oraz sekwencje niezbędne do aktywacji białek SHP2 (motyw YSTV) i białek STAT1 (motyw YXPQ) oraz STAT3 (motyw YXXQ). Porównanie struktury obu receptorów przedstawia rycina 1.

Receptor gp130 odpowiada również za przekazanie sygnału wewnątrzkomórkowego po pobudzeniu przez pozostałe cytokiny zgrupowane w obrębie rodziny IL-6, a mianowicie IL-11, rzęskowy czynnik neurotrofowy (CNTF), kardiotropinę (CT-1), czynnik hamujący białaczkę (LIF), onkostatynę M (OSM). Należy podkreślić, iż aktywacja całego kompleksu receptorowego jest albo wynikiem tworzenia się homodimerów z dwóch receptorów gp130 (dotyczy IL-6 i IL-11), bądź skutkiem formowania heterodimerów pomiędzy gp130, a strukturalnie podobnymi, chociaż słabiej eks-



Rycina 1. Struktura receptorów IL-6R i gp130 interleukiny 6, Y – miejsca fosforylacji reszt tyrozyny [4].

presjonowanymi receptorami LIF-R $\beta$  (po zadziałaniu LIF, OSM, CT-1) lub OSMR $\beta$  (po zadziałaniu OSM) [5].

Scenariusz interakcji pomiędzy IL-6 a jej zakotwiczoną w błonie kompleksem receptora przedstawia się następująco: 1) IL-6 (epitop I) po połączeniu z IL-6R $\alpha$  tworzy heterodimer; 2) heterodimer IL-6/IL-6R $\alpha$  za pośrednictwem epitopu II w obrębie IL-6 łączy się z domeną wiążącą ligand obecną w gp130, tworząc trzycząsteczkowy kompleks o stechiometrii 1:1:1, niezdolny jeszcze do przekazania sygnału do wnętrza komórki; 3) dopiero dwa heterotrimery IL-6/IL-6R $\alpha$ /gp130, w których każda cząsteczka gp130 łączy się równocześnie z dwoma cząsteczkami IL-6 (region domeny CBM gp130 wiąże epitop II jednej IL-6, zaś region domeny IGD gp130 wiąże epitop III drugiej IL-6) umożliwiają powstanie kompletnego i stabilnego heksameru (4 receptory, 2 ligandy) zdolnego zainicjować przeniesienie sygnału do aktywacji [3,4,6,7].

### RECEPTORY ROZPUSZCZALNE: sIL-6R I sgp130

Analogicznie do innych receptorów cytokin, oba receptory dla IL-6 mogą występować w formach rozpuszczalnych. Rozpuszczalny receptor sIL-6R występuje pod postacią dwóch izoform: DS-sIL-6R i PC-sIL-6R. Do powstania pierwszej z nich dochodzi w drodze alternatywnego składowania mRNA. Jego konsekwencją na poziomie translacji jest wprowadzenie w odcinku C-końcowym nowej sekwencji złożonej z 10 reszt aminokwasowych GSRRRGSCGL oraz usunięcie eksonu kodującego domenę transbłonową receptora. Druga izoforma powstaje poprzez proteolityczne odcięcie regionu zewnątrzkomórkowego błonowego receptora bezpośrednio z powierzchni komórki w procesie tzw. ograniczonej proteolizy. Odcięcie to ma miejsce pomiędzy resztą Gln w pozycji 357 a resztą Asn w pozycji 358 i jest przeprowadzane przy udziale zależnych od cynku konwertaz TNF- $\alpha$ , należących do rodziny metaloproteaz ADAM (ang. *a disintegrin and metalloproteinase*) [8,9]. Dodatkowo, w odróżnieniu od DS-sIL-6R, generowanie izoformy PC-sIL-6R jest ściśle związane z mobilizacją w środowisku jonów Ca<sup>2+</sup>. Wynika stąd, że obydwa mechanizmy prowadzące do powstania wspomnianych izoform są regulowane odmiennie [10]. Proces złuszczenia receptora IL-6R $\alpha$  z powierzchni komórki (neutrofilów) może zostać zainicjowany przez tok-

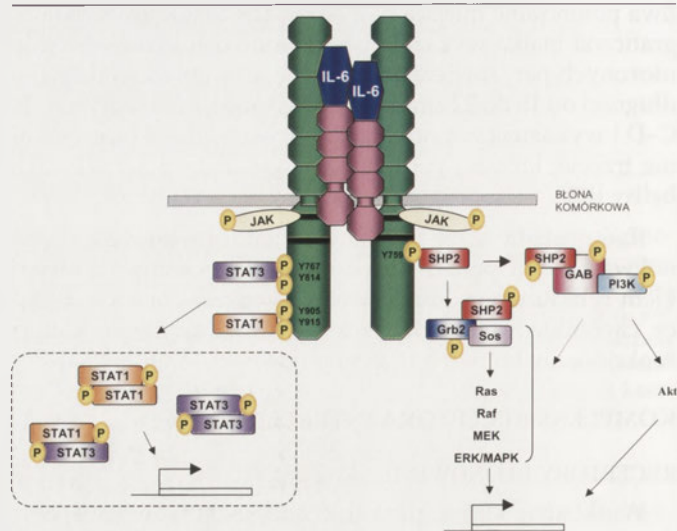
syny bakteryjne, formylowane peptydy bakteryjne, białka C-reaktywne oraz przez IL-8 [11].

Drugi z rozpuszczalnych receptorów – sgp130, występuje w warunkach fizjologicznych w stosunkowo dużym stężeniu (100–300 ng/ml). Pomimo, iż *in vitro*, wykazano powstawanie sgp130 na drodze ograniczonej proteolizy receptora błonowego, większość badaczy podkreśla istotniejszy potencjał biologiczny tych izoform, które są wynikiem odmiennego składowania mRNA. Dotychczas *in vivo* udało się zidentyfikować 3 alternatywne warianty mRNA, ulegające translacji do 3 izoform sgp130 o masach: 90 kDa, 110 kDa i 50 kDa. Dwie pierwsze hamują funkcję IL-6 oraz pozostałych cytokin z tej rodziny [12]. Trzecia, skrócona izoforma o nazwie gp130-RAPS (z ang. *gp130 of the rheumatoid arthritis antigenic peptide-bearing soluble form*) jest jednym z autoantygenów w reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS). W odcinku C-końcowym, posiada ona unikalną sekwencję Asn-Ile-Ala-Ser-Phe (NIASF). Sekwencja NIASF indukuje powstawanie autooprzeciwciał, których produkcja jest skorelowana z aktywnością choroby. Co więcej, przeciwciała te u pacjentów z RZS neutralizują funkcję hamującą gp130-RASP skierowaną przeciwko IL-6 [13].

## INDUKOWANE IL-6 SZLAKI PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU

Przyłączenie IL-6 do IL-6R $\alpha$  indukuje dimeryzację gp130. Autofosforylacja pięciu z sześciu reszt tyrozynowych w części cytoplazmatycznej gp130 przez kinazę JAK, konstytutywnie związaną za pośrednictwem dwóch regionów typu Box, jest wymagana do aktywacji dwóch głównych szlaków przekazywania sygnału, a mianowicie SHP2/ERK MAPK i STAT 1/3. W przypadku pierwszego z nich, do umożliwienia asocjacji z receptorem, rekrutowanej z cytoplazmy fosfatazy SHP2, konieczna jest fosforylacja reszty tyrozynowej położonej najbliższej błony komórkowej. Dalsza fosforylacja tejże fosfatazy sprzyja połączeniu się z nią innego białka adaptorowego, związanego z receptorem czynnika wzrostu Grb2 (ang. *growth factor receptor-bound protein-2*). Jest ono konstytutywnie związane z czynnikiem wymiany Sos (wymiana GDP/GTP). Utworzenie takiego kompleksu ułatwia przyłączenie do niego białka Ras oraz jego aktywację (powstanie Ras-GTP), a w konsekwencji aktywację kinazy ERK. Fosforylacja tyrozyny w białku SHP2 może także prowadzić do powstania kompleksu z białkami adaptorowymi Gab1/2 oraz z podjednostką regulatorową p85 kinazy 3' fosfatydylinozytolu (kinaza PI3). Skutkiem utworzenia trójściłkowego kompleksu SHP2/Gab1/PI3K jest uruchomienie szlaku z udziałem kinazy serynowo-treoninowej Akt, który kontroluje podatność komórek na apoptozę. Istnieje także możliwość włączenia się powyższego kompleksu w szlak Ras/ERK MAPK.

Drugi ze wspomnianych szlaków przekazywania sygnału wykorzystuje czynniki transkrypcyjne STAT1/3. Białka te wiążą się do czterech ufosforylowanych motywów sygnalnych: dwóch YXPQ i dwóch YXXQ, a następnie po własnej fosforylacji przez kinazę JAK tworzą homo- bądź heterodimery: STAT1-STAT1, STAT3-STAT3, STAT1-STAT3. Dimery te ulegają natychmiastowej translokacji do jądra, gdzie dochodzi do aktywacji docelowych genów. Cztery wspomniane motywy uczestniczące w wiązaniu białek



Rycina 2. Indukowane IL-6 szlaki przekazywania sygnału do jądra [zmienione wg 4,5].

STAT nie są sobie równocenne. Wykazano, że leżące dalej od błony komórkowej motywy YXPQ, zawierające tyrozyny w pozycji Y905 i Y915, umożliwiają silniejszą aktywację białek STAT (chodzi o silniejsze wiązanie DNA oraz silniejszą aktywację genu promotorowego), aniżeli zlokalizowane proksymalnie motywy YXXQ (Y767 i Y814), (Ryc. 2).

Mechanizmy negatywnej regulacji opisanych szlaków sygnalizacyjnych obejmują między innymi udział cytoplazmatycznych inhibitorów PIAS, których asocjacja ze zaktywowanymi czynnikiemami STAT uniemożliwia ich dimeryzację i przemieszczanie do jądra. Drugą grupę stanowią tzw. supresory sygnalizacji cytokin SOCS1/3, a zarazem inhibitory kinaz JAK. Skutkiem zależnej od STAT3 indukcji wspomnianych supresorów jest z jednej strony hamowanie fosforylacji gp130, STAT1 i STAT3, z drugiej natomiast przeprowadzana w proteasomach degradacja składowych aktywnego kompleksu receptorowego [4,5,14].

## KONWERSJA RECEPTORÓW Z UDZIAŁEM KOMPLEKSU IL-6/sIL-6R

Podczas gdy gp130 występuje we wszystkich typach komórek, IL-6R $\alpha$  ulega ekspresji w ograniczonej ich liczbie, w szczególności zaś w hepatocytach, neutrofilach monocytach/makrofagach i niektórych limfocytach. Co ciekawe, stosunkowo silna ekspresja IL-6R $\alpha$  na neutrofilach nie idzie w parze z jego obserwowaną aktywnością biologiczną. Przyjmuje się zatem, że klasyczny receptor zakotwiczony w błonie stanowi w dużym stopniu źródło swojej rozpuszczalnej formy. Jej obecność jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania interleukiny 6. Receptor sIL-6R nie tylko bowiem wiąże IL-6, dzięki czemu chroni ją przed degradacją enzymatyczną, ale także wzmacnia działanie tej cytokiny, tworząc wraz z nią kompleks o wysokim powinowactwie, który poprzez interakcję z gp130 inicjuje komórkowe szlaki sygnalizacyjne. Dzięki takiej strategii, umożliwiającej przewyżczenie limitującego wpływu ograniczonej liczby podjednostek  $\alpha$  na powierzchni komórek, efekty biologiczne wywołane przez IL-6 zostają spotęgowane. W efekcie, wielkocząsteczkowy kompleks IL-6/sIL-6R ma zdolność

aktywacji również tych komórek, które są pozbawione receptora IL-6R $\alpha$ , a co za tym idzie, same nie są w stanie zareagować na IL-6. Jako przykład modelowy można przytoczyć umożliwienie reakcji na IL-6 komórkom śródbłonna wyposażonym jedynie w gp130, w obecności generowanego przez neutrofile sIL-6R. Do innych komórek pozbawionych błonowego receptora IL-6R $\alpha$  należą hematopoetyczne komórki progenitorowe, osteoklasty, komórki nerwowe, limfocyty T czy komórki mięśni gładkich [15].

Nabywanie nowych funkcji biologicznych przez kompleks IL-6/sIL-6R umożliwia zmiany fenotypu różnych komórek. Ilustruje to choćby uzyskanie przez aktywowane komórki śródbłonna zdolności do produkcji chemokiny MCP-1. Proces ten, nazwany konwersją receptorów (z ang. *receptor conversion or transsignaling*), został ujęty w ramy tzw. modelu konwersji receptorów, według którego funkcjonują również inne cytokiny, np. IL-11 czy IL-12. W modelu tym kompleks utworzony pomiędzy określoną cytokiną i rozpuszczalną formą jej receptora działa na komórki docelowe jako cytokina o nowo zdefiniowanej specyficzności [16]. Opisany mechanizm przyczynia się zatem do generowania funkcjonalnej różnorodności cytokin – w naszym przypadku IL-6, (Ryc. 3A i 3B).

### SGP130 JAKO INHIBITOR UKŁADU IL-6/SIL-6R

Naturalnym i selektywnym inhibitorem odpowiedzi zainicjowanej przez kompleks IL-6/sIL-6R jest rozpuszczalny

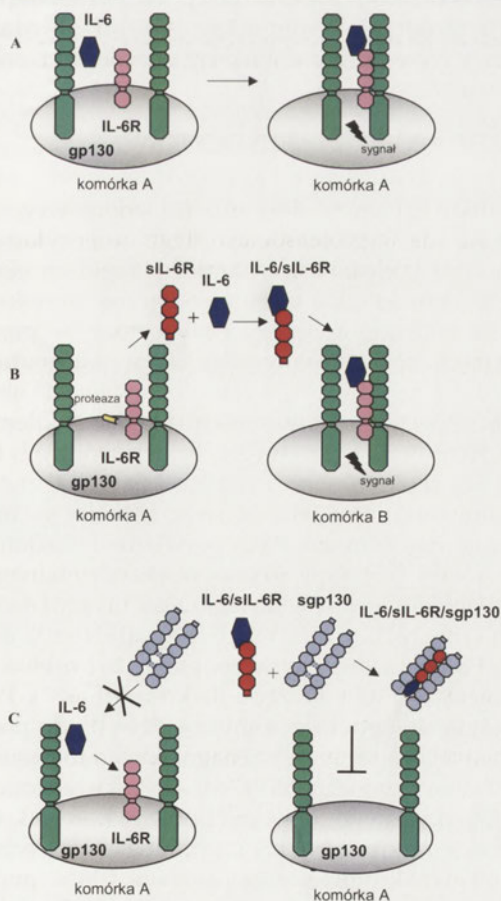
receptor sgp130. Mechanizm antagonistycznego działania tego receptora opiera się na fakcie, że wiąże on wyłącznie IL-6 będącą w kompleksie z sIL-6R. Dochodzi wówczas do powstania heterotrimeru IL-6/sIL-6R/sgp130, niezdolnego do pobudzenia jakichkolwiek komórek. Można zatem powiedzieć, że aktywność sgp130 w supresji odpowiedzi kierowanej przez IL-6 jest warunkowana obecnością kompleksów IL-6/sIL-6R.

Ponieważ zarówno błonowa jak i rozpuszczalna forma receptora gp130 w równym stopniu reagują z kompleksem IL-6/sIL-6R, w przypadku nadmiaru w środowisku tej drugiej, wspomniany kompleks zostaje zablokowany. W warunkach prawidłowych surowicze stężenie sgp130 (250-350 ng/ml) blisko 6-krotnie przewyższa poziom sIL-6R (około 50 ng/ml). Ponadto surowicze stężenia zarówno sgp130 jak i sIL-6R są stosunkowo stabilne i ulegają zazwyczaj nie większemu niż dwukrotnemu wzrostowi w warunkach choroby. Dla porównania stężenie IL-6 kształtujące się w pg/ml podczas choroby wzrasta 1000x. Na podstawie analizy fizykochemicznej można wywnioskować, że nawet przy bardzo wysokim poziomie IL-6 (5 ng/ml), ponad 98% kompleksów IL-6/sIL-6R zostanie zneutralizowanych przez sgp130. Przypuszczalnie więc, ewolucja opisywanej pary rozpuszczalnych receptorów szła w kierunku, który umożliwił wyhamowanie nadmiernej systemowej odpowiedzi immunologicznej kierowanej przez IL-6. Podsumowując, chociaż sgp130 nie może blokować zależnej od IL-6 aktywacji komórek posiadających błonowy receptor IL-6R, w obecności sIL-6R ulegają wzmocnieniu właściwości antagonistyczne tego receptora [17,18]. Ta cecha sgp130 stawia go w kategoriach skutecznego i specyficznego czynnika terapeutycznego, który hamuje aktywność IL-6 jedynie w trakcie konwersji receptorów, nie interferuje natomiast z klasycznym szlakiem aktywacji z jej udziałem (Ryc. 3C), [19].

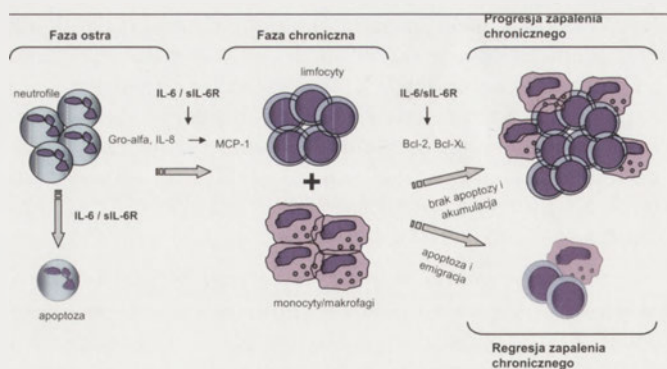
### ROLA KOMPLEKSU IL-6/sIL-6R W PRZEKSZTAŁCENIU ZAPALENIA OSTREGO W POSTAĆ PRZEWLEKŁĄ

#### REGULACJA REKRUTACJI LEUKOCYTÓW

Udział kompleksów IL-6/sIL-6R w procesie transycji pomiędzy ostrym a przedłużonym stanem zapalnym jest nieodzownie związany z pełnioną przez nie funkcją kontrolną w procesie rekrutacji określonych populacji komórek do ogniska zapalnego. Ów charakterystyczny wzór infiltracji cechuje się początkowym napływem neutrofilów, później zaś monocytów i limfocytów (Ryc. 4). Etapy progresji reakcji zapalnej, od fazy ostrej do chronicznej, zostały prześledzone w trakcie badań monitorujących rozwój leukocytarnego nacieku w przebiegu indukowanego, bakteryjnego zapalenia otrzewnej u myszy jak również z wykorzystaniem otrzewnowych komórek mezotelialnych człowieka [20,21]. Zgodnie z nimi, w następstwie infekcji w początkowej fazie zapalenia, komórki zrębowe rezydujące w tkankach (komórki śródbłonna, fibroblasty czy makrofagi) w odpowiedzi na cytokiny o wzmożonych właściwościach zapalnych, tj. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  oraz IL-6, uwalniają chemokiny IL-8 i GRO- $\alpha$ . Obie chemokiny będąc silnymi chemoatraktantami neutrofilów biorą czynny udział w ich rekrutacji do ogniska zapalnego. Mogą indukować również proces złuszczenia receptorów IL-6R $\alpha$  z powierzchni napływających komórek,



Rycina 3. Rola kompleksu IL-6/sIL-6R i sgp130 w aktywacji komórki [zmienione wg 9]: A – klasyczny szlak aktywacji, B – proces konwersji receptorów; C – hamująca rola sgp130.



Rycina 4. Rola kompleksu IL-6/sIL-6R w kluczowych etapach warunkujących przejście od fazy ostrej do fazy chronicznej reakcji zapalnej.

co prowadzi do lokalnego wzrostu stężenia rozpuszczalnej formy sIL-6R. Zjawisko to sprzyja powstawaniu kompleksów IL-6/sIL-6R, które drogą konwersji receptorów mają zdolność aktywacji komórek rezydujących w tkankach. Jest to o tyle istotne, że rezydenci tkanek często nie posiadają funkcjonalnego receptora IL-6R, samoistnie nie są więc zdolni do reakcji na IL-6. Skutkiem wspomnianego zjawiska jest modulacja ekspresji określonych chemokin zapalnych w komórkach stromy. I tak zahamowana zostaje produkcja początkowo uwalnianych chemokin z rodziny CXC z motywem ELR, a mianowicie GRO- $\alpha$  i IL-8. Wzmocnieniu natomiast ulega synteza, działającej na monocyty i zaktywowane limfocyty T, chemokiny z rodziny CC tj. MCP-1. Opiswane zjawisko wydaje się być specyficzne wyłącznie w odniesieniu do niektórych chemokin CXC ELR\*. Podobnej supresji nie obserwuje się bowiem ani w przypadku syntezy innych chemokin tej grupy, np. ENA-78, GCP-2, ani tym bardziej w stosunku do chemokin CXC pozbawionych motywu ELR – takich jak np. IP-10. Skutkiem zainicjowanej przez kompleks IL-6/sIL-6R jakościowej zmiany w syntezie chemokin w ognisku zapalnym jest zahamowanie dalszego napływu neutrofilów oraz równoczesne uruchomienie mobilizacji monocytów, później zaś także limfocytów. Mamy tu do czynienia z przejściem od akumulacji leukocytów PMN – głównie neutrofilów, będących podstawą wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, do akumulacji komórek jednójdrzastych, charakterystycznych dla odporności nabytej.

Ponieważ neutrofile należą do kluczowych komórek wczesnej fazy zapalenia, muszą cechować się czasową zdolnością do wzmożonej produkcji wielu mediatorów tego procesu. W niezaktywowanych, spoczynkowych neutrofilach transkrypty mRNA dla receptora IL-6R $\alpha$  syntezowane są konstytutywnie, przy czym nie wykrywa się proporcjonalnej ilości samego białka. Po aktywacji komórki dochodzi do wzmożonego procesu translacji przy równoczesnym braku pojawiania się nowych transkryptów. Kinetyka konstytutywnej ekspresji genu nie koreluje więc z kinetyką powstawania gotowego już produktu białkowego. Sugeruje to, iż regulacja ekspresji genu dla IL-6R $\alpha$  w dużej mierze zachodzi na poziomie translacji, przy wykorzystaniu mRNA nagromadzonego uprzednio w komórce w wyniku konstytutywnej transkrypcji. Potwierdziły to doświadczenia, w których produkcja białka IL-6R $\alpha$  nie ulegała osłabieniu w obecności aktynomycyny D (związek blokujący transkrypcję), ulegała natomiast zahamowaniu wobec cykloheksymidu (związek blokujący translację). Dominującą frakcją

owego konstytutywnego mRNA stanowią te transkrypty, z których powstaje transblonowy receptor a z niego izoforma PC-sIL-6R. Dopiero pozostała, niewielka część mRNA wykorzystana zostaje do syntezy izoformy DS-sIL-6R. Proces translacji receptora IL-6R $\alpha$ , zainicjowany przez sygnały dostarczane z zewnątrz, np. przez czynnik aktywujący płytki krwi, lipopolisacharyd czy TNF- $\alpha$ , jest regulowany przy udziale wewnątrzkomórkowej kinazy mTOR (z ang. *mammalian target of rapamycin*). Świadczy o tym fakt zablokowania translacji po zastosowaniu inhibitora tejże kinazy – bakteryjnego makrolidu – rapamycyny. Ogromną zależnością kontroli ekspresji IL-6R $\alpha$  na poziomie translacji jest możliwość szybkiej syntezy białka nie wymagającej w danym momencie generowania nowych transkryptów mRNA, jego dojrzewania oraz transportu z jądra do cytoplazmy. Nie można jednakże wykluczyć udziału innych mechanizmów kontrolnych w omawianym przypadku, jako że kontrola białek o tak szerokiej aktywności biologicznej regulowana jest na wielu etapach ich syntezy [22].

Funkcja efektorowa autokrywnie i parakrywnie działającej IL-6 w kooperacji z sIL-6R, polega także na wzmocnieniu, kluczowego w procesie infiltracji limfocytów, etapu adhezji. Jest on pośrednio wynikiem stresu cieplnego zainicjowanego przez silne endogenne pirogeny: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  oraz samą IL-6. Zjawisko infiltracji limfocytów nieodzwrotnie łączy się z garniturem ekspresjonowanych na ich powierzchni L-selektyn. Dlatego w modyfikacji powinowactwa oraz zachłanności właśnie tych cząsteczek adhezyjnych należy upatrywać nowo-nabytych zdolności do adhezji. W tym aspekcie „aktywowane termicznie” kompleksy IL-6/sIL-6R, działające na limfocyty, powodują amplifikację zależnej od L-selektyn adhezji tych komórek [23].

## REGULACJA APOPTOZY LEUKOCYTÓW

W ognisku zapalnym dochodzi do stopniowego zastępowania nacieku neutrofilowego przez monocytarno-limfocytarny. Jest ono nie tylko skutkiem regulacji ekspresji zapalnych chemokin, ale także nieodłączną konsekwencją lokalnie zachodzącej apoptozy i fagocytozy – procesów prowadzących do kontrolowanego ubywania neutrofilów (Ryc. 4). Aktywne usuwanie wyeksploatowanych i obumarłych neutrofilów jest istotne, ponieważ będąc źródłem reaktywnych form tlenu oraz szeregu bakterioobójczych białek, mogłyby być silnie toksyczne dla otaczających tkanek [24]. Udział kompleksu IL-6/sIL-6R wraz z IFN- $\gamma$  w uruchomieniu apoptozy komórek PMN potwierdziły badania McLoughlin i wsp. [25]. Przy użyciu eksperymentalnego modelu zapalenia otrzewnej wykazano, że u myszy *knock-out* z defektem syntezy IL-6 (IL-6 $^{-/-}$ ) lub IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  $^{-/-}$ ), odsetek komórek PMN podlegających apoptozie był o blisko 50% niższy aniżeli u myszy szczepu dzikiego (IL-6 $^{+/+}$ ). Ponowne uruchomienie apoptozy u myszy IFN- $\gamma$  $^{-/-}$ , do poziomu obserwowanego u szczepu dzikiego, nastąpiło dopiero po podaniu białka fuzyjnego HYPER-IL-6. Zawierało ono połączone polipeptydowym linkerem domeny IL-6 i sIL-6R odpowiedzialne za kluczowe funkcje biologiczne. Cechowało się też 100–1000-krotnie wyższą aktywnością w porównaniu z naturalnym kompleksem IL-6/sIL-6R. Pozwoliło to przypuszczać, że aktywny kompleks IL-6/sIL-6R promuje programowaną śmierć leukocytów PMN. Wniosek ten po-



twierdziły kolejne doświadczenia z użyciem naturalnego inhibitora sgp130, którego dootrzewnowe podanie myszom szczepu dzikiego istotnie blokowało aktywację kaspazy-3 nazywanej egzekutorem apoptozy, a ponadto redukowało ilość PMN wchodzących w jej wczesny etap. Dotychczas niewiadomo, czy kompleks IL-6/sIL-6R aktywuje również inne białka uczestniczące w indukcji apoptozy, jak np. białko Bax.

Powyższe obserwacje na temat roli kompleksu IL-6/sIL-6R w promowaniu apoptozy komórek PMN, zachodzącej w trakcie ostrego zapalenia, kontrastują z antyapoptotyczną aktywnością wspomnianego kompleksu w stosunku do komórek jednojądrzastych. Do modelowych przykładów zalicza się mechanizm leżący u podłoża podtrzymywania przewlekłego stanu zapalnego w takich chorobach chronicznych jak choroba Crohna czy RZS. Obejmuje on indukcję przez kompleks IL-6/sIL-6R antyapoptotycznych białek regulatorowych Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> odpowiedzialnych w komórce za utrzymanie integralności błony mitochondrialnej. W konsekwencji wzmożonej ekspresji genów *bcl-2* i *bcl-x*, nadających komórkom fenotyp oporności na apoptozę, dochodzi do szkodliwego nagromadzenia dużej liczby autoreaktywnych limfocytów TCD4<sup>+</sup> oraz TCD8<sup>+</sup> w zmienionej chorobowo tkance [26,27]. Również sama IL-6 uczestniczy w negatywnej regulacji apoptozy limfocytów T poprzez Fas-zależne modulowanie syntezy inhibitorów zarówno początkowego (FLIP) jak i środkowego (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) etapu tego szlaku. Wykazany na podstawie analizy mRNA brak różnic w ekspresji genów kodujących białka proapoptotyczne jak Bax oraz antyapoptotyczne jak Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> sugeruje potranslacyjną regulację tych białek [28]. Chociaż zahamowanie apoptozy przyczynia się do akumulacji komórek T w ognisku zapalnym, nie jest to jedyny mechanizm. Kluczową rolę odgrywają także procesy indukowane przez fibroblasty, szczególnie te z udziałem produkowanego przez nie TGF-β. Prowadzą one do zwiększenia na powierzchni wspomnianych komórek ekspresji receptora chemokinowego CXCR4. Towarzyszy temu równoczesne zwiększenie sekrecji chemokiny SDF-1 z komórek zrębowych. W następstwie interakcji SDF-1 z CXCR4 dochodzi do „przełączania” leukocytów z fenotypu komórek migrujących na fenotyp komórek stacjonarnych, na-

tychmiast po ich wejściu do zmienionej chorobowo tkanki [29]. Zarówno tego zagadnienia, jak i roli wzmagającego żywotność leukocytów IFN-β, z przyczyn ramowych nie uwzględniono przy omawianiu niewłaściwej ich akumulacji. Zdolność kompleksu IL-6/sIL-6R do uruchomienia szlaków biochemicznych, prowadzących zarówno do nasilenia jak i wyciszenia programowanej śmierci w odmiennych populacjach leukocytów, wydaje się odgrywać strategiczną rolę w procesie transycji pomiędzy ostrym a przewlekłym stanem zapalnym. W takim ujęciu przeciwstawne sygnały generowane przez opisywany kompleks w warunkach fizjologicznych indukują apoptozę leukocytów PMN, w stanach chronicznych natomiast zabezpieczają przed tym procesem leukocyty jednojądrzaste.

#### UDZIAŁ KOMPLEKSU IL-6/sIL-6R W PRZEWLEKŁYCH CHOROBYCH ZAPALNYCH

IL-6 wraz z sIL-6R należą do kluczowych regulatorów zapalenia jako procesu fizjologicznego, w którym terminacja reakcji zapalnej obejmuje czasowo ograniczoną transycję z wrodzonej do nabytej odpowiedzi immunologicznej. W tym aspekcie chroniczność takiej reakcji, uwarunkowana po części nadmierną produkcją elementów opisywanego układu, stanowi nieodłączny element patologii wielu chorób. Pomimo odmiennej patogenezy, patofizjologii i kliniki wielu jednostek chorobowych, sekwencja zdarzeń prowadząca do rozwoju zapalenia przewlekłego jest podobna. Procesy patologiczne obejmujące nadmierną aktywację śródbłonna, rekrutację komórek zapalnych przy zaburzonych mechanizmach ich eliminacji oraz rozregulowanie sieci cytokinowej, wpisują się w ogólny schemat zapalenia. Wzmożona aktywność kompleksu IL-6/sIL-6R istotnie przyczynia się do rozwoju wielu przewlekłych chorób, w tym choroby Alzheimerera, RZS, zapalenia kości i stawów, stwardnienia rozsianego, tocznia układowo-rumieniowego, przewlekłych nieswoistych zapaleń jelit, astmy czy przewlekłych zapaleń wątroby [30]. Wybrane dane na ten temat zebrano w tabeli 1. Ponieważ najbardziej zaawansowane badania kliniczne potwierdzają udział IL-6 i sIL-6R w patogenezie chorób reumatoidalnych oraz nieswoistych zapaleń jelit, tym schorzeniom poświęcono szczególną uwagę.

Tabela 1. Udział IL6 i sIL-6R w zaostrzeniach wybranych przewlekłych chorób zapalnych.

Schorzenie	IL-6/sIL6R	Literatura
RZS	surowiczy poziom IL-6 i sIL-6R jest istotnie wyższy u pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej i koreluje z aktywną postacią choroby	[53,54]
choroba Stilla	istotnie podwyższony poziom IL-6i sIL-6R jest skorelowany z zaostrzeniem choroby	[36,37]
choroba Crohna	podwyższony poziom IL-6/sIL-6R oraz deficyt sgp130 wykryto w surowicy oraz w tkance jelita, podczas aktywnej postaci choroby; udział w patogenezie	[55,56]
WZJG	udowodniono związek pomiędzy wzrostem stężenia IL-6 i sIL-6R a patogenezą	[47,48]
choroba Gravesa-Basedova	zaobserwowano znacząco podwyższone surowicze stężenia IL-6 i sIL-6R w porównaniu do kontroli	[57]
sarkoidoza	wykazano zwiększony poziom systemowego i lokalnego stężenia sIL-6R w trakcie śródmiąższowego zapalenia płuc	[58]
układowa skleroderma	poziom sIL-6R koreluje z ciężkością zwłóknienia płuc towarzyszącego chorobie	[59]
stwardnienie rozsiane	istotnie wyższe stężenie sIL-6R i sgp130 w surowicy oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym koreluje z ciężką fazą choroby	[60,61]

Szeroko udokumentowano udział kompleksu IL-6/sIL-6R w patomechanizmach leżących u podłoża rozwoju uogólnionych chorób tkanki łącznej, takich jak RZS oraz choroba Still'a (układowa postać młodzieńczego przewlekłego zapalenia stawów). W ich przebiegu dochodzi do niszczenia struktur stawowych i okołostawowych, z możliwością powikłań narządowych. Obie choroby mają podłoże immunologiczne. Cechuje je nadmierna akumulacja autoreaktywnych klonów limfocytów T oraz makrofagów w płynie maziowym torebek stawowych. Przyczyny dominującego tropizmu tkankowego charakteryzującego konkretną reakcję zapalną oraz etiopatogeneza prowadząca do jej powstania, pozostają niejasne [31]. Bezsponna jest rola IL-6 w tzw. eksperymentalnie indukowanych chorobach autoimmunologicznych, a mianowicie w zapaleniach stawów indukowanych antygenem bądź kolagenem typu II [32-34]. Udowodniony został również udział jej receptorowego kompleksu w spontanicznie powstającej chorobie autoimmunologicznej. U mysich mutantów, substytucja tyrozyny fenyloalaniną w receptorze gp130 w pozycji 759 – współtworzącej miejsce wiązania fosfatazy SHP2 – prowadziła do rozwoju zapalenia stawów na tle autoimmunologicznym. Procesowi towarzyszyła produkcja autoprzeciwciał oraz akumulacja zaktywowanych limfocytów T. Była ona wynikiem wzmożonego zahamowania apoptozy w obecności IL-6. Tak więc punktowa mutacja receptora cytokinowego należącego do układu IL-6, spontanicznie uruchamiała proces chorobowy [35].

Udział sIL-6R wraz z IL-6 w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów dowiedziono w oparciu o: a) pozytywną korelację pomiędzy zwiększonym stężeniem sIL-6R i IL-6 w płynie maziowym a ciężkim stopniem destrukcji stawów, b) większą odporność myszy z delecją w genie kodującym IL-6 na zapalenie, w mysim modelu zapalenia stawów – cechował ją zarówno defekt syntezy MCP-1 jak i rekrutacji leukocytów jednojądrzastych wyposażonych w receptor CCR2, tym samym nie dochodziło do progresji choroby, c) klinicznie istotną redukcję stanu zapalnego po zastosowaniu naturalnego antagonisty sgp130 lub przeciwciał neutralizujących, specyficznych względem IL-6 i/lub IL-6R, d) indukowaną przez IL-6 i sIL-6R sekrecję 3-kolagenazy przez osteoblasty, prowadzącą do degradacji macierzy budującej kości, e) indukcję syntezy antyapoptotycznych białek regulatorowych Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> [15,30].

Równie dobitnie efekty prozapalnych działań IL-6/sIL-6R widoczne są w chorobie Still'a nazywanej też „chorobą zależną od sIL-6R” [30]. Kliniczne objawy tej choroby takie jak wysoka gorączka, wysypka, trombocytoza, leukocytoza czy hepatosplenomegalia, stanowią niemal idealne odzwierciedlenie symptomów wywoływanych przez IL-6, które cechują bardzo silną reakcję ostrej fazy. Podobnie jak w przypadku RZS, nadmierna produkcja IL-6 oraz sIL-6R jest skorelowana pozytywnie z aktywną postacią choroby, w tym ze stopniem natężenia objawów stawowych, ustępuje zaś podczas jej remisji [36,37]. Znałe są genetycznie uwarunkowane różnice w odpowiedzi IL-6 na liczne bodźce zapalne. W sekwencji promotoro-

wej genu kodującego IL-6 stwierdzono istnienie polimorfizmu punktowego G/C. Obecność guaniny w pozycji -174, warunkując silniejszą ekspresję IL-6 sprzyja wystąpieniu choroby. Z kolei allel niosący cytozynę (-174C) wydaje się zmniejszać to ryzyko. Wykazano statystycznie istotnie niższą częstość występowania wariantu genu (-174C) w populacji dzieci chorych w porównaniu ze zdrowymi [38,39].

Konwencjonalne metody stosowane w terapii chorób reumatoidalnych niekiedy są mało skuteczne [40]. W takich przypadkach, jeśli jest to możliwe, do leczenia wprowadza się immunomodulację. Wiąże się to z poszukiwaniem nowych, skutecznych czynników terapeutycznych, szczególnie wśród antagonistów receptorów interleukinowych, których ligandy są kluczowe dla rozwoju procesu zapalnego. Głównym, a zarazem realnym celem współczesnych terapii, jest minimalizacja lub eliminacja klinicznych objawów choroby. Na listę już istniejących antagonistów TNF- $\alpha$  czy IL-1, o ugruntowanej pozycji terapeutycznej [31], ostatnio wpisano także monoklonalne przeciwciała specyficzne względem zarówno błonowej jak i rozpuszczalnej formy receptora IL-6R. Są to wysokiej jakości chimeryczne przeciwciała o słabej immunogenności, działające jako inhibitory kompetycyjne. Jak celny był to wybór świadczy fakt, iż po wielce obiecujących badaniach podstawowych, zastosowano je w badaniach klinicznych. W latach 2001-2002 w Japonii oraz Europie przeprowadzone zostały randomizowane badania kliniczne I i II fazy z zastosowaniem odpowiednio dobranych prób kontrolnych oraz *placebo*. Objęto nimi odpowiednio 164 i 359 pacjentów z RZS słabo podatnych na standardowe metody leczenia. Po trzymiesięcznej terapii w obydwu grupach u ponad 50% pacjentów zaobserwowano remisję. Jej kryterium było osiągnięcie co najmniej 20% poprawy głównych wskaźników chorobowych (klinicznych oraz laboratoryjnych), zdefiniowanych przez Amerykańskie Towarzystwo Reumatologiczne. Dotychczasowe badania kliniczne potwierdziły skuteczność stosowania przeciwciał anti-IL-6R w terapii RZS. Wykazały również brak istotnych działań niepożądanych [41-43]. Jeszcze lepsze efekty terapeutyczne zaobserwowano w trakcie najnowszych badań klinicznych u dzieci cierpiących na chorobę Still'a, „oporną” na długotrwałą kortykoterapię. Dostarczyły one kolejnych dowodów, iż zablokowanie procesu konwersji receptorów przy udziale opisanych przeciwciał monoklonalnych prowadzi do znacznego złagodzenia objawów chorobowych [44-46].

#### IL-6/sIL-6R W NIESWOISTYCH ZAPALENIACH JELIT

Równie dobitnie udział kompleksu IL-6/sIL-6R został potwierdzony w przewlekłych zapalnych chorobach jelit o wieloczynnikowej etiologii. Choroba Crohna (zapalenie dotyczy jelita krętego, okrężnicy, czasem cienkiego) oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) reprezentują heterogenną grupę fenotypowo podobnych zaburzeń. Etiopatogeneza wspomnianych jednostek chorobowych obejmuje nadreaktywność układu immunologicznego w stosunku do mikroflory jelitowej, czemu towarzyszy zwiększone wytwarzanie prozapalnych cytokin. W wyniku toczącego się procesu zapalnego w ścianie jelita, docho-

dzi do uszkodzenia funkcjonowania bariery śluzówkowej. Efektem tego są powstające zmiany patologiczne o charakterze nieciągłym (choroba Crohna) lub ciągłym (WZJG). Limfocyty T, w blaszce właściwej jelita objętego procesem zapalnym, produkują znaczne ilości IL-6 i sIL-6R. Jest to istotnie skorelowane z aktywnością choroby [47]. Kluczowym czynnikiem w zaostrej fazie choroby Crohna oraz WZJG jest oporność autoreaktywnych limfocytów TCD4<sup>+</sup> oraz TCD8<sup>+</sup> na apoptozę. Jest to konsekwencja aktywacji przez kompleks IL-6/sIL-6R czynnika STAT3 i dalej zależnego od niego zwiększenia ekspresji antyapoptotycznych genów *bcl-2* i *bcl-x* [48]. Niedawno zostały przeprowadzone pierwsze pilotażowe, randomizowane i kontrolowane badania, w których wdrożenie do leczenia aktywnej postaci choroby Crohna przeciwciał anty-IL-6R, przyniosło wymierne korzyści terapeutyczne poprzez normalizację objawów klinicznych oraz markerów laboratoryjnych, w tym również markerów badanego układu [49].

#### UWAGI KOŃCOWE

Kompleks IL-6/sIL-6R należy do jednego z głównych czynników uczestniczących w transformacji odpowiedzi zapalnej. Jego wzmożona aktywność jest silnie skorelowana z zaostreniem wielu przewlekłych chorób. Niezaprzeczalny kliniczny sukces terapii opartych na jego neutralizacji, z wykorzystaniem przeciwciał anty-IL-6R, zachęca do kontynuacji podjętej strategii leczenia tego typu schorzeń. Dodatkowym rozwiązaniem może być neutralizacja wspomnianego kompleksu przez sgp 130. Jej pomyslny rezultat, na razie u myszy z zapaleniem stawów, pozwalają przypuszczać, że również ta forma blokowania sIL-6R byłaby skuteczną bronią w walce z podobnymi schorzeniami [50].

Warto jednakże pamiętać, iż nieprzemysłana ingerencja w układ o tak ogromnym potencjale biologicznym jest bardzo ryzykowna. Pewnym ostrzeżeniem niech będzie fakt, że stosowanie analogicznych blokerów, np. dla TNF- $\alpha$ , zwiększa ryzyko wystąpienia infekcji wirusowych, bakteryjnych oraz grzybiczych. Szczególnie niebezpieczne są stwierdzone przypadki uaktywnienia się latentnych zakażeń wywoływanych przez wewnątrzkomórkowe patogeny z gatunku *Mycobacterium tuberculosis* [51] czy *Listeria monocytogenes* [52].

#### PIŚMIENNICTWO

1. Tchórzewski H (1998) Regulacja odczynu zapalnego, W: Tchórzewski H (red) Zapalenie, patofizjologia i klinika. Wydawnictwo Medyczne Medpress, Warszawa, str. 13-37
2. VanArsdel PP (1992) Acute inflammatory reaction, W: Roitt IM, Delves PJ (red) Encyclopedia of Immunology, t I. Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, str. 15-16
3. Bravo J, Heath JK (2000) Receptor recognition by gp130 cytokines. EMBO J 19: 2399-2411
4. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T (2003) IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. Rev Physiol Biochem Pharmacol 149: 1-38
5. Ernst M, Jenkins BJ (2004) Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. Trends Genet 20: 23-32
6. Somers W, Stahl M, Seehra JS (1997) 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. EMBO J 16: 987-997

7. Chow D, He X, Snow AL, Rose-John S, Garcia KC (2001) Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex. Science 291: 2150-2155
8. Montero-Julian FA (2001) The soluble IL-6 receptors: serum levels and biological function. Cell Mol Biol 47: 583-597
9. Jones SA, Rose-John S (2002) The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. Biochem Biophys Acta 1592: 251-263
10. Jones SA, Horiuchi S, Novick D, Yamamoto N, Fuller GM (1998) Shedding of the soluble IL-6 receptor is triggered by Ca<sup>2+</sup> mobilization, while basal release is predominantly the product of differential mRNA splicing in THP-1 cells. Eur J Immunol 28: 3514-3522
11. Marin V, Montero-Julian FA, Gres S, Boulay V, Bongrand P, Farnarier C, Kaplanski G (2001) The IL-6-soluble IL-6R $\alpha$  autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. J Immunol 167: 3435-3442
12. Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, Yancopoulos GD, Taga T, Kishimoto T (1993) Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. Blood 82: 1120-1126
13. Tanaka M, Kishimura M, Ozaki S, Osakada F, Hasjimoto H, Okubo M, Murakami M, Nakao K (2000) Cloning of novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis. J Clin Invest 106: 137-144
14. Heinrich P, Behrmann I, Haan S, Hermans HM, Muller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. Biochem J 374 (Pt1): 1-20
15. Jones SA, Richards PJ, Scheller J, Rose-John S (2005) IL-6 transsignaling: the *in vivo* consequences. J Interferon Cytokine Res 25: 241-253
16. Hirano T (1999) Molecular basis underlying functional pleiotropy of cytokines and growth factor. Biochem Biophys Res Commun 260: 303-308
17. Jostock T, Müllberg J, Özbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, Fischer M, Neurath MF, Rose-John S (2001) Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble IL-6R transsignaling responses. Eur J Biochem 268: 160-167
18. Müller-Newen G, Küster A, Hemmann U, Keul R, Horsten U, Martens A, Graeve L, Wijdens J, Heinrich PC (1998) Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses. J Immunol 161:6347-6355
19. Rose-John S, Neurath MF (2004) IL-6 trans-Signaling: the heat is on. Immunity 20: 2-4
20. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA (2001) IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. Immunity 14: 705-714
21. McLoughlin RM, Hurst SM, Nowell MA, Harris DA, Horiuchi S, Morgan LW, Wilkinson TS, Yamamoto N, Topley N, Jones SA (2004) Differential regulation of neutrophil-activating chemokines by IL-6 and its soluble receptor isoforms. J Immunol 172: 5676-5683
22. Lindemann SW, Yost ChC, Denis MM, McIntyre TM, Weyrich AS, Zimmerman GA (2004) Neutrophils alter the inflammatory milieu by signal-dependent translation of constitutive messenger RNAs. PNAS 101: 7076-7081
23. Chen Q, Wang WCh, Bruce R, Li H, Schleider DM, Mulbury MJ, Bain MD, Wallace PK, Baumann H, Evans SS (2004) Central role of IL-6 receptor signal-transducing chain gp130 in activation of L-selectin adhesion by fever-range thermal stress. Immunity 20: 59-70
24. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C (2003) IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. TRENDS Immunol 24: 25-29.
25. McLoughlin RM, Witowski J, Robson RL, Wilkinson TS, Hurst SM, Williams AS, Williams JD, Rose-John S, Jones SA, Topley N (2003) Interplay between IFN- $\gamma$  and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. J Clin Invest 112: 598-607

26. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock S, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand J, Czaja J, Schlaak JS, Lehr HA, Autschbach F, Schurmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF (2000) Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn disease and experimental colitis *in vivo*. *Nat Med* 6: 583-588
27. Narimatsu M, Maeda H, Itoh S, Atsumi T, Ohtani T, Nishida K, Itoh M, Kamimura D, Park K, Mizuno K, Miyazaki J, Hibi M, Ishihara K, Nakajima K, Hirano T (2001) Tissue-specific autoregulation of the *stat3* gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T cells. *Mol Cell Biol* 21: 6615-6625
28. Kovalovich K, Li W, DeAngelis R, Greenbaum LE, Ciliberto G, Taub R (2001) Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, Bcl-xL. *J Biol Chem* 276: 26605-26613
29. Buckley ChD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M (2001) Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol* 22: 199-204
30. Kallen KJ (2002) The role of transsignalling *via* the agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases. *Biochem Biophys Acta* 1592: 323-343
31. Taylor PC, Feldmann M (2004) New approaches to therapeutic immunomodulation for immune-mediated disorders. *Curr Opin Pharmacol* 4: 368-371
32. Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, De Benedetti F, Poli V, Ciliberto G (1998) Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med* 187: 461-468
33. Sasai M, Saeki Y, Ohshima S, Nishioka K, Mima T, Tanaka T, Katada Y, Yoshizaki K, Suemura M, Kishimoto T (1999) Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice. *Arthritis Rheum* 42: 1635-1643
34. Ohshima S, Saeki Y, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Nomura S, Kopf M, Katada Y, Tanaka T, Suemura M, Kishimoto T (1998) Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8222-8226
35. Atsumi T, Ishihara K, Kamimura D, Ikushima H, Ohtani T, Hirota S, Kobayashi H, Park S-J, Saeki Y, Kitamura Y, Hirano T (2002) A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J Exp Med* 196: 979-990
36. Keul R, Heinrich PC, Müller-Newen G, Müller K, Woo P (1998) A possible role for soluble IL-6-receptor in the pathogenesis of systemic onset juvenile chronic arthritis. *Cytokine* 10: 729-734
37. De Benedetti F, Massa M, Robbioni P, Ravelli A, Burgio GR, Martini A (1991) Correlation of serum interleukin-6 levels with joint involvement and thrombocytosis in systemic juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 34: 1158-1163
38. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102: 1369-1376
39. Ogilvie EM, Fife MS, Thompson SD, Twine N, Tsoras M, Moroldo M, Fisher SA, Lewis CM, Prieur A-M, Glass DN, Woo P (2003) The -174G allele of the interleukin-6 gene confers susceptibility to systemic arthritis in children: a multicenter study using simplex and multiplex juvenile idiopathic arthritis families. *Arthritis Rheum* 48: 3202-3206
40. Nishimoto N, Kishimoto T (2004) Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol* 4: 386-391
41. Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T (2004) Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody – a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 50: 1761-1769
42. Maini RN, Taylor PC, Pavelka K, Emery P, Szechiński J, Balint G, Broll J, CHARISMA study group (2003) Efficacy of IL-6 receptor antagonist MIRA in rheumatoid arthritis patients with an incomplete response to methotrexate (CHARISMA). *Arthritis Rheum* 48 (suppl): S652:1704
43. Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda K, Kuritani T, Deguchi H, Sato B, Imai N, Suemura M, Kakehi T, Takagi N (2003) Toxicity, pharmacokinetics, and dose finding study of repetitive treatment with humanized anti-interleukin 6 receptor antibody, MRA, in rheumatoid arthritis – Phase I/II clinical study. *J Rheumatol* 30: 1426-1435
44. Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, Iwata N, Katakura S, Mori M, Woo P, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T (2005) Therapeutic efficacy of humanized recombinant anti-interleukin-6 receptor antibody in children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 52: 687-693
45. Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, Katakura S, Kurosawa R, Mori M (2005) Clinical study of tocilizumab in children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 28: 231-238
46. Woo P, Wilkinson N, Prieur A-M, Southwood T, Leone V, Livermore P, Wythe H, Thomson D, Kishimoto T (2005) Open label phase II trial of single, ascending dose of MRA in Caucasian children with severe systemic juvenile idiopathic arthritis: proof of principle of the efficacy of IL-6 receptor blockade in this type of arthritis and demonstration of prolonged clinical improvement. *Arthritis Res & Therapy* 7: R1281-R1288
47. Hosokawa T, Kusugami K, Ina K, Ando T, Shinoda M, Imada A, Ohsuga M, Sakai T, Matsuura T, Ito K, Kaneshiro K (1999) Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in the colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 14: 987-996
48. Atreya R, Neurath MF (2005) Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Rev Allergy Immunol* 28: 187-196
49. Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, Hibi T, Kusugami K, Andoh A, Matsu-moto T, Yamamura T, Azuma J, Nishimoto N (2004) A pilot randomized trial of human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 126: 989-996
50. Nowell MA, Richards PJ, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Topley N, Williams AS, Jones SA (2003) Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. *J Immunol* 171: 3202-3209
51. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwie-terman WD, Siegel JN, Braun MM (2001) Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 345: 1098-1104
52. Slifman NR, Gershon SK, Lee JH, Edwards ET, Braun MM (2003) Listeria monocytogenes infection as a complication of treatment with tumor necrosis factor alpha-neutralizing agents. *Arthritis Rheum* 48: 319-324
53. Polgar A, Brozik M, Toth S, Holub M, Hegyi K, Kadar A, Hodinka L, Falus A (2000) Soluble interleukin-6 receptor in plasma and in lymphocyte culture supernatants of healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit* 6: 13-18
54. Klimiuk PA, Sierakowski S, Latosiewicz R, Cylwik JP, Cylwik B, Skowroński J, Chwiecko J (2003) Interleukin-6, soluble interleukin-2 receptor and soluble interleukin-6 receptor in the sera of patients with different histological patterns of rheumatoid synovitis. *Clin Exp Rheumatol* 21: 63-69
55. Ito H (2003) IL-6 and Crohn's disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2: 125-30
56. Gustot T, Lemmers A, Louis E, Nicaise C, Quertinmont E, Belaiche J, Roland S, Van Gossum A, Deviere J, Franchimont D (2005) Profile of soluble cytokine receptors in Crohn's disease. *Gut* 54: 488-495
57. Bossowski A, Urban M (2001) Serum levels of cytokines in children and adolescents with Graves' disease and non-toxic nodular goiter. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14: 741-747
58. Yokoyama A, Kohno N, Hirasawa Y, Kondo K, Abe M, Inoue Y, Fujioka S, Fujino S, Ishida S, Hiwada K (1995) Evaluation of soluble IL-6-receptor concentration in serum and epithelial lining from patients with interstitial lung diseases. *Clin Exp Immunol* 100: 325-329
59. Hasegawa M, Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Kikuchi K, Takehara K (1998) Serum levels of interleukin 6 (IL-6), oncostatin M, soluble IL-6 recep-

tor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 25: 308-313

60. Padberg F, Feneberg W, Schmidt S, Schwarz MJ, Korschenhausen D, Greenberg BD, Nolde T, Muller N, Trapmann H, Konig N, Moller HJ, Hampel H (1999) CSF and serum levels of soluble interleukin-6 recep-

tors (sIL-6R and sgp130), but not of interleukin-6 are altered in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 99: 218-223

61. Stelmasiak Z, Koziol-Montewska M, Dobosz B, Rejdak K (2001) IL-6 and sIL-6R concentration in the cerebrospinal fluid and serum of MS patients. *Med Sci Monit* 7: 914-918

## The role of IL-6/sIL-6R complex and its natural inhibitor sgp130 in modulation of inflammatory process

Daria Augustyniak<sup>1,✉</sup>, Grażyna Majkowska-Skrobek<sup>1</sup>, Barbara Basiewicz-Worsztynowicz<sup>2</sup>, Adam Jankowski<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Immunology Unit, Department of Microbiology, Institute of Genetics and Microbiology, Wrocław University, 63/77 Przybyszewskiego St., 51-148 Wrocław, Poland

<sup>2</sup>Department of Pediatric Propedeutics and Division of Children's Immunology and Rheumatology, Medical Academy of Wrocław, 64/66 Kasprowicza St., 51-137 Wrocław, Poland

✉e-mail: august@microb.uni.wroc.pl

**Key words:** IL-6/sIL6R complex, sgp130, receptor conversion, inflammation, infiltration, apoptosis, chemokines

### ABSTRACT

IL-6/sIL-6R complex belongs to one of the most pleiotropic ligand-receptor system. Participating in leukocytes migration and apoptosis it plays a crucial role in modulation of inflammatory process. Firstly it contributes to resolution of acute inflammatory response regulating a maintaining of organism's homeostasis. Secondly it is a main factor responsible for transition between acute and chronic inflammatory reaction, that underlies the pathogenesis of chronic inflammatory diseases. Presented work focus on the IL-6/sIL-6R structure, function, formation, mechanism of action as well as the role of its natural inhibitor sgp130 in mentioned processes.

ZARZĄD GŁÓWNY POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO NA POSIEDZENIU W DNIU 31 MAJA 2006 ROKU PRZYznał DOROCZNA NAGRODĘ IM. JAKUBA KAROLA PARNASA ZA NAJLEPSZĄ PRACĘ Z ZAKRESU BIOCHEMII WYKONANĄ W POLSKIM LABORATORIUM W ROKU POPRZEDNIM ZA PUBLIKACJĘ:

Michalska K, Brzeziński K, Jaskólski M (2005) Crystal structure of isoaspartyl aminopeptidase in complex with L-aspartate. *Journal of Biological Chemistry* 280, 28484-28491.

Jednocześnie Zarząd Główny postanowił wyróżnić następujące dziewięć publikacji jako wybitne prace wykonane w polskich laboratoriach w 2006 roku:

1. Speina E, Arczewska KD, Gackowski D, Zielińska M, Siomek A, Kowalewski J, Oliński R, Tudek B, Kuśmerek JT (2005) Contribution of hMTH1 to the maintenance of 8-oxoguanine levels in lung DNA of non-small-cell lung cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute* 97, 384-395.
2. Napierała M, Michałowski D, de Mezer M, Krzyżosiak WJ (2005) Facile FMR1 mRNA structure regulation by interruptions in CGG repeats. *Nucleic Acids Research* 33, 451-463.
3. Jarzab B, Wiench M, Fajarewicz K, Simek K, Jarzab M, Oczko-Wojciechowska M, Włoch J, Czarniecka A, Chmielik E, Lange D, Pawlaczek A, Szpak S, Gubała E, Świerniak A (2005) Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. *Cancer Research* 65, 1587-1597.
4. Śliwa P, Korona R (2005) Loss of dispensable genes is not adaptive in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 17670-17674.
5. Pawlak SD, Radlińska M, Chmiel AA, Bujnicki JM, Skowronek KJ (2005) Inference of relationships in the 'twilight zone' of homology using a combination of bioinformatics and site-directed mutagenesis: a case study of restriction endonucleases Bsp6I and PvuII. *Nucleic Acids Research* 33, 661-671.
6. Dutkiewicz M, Ciesiołka J (2005) Structural characterization of the highly conserved 98-base sequence at the 3' end of HCV RNA genome and the complementary sequence located at the 5' end of the replicative viral strand. *Nucleic Acids Research* 33, 693-703.
7. Zaim J, Speina E, Kierzek AM (2005) Identification of new genes regulated by the Crt1 transcription factor, an effector of the DNA damage checkpoint pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 28-37.
8. Matuszewska M, Kuczyńska-Wiśnik D, Laskowska E, Liberek K (2005) The small heat shock protein IbpA of *Escherichia coli* cooperates with IbpB in stabilization of thermally aggregated proteins in a disaggregation competent state. *Journal of Biological Chemistry* 280, 12292-12298.
9. Zabłocki K, Szczepanowska J, Duszyński J (2005) Extracellular pH modifies mitochondrial control of capacitative calcium entry in Jurkat cells. *Journal of Biological Chemistry* 280, 3516-3521.

Krystyna Dzierzbicka<sup>✉</sup>

Aleksander M. Kołodziejczyk

Katedra Chemii Organicznej, Politechnika Gdańska, Gdańsk

<sup>✉</sup>Katedra Chemii Organicznej, Politechnika Gdańska, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk; e-mail: kd@chem.pg.gda.pl, tel. (058) 347-27-36

Artykuł otrzymano 11 sierpnia 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 13 września 2005 r.

**Słowa kluczowe:** adiuwenty, immunostymulatory, szczepionki

**Wykaz skrótów:** ADCC (ang. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) – cytotoksyczność zależna od przeciwciał; APC (ang. *antigen presenting cell*) – komórka prezentująca antygen; CD (ang. *cluster of differentiation*) – kompleks różnicowania (symbolem i odpowiednią cyfrą oznaczone są struktury powierzchniowe komórek, głównie leukocytów); CTL (ang. *cytotoxic T lymphocyte*) – cytotoksyczne limfocyty T; DTH (ang. *delayed type hypersensitivity*) – nadwrażliwość typu późnego; GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów; IFN – interferon; IL – interleukina; MHC (ang. *major histocompatibility complex*) – główny układ zgodności tkankowej; Pam<sub>3</sub>Cys – S-[(R/S)-2,3-dipalmitoiloksy-propylo]-N-palmitoil-(R)-cysteina; PAMP (ang. *pathogen associated molecular patterns*) – molekularne wzorce związane z patogenami; PRR (ang. *pattern recognition receptor*) – receptory rozpoznające wzorce (receptory dla PAMP); Th (ang. *T helper*) – pomocnicze limfocyty T; TLR (ang. *Toll-like receptors*) – receptory Toll-podobne; TNF (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworów.

## STRESZCZENIE

Wartykule opisano adiuwenty, czyli chemiczne związki dodawane do szczepionek w celu pobudzenia lub zwiększenia reakcji immunologicznej organizmu. Nowe szczepionki budowane na bazie rekombinowanych protein i DNA, mimo że bardziej bezpieczne niż szczepionki tradycyjne, są jednak mniej immunogenne, a tym samym mniej aktywne. Dlatego też trwa poszukiwanie doskonalszych adiuwantów. Adiuwenty można podzielić na dwie grupy: działające jako systemy podawania szczepionek (np. emulsje, mikrocząsteczki, liposomy, kompleks ISCOMs) oraz immunostymulujące (np. lipopolisacharydy, monofosforyl lipidu A, CpG DNA, muramyllopeptydy). Skuteczniejsze i bezpieczniejsze adiuwenty udoskonala nie tylko szczepionki profilaktyczne, ale również umożliwią wprowadzenie szczepionek terapeutycznych, pomocnych w leczeniu przewlekłych chorób infekcyjnych (np. HSV, HIV, HCV, HBV, HPV czy *Helicobacter pylori*) i nieinfekcyjnych, takich jak cukrzyca insulinozależna, stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów, alergia czy nowotwory.

## WPROWADZENIE

Trudno wyobrazić sobie współczesną medycynę bez szczepionek uodparniających, czyli preparatów zawierających substancje zdolne do indukowania i stymulowania procesów immunologicznych, prowadzących do wytworzenia trwałej odporności na infekcję [1]. To dzięki nim udało się całkowicie wyeliminować lub znacznie ograniczyć takie choroby jak ospa, paraliż dziecięcy, odra, błonica, tężec, dur brzuszny i wiele innych. Niestety nadal zagrożenie stanowią malaria, gruźlica, krztusiec, a także nieznanne do niedawna groźne patogeny, m. in. grupa wirusów gorączki krwotocznej, wirusy *Herpes* 6 i 8 czy HIV, na które nie ma skutecznych sposobów zwalczania [1]. Wydaje się, że tylko poprzez skuteczne szczepionki uda się je ograniczyć lub nawet wyeliminować.

Szczepionką może być preparat biologiczny lub syntetyczny. Podstawowym jej składnikiem są tzw. antygeny, czyli nieżywe lub żywe ale atenuowane lub inaktywowane bakterie, wirusy, czy też pasożyty, a nawet ich fragmenty. Uaktywniają one układ odpornościowy organizmu, a tym samym wzmacniają jego zdolności do zwalczania niebezpiecznych infekcji. Organizm zapamiętuje antygeny zawarte w szczepionce, nawet jeżeli występują w formie osłabionej lub tylko fragmentów i w przypadku późniejszej „rzeczywistej” infekcji szybko uaktywnia układ immunologiczny już w początkowej fazie zakażenia i podobnie jak po przebytej chorobie zakaźnej, uzyskuje się często trwałe uodpornienie. Szczepionki niosą z sobą również realne zagrożenie, ponieważ mikroorganizmy, w tym nieżywe, a nawet ich fragmenty mogą być niebezpieczne dla organizmu gospodarza, między innymi dlatego, że zawierają obce białko, zdolne do wywołania wstrząsu anafilaktycznego. Tej wady pozbawione są szczepionki nowej generacji, w których stosuje się syntetyczne antygeny, najczęściej peptydy, identyczne z naturalnymi determinantami antygenowymi mikroorganizmów chorobotwórczych. Szczepionki te chociaż zapewniają najwyższy poziom bezpieczeństwa, gdyż nie zawierają zanieczyszczeń biologicznych i selektywnie stymulują odpowiedź immunologiczną, są jednak nisko immunogenne, tzn. wywołują słabą odpowiedź odpornościową organizmu. Ich skuteczność podnoszą adiuwenty [1-7]. Termin adiuwant pochodzi od łacińskiego słowa *adiuvare* (pomagać) i w medycynie oznacza preparat, który jest zdolny do zwiększenia humoralnej i/lub komórkowej odpowiedzi immunologicznej na dany antygen. Odkrycie adiuwantów datuje się na lata 1925-1926, kiedy to Ramon [8,9] wykazał, że reakcja immunologiczna na tężec i błonicę została zwiększona dzięki wstrzyknięciu tych szczepionek razem z takimi składnikami, jak agar, tapioka, lecytyna, a nawet okruszki chleba. W 1926 roku Glenny [10] opisał adiuwantową aktywność związków glinu i zastosowanie ich w szczepionce przeciw błonicy. Adiuwenty glinowe szybko znalazły szerokie zastosowanie. W 1930 roku Freund [11] zaobserwował, że nieżywe prątki mykobakterii (najczęściej *Mycobacterium tuberculosis*) zawieszane w emulsji wodno-olejowej silnie wzmagają odpowiedź immunologiczną. Preparat ten nazwany *kompletnym adiuwantem Freund'a* (FCA), należy

do najsilniej działających adiuwantów, ma jednak ograniczone zastosowanie kliniczne, ponieważ wywołuje szkodliwe skutki uboczne w organizmie człowieka. Natomiast, słabiej działający *niekompletny adiuwant Freund* (FIA), czyli emulsja oleju w wodzie, bez prątków mykobakterii, wchodzi w skład szczepionki przeciwko grypie oraz w testowanych klinicznie szczepionkach przeciw infekcji HIV. W 1956 roku Johnston odkrył adiuwantową aktywność endotoksyn z bakterii Gram-ujemnych [12], a w 1974 roku Ellouz i wsp. zidentyfikowali muramylodipeptyd (MDP), najmniejszy, adiuwantowo-aktywny składnik mykobakterii [13].

Jednak klinicyści nadal nie dysponują uniwersalnym, bezpiecznym adiuwantem i dlatego dalej poszukuje się nowych adiuwantów zarówno wśród substancji pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznych. Badania prowadzone na modelach zwierzęcych wykazały, że wiele z nich jest bardziej skutecznych niż obecnie najczęściej stosowane adiuwanty glinowe. Poddawane są one intensywnym badaniom przedklinicznym, zapoczątkowano również próby kliniczne z ich udziałem [4-7,14-18].

## PODZIAŁ ADIUWANTÓW

W tabeli 1 przedstawiono adiuwanty, które znalazły zastosowanie w terapii lub są poddawane intensywnym badaniom pod kątem przydatności ich w szczepionkach dla ludzi.

### ADIUWANTY TYPU ŻELI

Związki glinu, fosforan lub wodorotlenek oraz fosforan wapnia są od kilkudziesięciu lat najczęściej stosowanymi

Tabela 1. Podział adiuwantów

Adiuwanty typu żeli	Wodorotlenek glinu, fosforan glinu, fosforan wapnia
Adiuwanty bakteryjne	Endotoksyny* monofosforylo lipid A Ektotoksyny** toksyna cholery toksyna ciepłochwiejna <i>E. coli</i> toksyna krztuścia (koklusz) DNA motywy CpG
Adiuwanty na bazie emulsji olejowej i środków emulgujących	IFA ( <i>Niekompletny adiuwant Freund</i> ) SAF ( <i>Syntex adjuvant formulation</i> ) MF59, AS02
Adiuwanty specyficzne	Liposomy Saponiny Niejonowy blok kopolimerów (CRL 1005, <i>Pluronic L121</i> ) Immunostymulatorowe kompleksy (ISCOMs) Cytokiny
Adiuwanty syntetyczne	Muramylodipeptyd i jego analogi Polinukleotydy (Poly rA:Poly rU), Polimery [acetylowana polimannoza ( <i>Acemannan</i> ), sulfolipopolisacharyd polimetylometakrylanu (PMMA), polifosfazeny ( <i>Admumer</i> ), β-glukan ( <i>Pleuran</i> , <i>Algal Glucan</i> )]

\*Endotoksyny – lipopolisacharydowe, toksyczne produkty bakteryjne stanowiące składnik ściany komórkowej, szczególnie bakterii Gram-ujemnych. \*\*Ektotoksyny – białkowe, toksyczne produkty bakteryjne (np. toksyna błonicza, toksyna tężcowa).

adiuwantami w szczepionkach dla ludzi [1]. W badaniach eksperymentalnych znajduje się wodorotlenek berylu. Związki glinu są składnikami szczepionek zarejestrowanych w Ameryce Północnej, np. w szczepionce DPT (błonica-krztusiec-tężec), natomiast fosforan wapnia stosowany jest głównie we Francji jako adiuwant w szczepionkach przeciwko błonicy, krztuścowi, polio, gruźlicy, żółtej febrze, odrze i zapaleniu wątroby typu B. Szczepionki zawierające roztwór antygeny zmieszany z wodorotlenkiem lub fosforanem glinu są trudne do otrzymania w powtarzalny sposób, co powoduje, że poszczególne serie tej samej szczepionki różnią się od siebie. W celu ich standaryzacji wprowadzono specjalną procedurę przygotowania wodorotlenku glinu [2]. Mechanizm działania związków glinu nie został do tej pory wyjaśniony. Stwierdzono, że związki te wywołują miejscowy odczyn zapalny i mogą wywierać bezpośredni wpływ na limfocyty, makrofagi oraz monocyty człowieka i promować uwalnianie IL-4 [1-7,19].

### ADIUWANTY BAKTERYJNE

Ściany komórkowe mikroorganizmów stanowią zewnętrzna warstwę komórek infekujących i przeciwko nim organizm skierowuje pierwsze akcje obronne. Znalaziono w nich liczne struktury stymulujące układ immunologiczny, np. lipopolisacharydy (LPS), lipid A (składnik LPS), muramylodipeptydy oraz lipopeptydy.

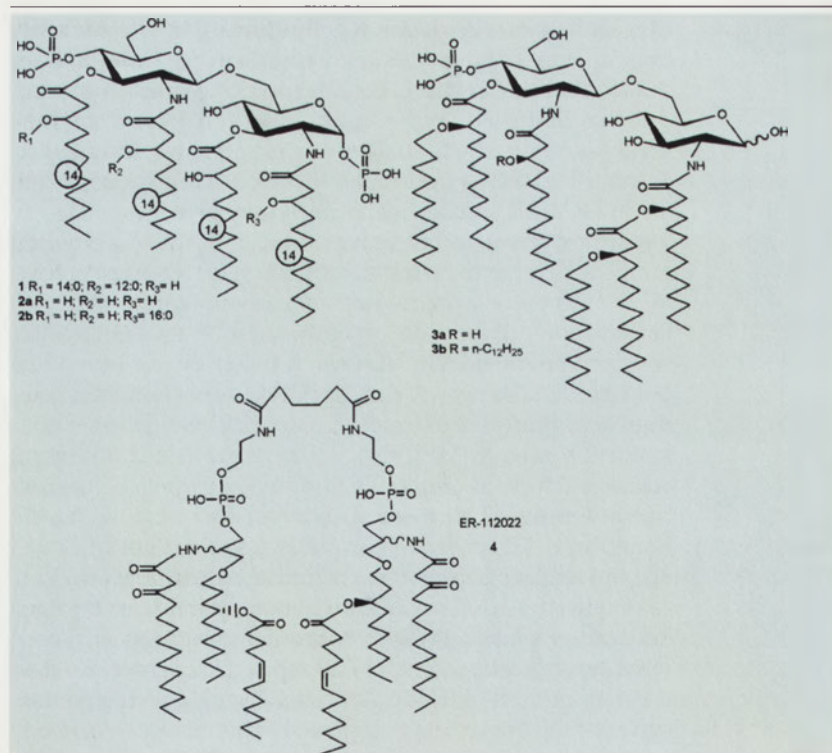
Lipopolisacharyd, główny element strukturalny ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych zwiększa reakcję immunologiczną, zarówno na antygeny białkowe, jak i polisacharydowe. Jednak jest zbyt toksyczny i pirogenny, aby mógł być stosowany jako adiuwant w szczepionkach dla ludzi. Na strukturę lipopolisacharydów składają się trzy elementy: O-specyficzny polisacharyd o dużej zmienności strukturalnej, odpowiadający za właściwości antygenowe LPS, polisacharyd rdzeniowy zbudowany z wielocukrów oraz lipid A odpowiedzialny za właściwości immunomodulacyjne i toksyczne LPS [20]. Lipid A jest acylowanym disacharydem. Strukturę lipidu A *E. coli* 1 oraz ważniejszych syntetycznych analogów i mimetyków lipidu A 2-4, które badane są pod kątem ich przydatności adiuwantowej [4,21-23] zilustrowano na rysunku 1. Triacylowany fosforylowany disacharyd naturalnego lipidu A *E. coli* jest mniej toksycznym, silnym adiuwantem, wykazuje również obiecujące właściwości przeciwnowotworowe [4]. Badania przedkliniczne przeprowadzone na szczurach z wszczepionym rakiem okrężnicy pokazały, że powoduje on regresję tego nowotworu [24]. Również chemiczna modyfikacja naturalnego lipidu A *Salmonella minnesota*, monofosforyl lipidu A (MPL™) R595 2a okazał się skutecznym adiuwantem w szczepionkach przeciw malarii i przeciwnowotworowych zarówno u zwierząt jak i u człowieka [4]. Jiang i wsp. [21] zsyntetyzowali dwa analogi lipidu A, 3a i 3b, zawierające syntetyczne trlipidowe grupy. Związki te są potencjalnie dobrymi adiuwantami, pobudzają antygen do proliferacji komórek T i sekrecję interferonu-γ (IFN-γ) w syntetycznej liposomalnej szczepionce. Zsyntetyzowano też dwa mimetyki lipidu A zawierające jednostkę pentae-trytrytu [22]. Wykazują one silne stymulowanie wysokiego poziomu prozapalnych cytokin, w tym TNF-α, IL-6 i IL-8, przez adherentne komórki człowieka prezentujące anty-

gen. Jahnson i wsp. [25] opisali grupę syntetycznych mimityków lipidu A, pochodnej glukozamido-4-fosforanu (AGP<sub>5</sub>), takich jak RC-529, jako nową klasę adiuwantów. Przedkliniczne badania wykazały, że RC-529 jest równie skutecznym adiuwantem jak MPL™ 2a, ale posiada lepszy profil bezpieczeństwa i jest mniej pirogeny, co jest bardzo ważne w leczeniu dzieci. Ostatnie doniesienia sugerują, że mimityki lipidu A o silnej aktywności agonistycznej, takie jak np. ER-112022 4 aktywują system odpornościowy przez receptory TLR4 [4].

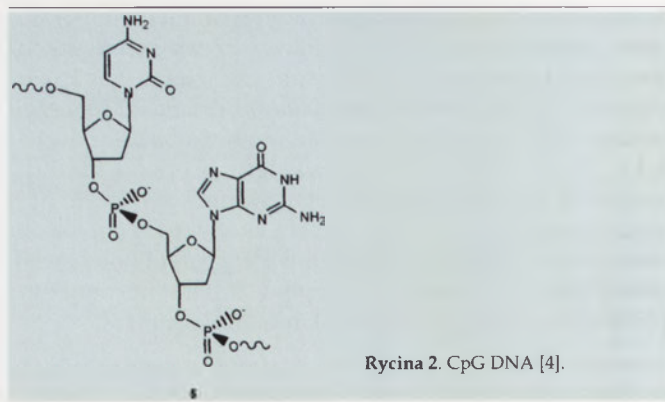
DNA bakterii, owadów i pasożytów wielokomórkowych w przeciwieństwie do DNA człowieka i innych kręgowców, zawierają niemetylowane sekwencje dinukleotydu, tzw. motywy CpG 5 (Ryc. 2), ograniczone od końca 5' dwoma nukleotydami purynowymi, a od końca 3' – pirydynowymi [1,5,26-28]. Motywy CpG są rozpoznawane przez receptor TLR9 (należący do grupy receptorów PRR). Syntetyczne oligodeoksynukleotydy (ODN) zawierające motywy CpG mogą działać aktywująco na limfocyty B, stymulować wybiórczo aktywność komórek NK, wytwarzać prozapalne cytokiny, takie jak: IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF-α, interferony [29-32] lub pobudzać komórki dendrytyczne. Powodując wzrost zarówno odpowiedzi Th1 jak i komórkowej CTL pozwalają one na 10 do 100-krotną redukcję dawki stosowanego antygeny. Prowadzone są badania nad wykorzystaniem ODN jako adiuwantów w terapii szczepionkami przeciwnowotworowymi oraz jako składników szczepionek przeciwko chorobom zakaźnym.

#### ADIUWANTY NA BAZIE EMULSJI OLEJOWEJ I ŚRODKÓW EMULGUJĄCYCH

Wśród tej grupy adiuwantów na uwagę zasługuje SAF, MF59 i AS02. Syntetyczny kompleks SAF (*Syntex adjuvant formulation*) jest emulsją O/W zawierającą skwalen, deter-



Rycina 1. Naturalne i syntetyczne adiuwanty pochodne lipidu A [4].



gent *Tween 80* (polioksymonooleinian sorbitanu) i *Pluronic L121* (kopolimer tlenku etylenu i tlenku propyleny) w buforze fosforanowym o pH 7.4; w niektórych wersjach zawiera on syntetyczną niepirogenną pochodną MDP (treonylo-muramyldipeptyd). Próby kliniczne ze szczepionkami zawierającymi SAF przeciwko następującym infekcjom: wirusem małego zespołu nabytego niedoboru odporności (SAIDS), wirusem grypy, wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV), wirusem Epsteina-Barr (EBV) i wirusem opryszczki zwykłej (HSV) przyniosły zachęcające rezultaty [1,4,5,33].

Natomiast MF59 jest emulsją skwalenu w wodzie stabilizowaną detergentami *Span 85* (trioleinian sorbitanu) i *Tween 80*. Związek ten był testowany na różnych gatunkach zwierząt powodując znaczący wzrost odpowiedzi immunologicznej na różne antygeny wliczając cytomegalowirus (CMV), HSV, HIV, wirus zapalenia wątroby typu C (HCV), zapalenia wątroby typu B (HBV) oraz antygeny grypy. Obecnie przechodzi on I/II fazę badań klinicznych w szczepionce przeciw HIV i grypie oraz III fazę badań w szczepionce przeciw wirusowi opryszczki zwykłej (HSV) [1,4,5,34]. Firma Chiron Biocine (Sienna, Włochy) przeprowadziła badania ze szczepionką przeciwgrypową zawierającą MF59. Badania, którym poddano ponad milion ludzi w Europie, potwierdziły silną adiuwantową skuteczność MF59 oraz wysoki poziom bezpieczeństwa w każdej badanej grupie wiekowej [5].

AS02, inny poddawany próbom adiuwant jest emulsją O/W zawierającą MPL i QS-21. Powoduje on wzrost przeciwciał i silnie wydłuża odpowiedź Th1 i komórkową CTL. W badaniach przedklinicznych wykazał się dużą skutecznością w szczepionce przeciw gruźlicy u świnek morskich. Badany był na ludziach w szczepionce na papillomawirus (HPV – wirus brodawczaka człowieka), stosowany był również w połączeniu z antygenem zapalenia wątroby typu B (HBsAg) oraz w tworzeniu szczepionki przeciw HIV [1,4,5,15].

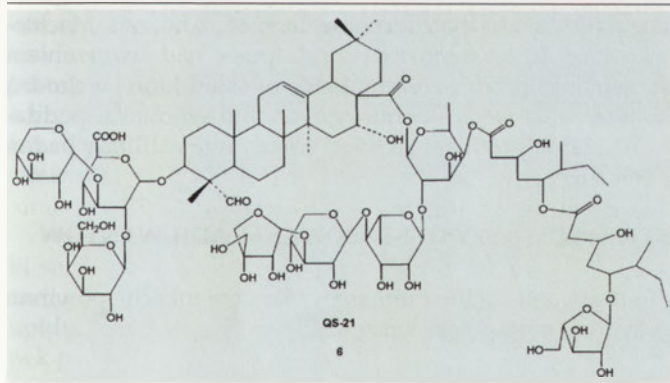
ADIUWANTY SPECYFICZNE (w jednych wypadkach są adiuwantami w innych nie)

Należą do nich niektóre liposomy czyli małe kropelki (o średnicy do 50 nm) wodnych rozтворów otoczone ściankami fosfolipidowej



warstwy podwójnej. Uważane za bezpieczne, stosuje się je pozajelitowo u ludzi jako nośniki biologicznie aktywnych substancji. Liposomy i pewne polimery (np. *Pluronic L121* [19] komponent SAF) mają na celu zwiększenie prezentacji antygeny i pobudzenie odpowiedzi cytotoksycznej limfocytów T [35-38].

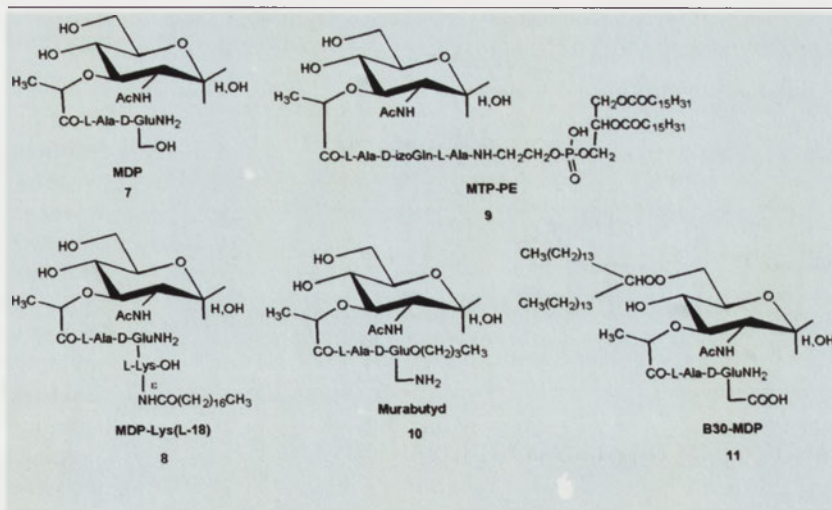
Do adiuwantów specyficznych zalicza się również saponiny, które są roślinnymi glikozydami, zawierającymi steroidowe aglikony [39]. Częściowo oczyszczona saponina izolowana z kory drzew *Quillaja saponaria* Molina pochodzących z Ameryki Południowej, zwana Quil A jest szeroko stosowana w szczepionkach weterynaryjnych, np. w zarejestrowanej w Szwecji końskiej szczepionce przeciw grypie [4,40]. Quil A jest heterogenną mieszaniną triterpenowych glikozydów [4,41]. Analiza HPLC wykazała obecność w ich składzie 24 związków, które różniły się adiuwantowością i toksycznością w badaniach na myszach. Quil A był intensywnie badany jako składnik immunostymulującego kompleksu ISCOMs (zawierającego oprócz Quil A niekwalencyjnie związane cząsteczki antygeny, cholesterolu i fosfolipidu). W badaniach klinicznych znajduje się grypowa szczepionka z ISCOMs [4,5,42,43]. Jednym z 24 strukturalnych triterpenowych glikozydów izolowanych z Quil A jest QS-21 **6** (Ryc. 3) [44,45]. Ten oryginalny adiuwant wzmacnia immunogenność proteinowych, gliko-



Rycina 3. Struktura QS-21 [52].

proteinowych i polisacharydowych antygenów u małych zwierząt, psów i naczelnych. W I fazie badań klinicznych znajdują się szczepionki zawierające QS-21 jako adiuwant w szczepionkach przeciw grypie, HSV, HIV-1, zapaleniu wątroby typu B, malarii, nowotworom typu czerniak, nowotworom odbytu i innym. Badania przeprowadzone na około 3000 ochotnikach nie wykazały znaczących efektów ubocznych [4,44,45]. W toku są badania toksykologiczne, które mają określić przydatność QS-21 w szczepionkach przeznaczonych dla dzieci.

W eksperymentalnych szczepionkach przeznaczonych dla osób o upośledzonej odporności jako adiuwanty są również wykorzystywane cytokiny, np. IL-2, IL-12, TNF, INF- $\gamma$  [1,4,5].



Rycina 4. MDP i jego syntetyczne analogi.

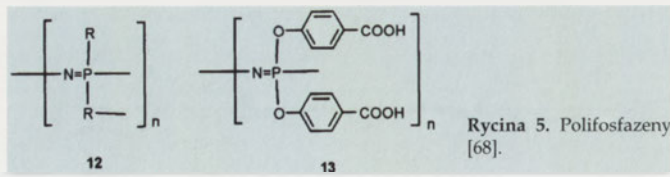
### ADIUWANTY SYNTETYCZNE

Muramyldipeptyd (MDP) czyli *N*-acetylmuramylo-*L*-alanylo-*D*-izoglutamina **7** (Ryc. 4) jest najmniejszym syntetycznym fragmentem otrzymanym na wzór ściany komórkowej bakterii z rodzaju *Mycobacterium*, przejawiającym właściwości adiuwantowe porównywalne do całych komórek bakteryjnych. MDP, podobnie jak martwe mykobakterie jest pirogeny i również, chociaż w mniejszym stopniu, wywołuje inne niepożądane efekty uboczne. Z tych powodów nie został zaakceptowany do stosowania w terapii ludzi. Jego właściwości terapeutyczne są jednak na tyle interesujące, że intensywnie poszukuje się syntetycznych analogów pozbawionych tych szkodliwych właściwości [4,5,46-49]. Wiele takich analogów już otrzymano, np. treonylo-MDP [4], MDP-Lys(L18) **8** [50], MTP-PE **9**, adamantylo-desmuramyldipeptyd [51] i murabutyd **10** [52] (Ryc. 4). Lipofilowa pochodna **8** powoduje wzrost ekspresji CD80, CD83, CD86 i CD40 oraz stymuluje produkcję cytokin TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 i IL-12 przez komórki dendrytyczne człowieka (DC<sub>c</sub>) [53]. W warunkach *in vivo* hamowała infekcje wirusami *Vaccinia* (krowianki) i *Herpes Simplex* (opryszczki zwykłej) u myszy [54]. Szczepionki przeciwwirusowe zawierające murabutyd **10**, efektywnie indukują powstawanie przeciwciał swoistych u ludzi. Wykazano także wysoką przydatność adiuwantową fosforowej pochodnej MDP (MTP-PE) **9**, między innymi w szczepionce przeciwko wirusowi typu I (HIV-1) oraz w szczepionce przeciwko grypie [55,56]. Niedawno opisano nowy typ liposomalnej, przeciwgrypowej szczepionki zawierającej hemaglutynino-neuramidazowe antygeny grypy (HANA) oraz jako adiuwant pochodną MDP (B30-MDP) **11**, a także pewne lipidy. Szczepionka ta zwiększa poziom przeciwciał oraz komórkową odporność u świń morskich i myszy [57].

Syntetyczne polinukleotydy, związki zbudowane z nukleotydów połączonych ze sobą wiązaniami estrowymi poprzez resztę kwasu ortofosforowego imitują dwuniciowy RNA wirusów. Działanie ich polega na stymulowaniu wydzielania interferonów przez komórki układu odpornościowego oraz aktywowaniu komórek NK (naturalnych komórek zabójczych). Najbardziej znane polinukleotydy to

kompleksy: poli I:C (zawierający inozynę i cytydynę) i poli A:U (zawierający adenozynę i urydynę) [1,4].

Jako adiuwanty proponowane są także inne syntetyczne związki, jak poli(organo)fosfazeny **12** i poli[di(karboxylofenoksy)fosfazeny] (PCPP) **13** (Ryc. 5) [58,59].



## MECHANIZM DZIAŁANIA ADIUWANTÓW

Adiuwanty działają wg różnego mechanizmu, w związku z tym, w zależności od drogi podania i odpowiedzi immunologicznej jaką chcemy otrzymać muszą być indywidualnie dobierane do odpowiedniego typu szczepionki. Adiuwanty typu żelu powodują miejscowe reakcje zapalne, aktywację dopełniacza i spowolnienie uwalniania antygeny. Adiuwanty na bazie emulsji (np. IFA), oczyszczone saponiny, ISCOM<sub>s</sub>, SAF i liposomy działają bezpośrednio lub pośrednio na komórki prezentujące antygeny (APC), takie jak makrofagi, limfocyty B i komórki dendrytyczne (DC). Prezentacja antygeny przez makrofagi, limfocyty B i komórki dendrytyczne nie jest jednakowo rozwinięta. Makrofagi są przystosowane do fagocytozy i fragmentacji antygeny, z kolei komórki dendrytyczne (DC) i limfocyty B do jego prezentacji [60]. Mechanizm indukowania CTL przez te adiuwanty związany jest z bezpośrednim dostarczeniem antygeny do cytosolu w celu prezentacji poprzez cząsteczki MHC klasy I [61]. Liposomy stymulują wydzielanie immunomodulatorowych cytokin, które działając na limfocyty promują odpowiedź immunologiczną typu Th1 lub Th2 [62]. Adiuwanty promujące odpowiedź immunologiczną typu Th1 przez indukowanie wydzielania IFN- $\gamma$  i opóźnionej reakcji nadwrażliwości (DTH) stymulują produkcję przeciwciał IgG, które z dużym powinowactwem wiążą się do receptorów Fc $\gamma$ I (np. IgG2a u myszy i IgG1 u ludzi) [63]. Subklasa tych immunoglobulin pośredniczy w liście dopełniacza i cytotoxycznosci komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC). Cytokiny, takie jak: IL-1, IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  stosowane jako adiuwanty powodują wybiórczą aktywację limfocytów T, makrofagów i limfocytów B. Jankovic i wsp. [64] opisują, że dodanie cytokiny IL-12 do adiuwanta glinowego w szczepionce przeciw HIV-1 zawierającej glikoproteinę 120 uwydatnia odpowiedź typu 1 (Th1) i produkowanie przeciwciał IgG2 oraz IgG3 u myszy. Adiuwanty pochodzenia naturalnego, takie jak: toksoid krząsowy, błoniczy, tężcowy, peptydy prądków gruźlicy, lipopolisacharyd, lipid A i lipoproteiny działają poprzez aktywację limfocytów T, makrofagów, dopełniacza, a także poprzez pobudzenie wydzielania cytokin i chemokin oraz ułatwiają prezentację antygeny poprzez cząsteczki MHC klasy II [65,66]. Powodują one również wzrost odpowiedzi typu Th2 oraz produkcję przeciwciał IgA i IgE [1,67].

## ADIUWANTY W SZCZEPIONKACH PRZECIWNOWOTWOROWYCH

Rozpoznawanie i zwalczanie komórek nowotworowych przez organizm chorego jest jedną z najbardziej obiecujących metod leczenia raka. W terapii szczepionkami nowotworowymi pacjentom podaje się odpowiednio napromieniowane lub zabite autologiczne bądź allogeniczne komórki nowotworowe lub ich ekstrakty w połączeniu z adiuwantami, takimi jak BCG, QS-21, związkami glinu czy cytokinami: IL-2, IL-12, GM-CSF [1,68]. Leczenie chorób nowotworowych za pomocą szczepionek ma sens jedynie wtedy, gdy nowotwory mają dobrze określone antygeny. Takie warunki spełnia czerniak i dlatego najbardziej zaawansowane badania kliniczne terapii szczepionkami dotyczą właśnie czerniaka [1]. W Kanadzie zarejestrowano szczepionkę pod nazwą Melacin, zawierającą lizaty komórek 2 linii czerniaka w połączeniu z adiuwantem DETOX [4], którym jest monofosforylo lipid A i ściany komórkowe *Mycobacterii phlei* w emulsji skwalenu w wodzie. Adiuwant ten badany był nie tylko w szczepionkach na czerniaka ale również na nowotwór jajnika i piersi, jednak z umiarkowanym klinicznym sukcesem [4]. Inna szczepionka przeciw czerniakowi CancerVax zawiera napromieniowane allogeniczne komórki 3 linii (wybranych z ponad 150) czerniaka człowieka i BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) jako adiuwant [1,4]. Minev i wsp. [69] opisali szczepionki dla immunoterapii nowotworów piersi i prostaty, w których jako adiuwanty stosowane są między innymi GM-CSF oraz QS-21. Mówiąc o szczepionkach przeciwnowotworowych nie można pominąć polskiego osiągnięcia. W Wielkopolskim Centrum Onkologii w Poznaniu, grupa pod kierunkiem prof. Andrzeja Mackiewicza już 10 lat temu rozpoczęła pracę nad stworzeniem szczepionki przeciw czerniakowi, w skład której wchodzi komórki rakowe z laboratoryjnych linii czerniaka, poddane działaniu promieni gamma. Weszły one w III fazę badań klinicznych.

## KORZYŚCI I RYZYKO STOSOWANIA ADIUWANTÓW

Stosowanie adiuwantów w szczepionkach powinno przynosić następujące korzyści [5]:

- wywoływać bezpośrednią i optymalną odpowiedź immunologiczną, pożądaną dla danej szczepionki, zwiększać odporność komórkową i umożliwiać przezśluzówkowe rozprzodzenie szczepionki;
- podwyższać immunogenność słabych immunogenów, takich jak wysokiej czystości syntetyczne lub rekombinowane antygeny;
- umożliwiać zmniejszenie dawki antygeny lub częstotliwość uodparniania;
- polepszać skuteczność szczepionek dla osób z osłabioną odpornością, takich jak noworodki, ludzie w podeszłym wieku czy o obniżonej odporności na skutek niektórych chorób lub radio- czy chemioterapii.

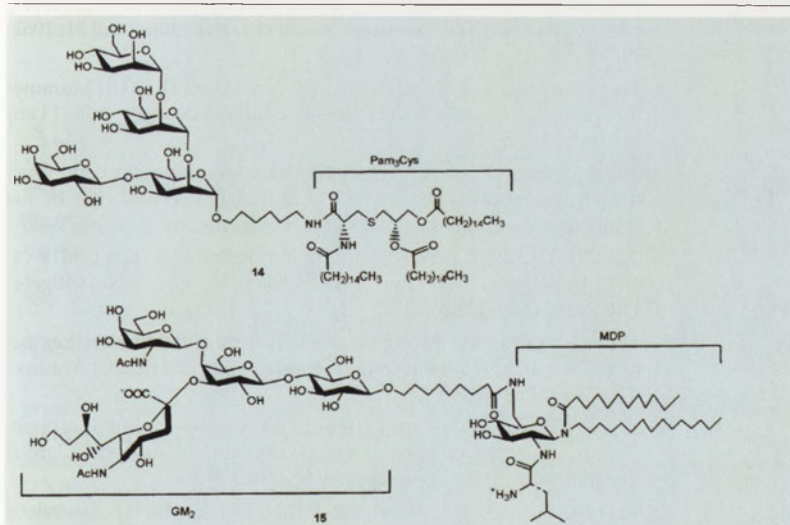
Dotychczas znane adiuwanty nie są jednak obojętne dla organizmu. Ich stosowanie związane jest z następującym rzeczywistym lub potencjalnym ryzykiem [5]:

- miejscowym ostrym lub przewlekłym odczynem zapalnym, tworzeniem bolesnego ropnia, guzka lub owrzodzenia;
- wywoływaniem chorób z objawami grypo-podobnymi, takimi jak: gorączka, złe samopoczucie, bóle mięśni, głowy, stawów i powiększenie węzłów chłonnych;
- obrzękiem naczyniowo-ruchowym, pokrzywką i zapaleniem naczyń;
- autoimmunologicznym zapaleniem stawów, skrobiającą i zapaleniem błony naczyniowej przedniego odcinka oka;
- krzyżowymi reakcjami z antygenami człowieka prowadzącymi do zapalenia kłębuszkowego nerek lub zapalenia opon mózgowych;
- immunosupresją, reakcjami anafilaktycznymi oraz uczuleniem na tuberkulinę lub inne testowane skórne antygeny.

## PODSUMOWANIE

W ciągu najbliższych lat przewiduje się szybki postęp w technologii wytwarzania szczepionek dzięki wykorzystaniu nowych rekombinowanych i koniugowanych antygenów, kwasów nukleinowych, peptydów oraz połączonych antygenów podawanych w jednym wstrzyknięciu. Wymagają one wspomaganie nietoksycznymi adiuwantami [1]. Dawka, częstość immunizacji (uodparniania) za pomocą szczepionki i rola adiuwantu musi być określona przed badaniami klinicznymi. Jako przykład może służyć I faza badań klinicznych na ochotnikach ze szczepionką zawierającą 50 µg białka HIV gp120 w obecności jednego z siedmiu adiuwantów, takich jak: wodorotlenek glinu, MPL, liposomy zawierające MPL, MF59, MTP-PE, SAF sam lub z dodatkiem treonylo-MDP (SAF/treonylo-MDP) [4]. Najaktywniejszym adiuwantem okazał się SAF/treonylo-MDP, jednak w porównaniu z innymi badanymi adiuwantami powodował on silniejsze reakcje uboczne.

Nową strategią w terapii szczepionkami są szczepionki samoadiuwantowe (self-adjuvanted). Są to syntetyczne związki wykorzystujące właściwości adiuwantowe Pam<sub>3</sub>Cys, lipidu A, MDP i lipopeptydów. Przykłady takich szczepionek przedstawia rysunek 6 [4].



Rycina 6. Przykłady szczepionek tzw. self-adjuvanted [4].

Syntetyczne szczepionki zawierające lipid A były projektowane przeciw HIV, czerniakowi i białaczce. Pam<sub>3</sub>Cys zastosowano do tworzenia eksperymentalnych szczepionek nie tylko o budowie peptydowej, glikopeptydowej, ale również sacharydowej, np. przeciw pasożytniczej chorobie leiszmaniozie 14 (Ryc. 6). Dullenkopf i wsp. [70] opisali syntezę związku 15 jako szczepionki przeciwnowotworowej zawierającej pochodną MDP. Obecnie główną przeszkodą dla rozwoju tego typu szczepionek jest to, że są one słabymi immunogenami i w związku z tym ich skuteczność musi być podwyższona przez dodawanie innego adiuwantu.

Zgodnie z zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) nowe szczepionki nie powinny zawierać substancji szkodliwych, w tym związków glinu jako adiuwantów oraz związków rtęci czy fenolu jako konserwantów [1]. Z tego powodu poszukiwanie nowych, lepszych adiuwantów jest konieczne.

## PIŚMIENICTWO

- Gołab J, Jakóbsiak M, Lasek W (2002) Immunologia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben-Efraim S, Gupta CK (1993) Adjuvants — a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* 11: 293-306
- Gupta RK, Siber GR (1995) Adjuvants for human vaccines — current status, problems and future prospects. *Vaccine* 13: 1263-1276
- Jiang ZH, Koganty RR (2003) Synthetic vaccines: The role of adjuvants in immune targeting. *Curr Med Chem* 10: 1423-1439
- Kenney RT, Edelman R (2003) Survey of human — use adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2: 167-188
- Singh M, O'Hagan DT (2002) Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceut Res* 19: 715-728
- Edelman R (2002) The development and use of vaccine adjuvants. *Mol Biotechnol* 21: 129-148
- Ramon G (1925) Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. *Bull Soc Centr Med Vet* 101: 227-234
- Ramon G (1926) Procédres pour acroitre la production des antitoxines. *Ann Inst Pasteur* 40: 1-10
- Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace V (1926) The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Path Bact* 29: 38-45
- Freund J, Casals J, Hosmer EP (1937) Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and parafin oil. *Proc Soc Exp Biol Med* 37: 509-513
- Johnston AG, Gaines S, Landy M (1956) Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa* V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharides. *J Exp Med* 103: 225-246
- Ellouz F, Adam A, Ciobaru R, Lederer E (1974) Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 59: 1317-1325
- Krieg AM (2000) The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 12: 35-43
- Garçon N, Heppner DG, Cohen J (2003) Development of RTS,S/ASO2: a purified subunit — based malaria vaccine candidate formulated with a novel adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 2: 231-238
- Eriksson K, Holmgren J (2002) Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Curr Opin Immunol* 14: 666-672
- Vogel FR (1998) Adjuvants in perspective. *Dev Biol Stand* 92: 241-248

18. Vogel FR (2000) Improving vaccine performance with adjuvants. *Clin Infect Dis* 30: S266-S270
19. Gupta RK (1998) Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev* 32: 155-172
20. Romanowski P, Dzierzbicka K, Myśliwski A, Kołodziejczyk AM (1991) Syntetyczne immunomodulatory wzorowane na naturalnych produktach mikroorganizmów. *Postepy Biochem* 37: 159-171
21. Jiang ZH, Bach MV, Budzynski WA, Krantz MJ, Koganty RR, Longenecker BM (2002) Lipid structures containing novel lipid moieties: synthesis and adjuvant properties. *Bioorg Med Chem Lett* 12: 2193-2196
22. Jiang ZH, Budzynski WA, Skeels LN, Krantz MJ, Koganty RR (2002) Novel lipid A mimetics derived from pentaerythritol: synthesis and their potent agonistic activity. *Tetrahedron* 58: 8833-8842
23. Lien E, Chow JC, Hawkins LD, McGuinness PD, Miyake K, Espeviks T, Gusovsky F, Golenbock DT (2001) A novel synthetic acyclic lipid A-like agonist activates cells via the lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling pathway. *J Biol Chem* 276: 1873-1880
24. Onier N, Hilpert S, Arnould L, Saint-Giorgio V, Davies JG, Jeannin JF (1999) Cure of colon cancer metastasis in rats with the new lipid A OM 174. Apoptosis of tumor cells and immunization of rats. *Clin Exp Metastasis* 17: 299-306
25. Johnson DA, Keegan DS, Sowell CG, Livesay MT, Johnson CL, Taubner LM, Harris A, Myers KR, Thompson JD, Gustafson GL, Rhodes MJ, Ulrich JT, Ward JR, Yorgensen YM, Cantrell JL, Brookshire VG (1999) 3-O-desacyl monophosphoryl lipid A derivatives: synthesis and immunostimulant activities. *J Med Chem* 42: 4640-4649
26. Krieg AM (2002) CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20: 709-760
27. Klinman DM (2003) CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 2: 305-315
28. Verthelyi D, Kenney RT, Seder RA, Gam AA, Friedag B, Klinman DM (2002) CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates. *J Immunol* 168: 1659-1663
29. Hartmann G, Krieg AM (2000) Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 164: 944-953
30. Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Enghemann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G (2001) Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 31: 3026-3037
31. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-745
32. Davis HL, Suparto I, Weeratna R, Jumintarto, Iskandriati D, Chamzah S, Ma'ruf A, Nente C, Pawitri D, Krieg AM, Heriyanto, Smits W, Sajuthi D (2000) CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine* 18: 1920-1924
33. Dzierzbicka K, Gozdowska M, Kołodziejczyk AM (1997) Synergistyczne efekty immunomodulatorów typu muramylopeptydów i innych leków stosowanych wspólnie w chemioterapii. *Postepy Biochem* 43: 73-79
34. Menegon T, Baldo V, Bonello C, Dalla CD, Di Tommaso A, Trivello R (1999) Influenza vaccines: antibody responses to split virus and MF59-adjuvanted subunit virus in an adult population. *Eur J Epidemiol* 15: 573-576
35. Richards RL, Rao M, Wassef NM, Glenn GM, Tothwell SW, Alving CR (1998) Liposomes containing lipid A serve as an adjuvant for induction of antibody and cytotoxic T-cell responses against RTS,S malaria antigen. *Infect Immun* 66: 2859-2865
36. Men Y, Gander B, Merkle HP, Corradin G (1996) Induction of sustained and elevated immune responses too weakly immunogenic synthetic malaria peptides by encapsulation in biodegradable polymer microspheres. *Vaccine* 14: 1442-1450
37. Shahin R, Leef M, Eldridge J, Hudson M, Gilley R (1995) Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Bordetella pertussis* antigens encapsulated in poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Infect Immun* 63: 1195-1200
38. Newman MJ, Actor JK, Balusubramanian M, Jagannath C (1998) Use of nonionic block copolymers in vaccines and therapeutics. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 15: 89-142
39. Kensil CR (1996) Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 13: 1-55
40. Spickler AR, Roth JA (2003) Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. *J Vet Intern Med* 17: 273-281
41. Nord LI, Kenne L (1999) Separation and structural analysis of saponins in a bark extract from *Quillaja saponaria Molina*. *Carbohydr Res* 320: 70-81
42. Sjolander A, van't Land B, Lovgren Bengtsson K (1997) ISCOMs containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses. *Cell Immunol* 177: 69-76
43. Ennis FA, Cruz J, Jameson J, Klein M, Burt D, Thiphawong J (1999) Augmentation of human influenza A virus-specific cytotoxic T lymphocyte memory by influenza vaccine and adjuvanted carriers (ISCOMs). *Virology* 259: 256-261
44. Liu G, Anderson Ch, Scaltreto H, Barbon J, Kensil ChR (2002) QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity. *Vaccine* 20: 2808-2815
45. Evans TG, McElrath MJ, Matthews T, Montefiori D, Weinhold K, Wolff M, Keefer MC, Kallas EG, Corey L, Gorse GJ, Belshe R, Graham BS, Spearman PW, Schwartz D, Mulligan MJ, Goepfert P, Fast P, Berman P, Powell M, Francis D (2001) QS-21 promotes and adjuvant effect allowing for reduced antigen dose during HIV-1 envelope subunit immunization in humans. *Vaccine* 19: 2080-2091
46. Azuma I, Seya T (2001) Development of immunoadjuvants for immunotherapy of cancer. *Int Immunopharmacol* 1: 1249-1259
47. Adam A, Lederer E (1984) Muramyl peptides: immunomodulators, sleep factors, and vitamins. *Med Res Rev* 4: 111-152
48. Kołodziejczyk A, Kołodziejczyk AS (1987) Muramylopeptydy i ich własności farmakologiczne. *Postepy Biochem* 33: 203-229
49. Dzierzbicka K, Kołodziejczyk A (2003) Muramyl peptides – synthesis and biological activity. *Pol J Chem* 77: 373-395
50. Yoo YC, Yoshimatsu K, Koike Y, Hatsuse R, Yamanishi K, Tanishita O, Arikawa J, Azuma I (1998) Adjuvant activity of muramyl dipeptide derivatives to enhance immunogenicity of a hantavirus-inactivated vaccine. *Vaccine* 16: 216-224
51. Becker PD, Corral RS, Guzman CA, Grinstein S (2001) Adamantylamide dipeptide as effective immunoadjuvant in rabbits and mice. *Vaccine* 19: 4603-4609
52. Vidal VF, Casteran N, Riendeau CJ, Kornfeld H, Darcissac EDA, Capron A, Bahr GM (2001) Macrophage stimulation with murabutide, an HIV-suppressive muramyl peptide derivative, selectively activates extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, C/EBP beta and STAT1: role of CD14 and Toll like receptors 2 and 4. *Eur J Immunol* 31: 1962-1971
53. Todate A, Suda T, Kuwata H, Chida K, Nakamura H, (2001) Muramyl dipeptide-Lys stimulates the function of human dendritic cells. *J Leukoc Biol* 70: 723-729
54. Vidal V, Dewulf J, Bahr GM (2001) Enhanced maturation and functional capacity of monocyte-derived immature dendritic cells by the synthetic immunomodulator Murabutide. *Immunology* 103: 479-487
55. Fast DJ, Vosika GJ (1997) The muramyl dipeptide analog GMTP-N-DPG preferentially induces cellular immunity to soluble antigens. *Vaccine* 15: 1748-1752
56. Bahr GM (2003) Non-specific immunotherapy of HIV-1 infection: potential use of the synthetic immunomodulator murabutide. *J Antimicrob Chemother* 51: 5-8
57. Ando S, Tsuge H, Mayumi T (1996) Effect of cholesterol or phospholipids incorporation on vesicle formation of muramyl dipeptide derivative B30-MDP. *Prog Colloid Polym Sci* 274: 178-185
58. Payne LG, Jenkins SA, Woods AL, Grund EM, Geribo WE, Loebelenz JR, Andrianov AK, Roberts BE (1998) Poly[di(carboxylatophenoxy)ph

osphazene] (PCPP) is a potent immunoadjuvant for an influenza vaccine. *Vaccine* 16: 92-98

59. Allcock H, Kwon S (1989) An ionically cross-linkable polyphosphazene: poly[bis(carboxylatophenoxy)phosphazene] and its hydrogels and membranes. *Macromolecules* 22: 75-79
60. Rossowska J, Pajtasz-Piasecka E (2003) Zastosowanie komórek dendrytycznych w immunoterapii nowotworów – osiągnięcia i perspektywy. *Postepy Hig Med Dosw* 57: 501-518
61. Kovacovics-Bankowski M, Rock KL (1994) Preparation of exogenous antigens by macrophages: analysis of major histocompatibility complex class I and II presentation and regulation by cytokines. *Eur J Immunol* 24: 2421-2428
62. Xu-Amano J, Kiyono H, Jackson RJ, Staats HF, Fujihashi K, Burrows PD, Elson CO, Pillai S, McGhee JR (1993) Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J Exp Med* 178: 1309-1320
63. Unkeless JC, Scigliano E, Freedman VH (1988) Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol* 6: 251-281
64. Jankovic D, Caspar P, Zweig M, Garcia-Moll M, Showalter SD, Vogel FR, Sher A (1997) Adsorption to aluminum hydroxide promotes the activity of IL-12 as an adjuvant for antibody as well as type 1 cytokine responses to HIV-1 gp120. *J Immunol* 159: 2409-2417
65. Okahashi N, Yamamoto M, Vancott JL, Chatfield SN, Roberts M, Bluthmann H, Hiroi T, Kiyono H, McGhee JR (1996) Oral immunization of interleukin-4 (IL-4) knockout mice with a recombinant *Salmonella* strain or cholera toxin reveals that CD4+ Th2 cells producing IL-6 and IL-10 are associated with mucosal immunoglobulin A responses. *Infect Immun* 64: 1516-1525
66. Mu HH, Sewell WA (1994) Regulation of DTH and IgE responses by IL-4 and IFN-gamma in immunized mice given pertussis toxin. *Immunology* 83: 639-645
67. Wilson AD, Robinson A, Irons L, Stokes CR (1993) Adjuvant action of cholera toxin and pertussis toxin in the induction of IgA antibody response to orally administered antigen. *Vaccine* 11: 113-118
68. Finn OJ (2003) Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immunol* 3: 630-641
69. Mineev BR, Guo F, Gueorguieva I, Kaiser HE (2002) Vaccines for immunotherapy of breast cancer and prostate cancer: new developments and comparative aspects. *In vivo* 16: 405-416
70. Dullenkopf W, Ritter G, Fortunato SR, Old LJ, Schmidt RR (1999) Synthesis of a structurally defined antigen-immunostimulant combination for use in cancer vaccines. *Chem Eur J* 5: 2432-2438

## Adjuvants – essential components of new generation vaccines

Krystyna Dzierzbicka<sup>✉</sup>, Aleksander M. Kołodziejczyk

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

<sup>✉</sup>e-mail: kd@chem.pg.gda.pl

**Key words:** adjuvants, immunostimulators, vaccine

### ABSTRACT

Adjuvants are essential components of vaccines that augment an immunological reaction of organism. New vaccines based on recombinant proteins and DNA, are more safe than traditional vaccines but they are less immunogenic. Therefore, there is an urgent need for the development of new, improved vaccine adjuvants. There are two classes of adjuvants: vaccine delivery systems (e.g. emulsions, microparticles, immune-stimulating complexes ISCOMs, liposomes) and immunostimulatory adjuvants (e.g. lipopolysaccharide, monophosphoryl lipid A, CpG DNA, or muramylpeptides). The discovery of more potent and safer adjuvants may allow to development better prophylactic and therapeutic vaccines against chronic infectious (e.g., HSV, HIV, HCV, HBV, HPV, or *Helicobacter pylori*) and noninfectious diseases as multiple sclerosis, insulin-dependent diabetes, rheumatoid arthritis, allergy and tumors (e.g., melanoma, breast, or colon cancer).

Marta Pelczyk<sup>1</sup>

Aleksandra Obrępałska-  
Stęplowska<sup>1,✉</sup>

Henryk Pospieszny<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Międzyzakładowa Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Ochrony Roślin, Poznań

<sup>2</sup>Zakład Wirusologii i Bakteriologii, Instytut Ochrony Roślin, Poznań

✉Międzyzakładowa Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Ochrony Roślin, ul. Miczurina 20, 60-318 Poznań; e-mail: ao.steplowska@ior.poznan.pl; tel.: (061) 864 90 90

Artykuł otrzymano 28 września 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 23 listopada 2005 r.

**Słowa kluczowe:** satelitarny RNA (satRNA), defektywny RNA (D RNA), defektywny interferujący RNA (DI RNA), chimeryczny RNA

**Wykaz skrótów:** BBMV (ang. *Broad bean mottle virus*) – wirus pstrości bobiku; CCFV (ang. *Cardamine chlorotic fleck virus*) – wirus chlorotycznej centkowatości rzeżuchy; CMV (ang. *Cucumber mosaic virus*) – wirus mozaiki ogórka; CP (ang. *coat protein*) – białko płaszczka wirusa; DI RNA (ang. *defective interfering RNA*) – defektywny interferujący RNA; D RNA (ang. *defective RNA*) – defektywny RNA; PSV (ang. *Peanut stunt virus*) – wirus karłowatości orzecha ziemnego; satRNA (ang. *satellite RNA*) – satelitarny RNA; TBRV (ang. *Tomato black ring virus*) – wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora; TCV (ang. *Turnip crinkle virus*) – wirus kędzierzowatości rzepy

## STRESZCZENIE

Wirusy roślinne typu ss(+)RNA poza swoimi genomowymi RNA często posiadają również dodatkowe subwirusowe cząsteczki RNA, zasocjowane z ich wirionami lub pojawiające się *de novo* w przebiegu infekcji wirusem. Należą do nich: satelitarny, defektywny, defektywny interferujący oraz chimeryczny RNA. Cząsteczki te są nieinfekcyjne i nie mają zdolności do samodzielnej replikacji oraz opłaszczania. Kompleksy białkowe niezbędne do tych procesów dostarczane są przez wirusa pomocniczego. Subwirusowe cząsteczki RNA są stosunkowo krótkie. Większość z nich powstaje na drodze rekombinacji, delekcji lub akumulacji mutacji, aczkolwiek pochodzenie satelitarnych RNA nie jest do końca wyjaśnione. Unikalną cechą dodatkowych elementów wirionów jest częste modyfikowanie przebiegu infekcji wywoływanej przez wirusy pomocnicze. Mogą one działać w kierunku zmniejszania intensywności lub nasilania symptomów chorobowych. Całkowity wpływ na rozwój choroby zależy więc od trójskładnikowego układu: gospodarz – szczep wirusa – subwirusowy RNA. Niniejsza publikacja stanowi syntetyczny przegląd informacji dotyczących dodatkowych, subwirusowych cząsteczek RNA wirusów roślinnych – ich budowy, funkcji oraz pochodzenia.

## WPROWADZENIE

Większość dotychczas zbadanych wirusów atakujących rośliny, posiada podzielony genom w postaci jednoniciowego RNA oraz poraża dużą liczbę gospodarzy roślinnych. Objawy przez nie wywoływane często są skorelowane z występowaniem subwirusowych cząsteczek RNA, do których należą: satelity<sup>1</sup>, defektywny, defektywny interferujący oraz chimeryczny RNA. Subwirusowe cząsteczki RNA mają zwykle specyficzną zdolność modulowania objawów chorobowych, nasilając je lub osłabiając, a nawet całkowicie niwelując. Fakt ten pokazuje, jak skomplikowany jest przebieg infekcji, i że poza interakcjami wirus – roślina, wpływ na rozwój choroby i jej symptomy mogą mieć inne czynniki.

Wspólną cechą wszystkich subwirusowych RNA związanych z wirusami roślinnymi jest brak autonomii podczas replikacji i opłaszczania, w których to procesach są one całkowicie uzależnione od wirusa wspomagającego. Dzięki zachowaniu, w różnym stopniu, homologii sekwencji tych cząsteczek z RNA wirusa pomocniczego – szczególnie obszarów końcowych, wykorzystują one wirusową replikazę do powielania, jak i wirusowe białko płaszczka do pakowania w wiriony. Stopień pokrewieństwa cząsteczek subwirusowych z genomem wirusa jest determinowany sposobem ich powstawania. Przyczyną powstawania niektórych dodatkowych form RNA, głównie defektywnego (D) i defektywnego interferującego (DI) oraz chimerycznego RNA jest niezwykle duża zdolność wirusów do rekombinacji i spontanicznych mutacji. Biorąc pod uwagę szybkie tempo tychże zmian, mamy do czynienia z dużą różnorodnością izolatów, a nawet szczepów konkretnych wirusów oraz z pojawieniem się cząsteczek subwirusowych, towarzyszących infekcjom tymi wirusami. Defektywny i defektywny interferujący RNA powstają na drodze delekcji fragmentów nici genomowych wirusa pomocniczego. Ich obecność wykazano m.in. wśród wirusów roślinnych z rodzajów: *Carmovirus*, *Potexvirus*, *Bromovirus*, *Tospovirus*, *Cucumovirus*. Chimeryczny RNA jest rekombinantem zawierającym odcinki sekwencji genomowych wirusa pomocniczego oraz fragmenty pochodzące z innych cząsteczek (np. satRNA); jest związany m.in. z rodzajem *Carmovirus*.

Kolejną klasę subwirusowych cząsteczek stanowią satelitarne RNA. Prawie wszystkie dotychczas poznane satelity (wyjątkiem jest czynnik delta, będący wirusem satelitarnym współwystępującym z wirusem zapalenia wątroby typu B, atakującym człowieka i zwierzęta) związane są z wirusami roślinnymi i są całkowicie od nich zależne, zarówno w replikacji jak i w procesie pakowania. Zostały zidentyfikowane m.in. w wirusach z rodzaju: *Cucumovirus*, *Nepovirus*, *Sobemovirus*, *Tombusvirus*. Satelitarne RNA można łatwo odróżnić od defektyw-

<sup>1</sup>Terminem satelity określamy zarówno satelitarny RNA jak i wirusy satelitarne.

nych RNA, ponieważ posiadają niski stopień homologii sekwencji z genomem wirusa pomocniczego, ograniczając się jedynie do zachowania konserwatywnych rejonów końcowych, rozpoznawanych specyficznie przez kompleks replikacyjny. Ponadto w niektórych cząsteczkach satelitarnego RNA występuje sekwencja rybozymów nadająca im funkcje autokatalityczne. Dzięki takim właściwościom istnieje potencjalna możliwość wykorzystania ich w stymulacji odpowiedzi przeciwwirusowej u roślin, przy użyciu metod inżynierii genetycznej. Występujące obok nici genomowych dodatkowe cząsteczki RNA stały się obiektem zainteresowania wielu naukowców, liczne badania umożliwiły poznanie ich budowy, sekwencji, aktywności biologicznej, wpływu na przebieg infekcji wirusowej oraz dostarczyły pewnych informacji o procesie replikacji.

## SATELITARNY RNA

### STRUKTURA RNA I FUNKCJE

Satelitarny RNA był najwcześniej zidentyfikowaną subwirusową cząsteczką RNA. Często określane jest mianem „satelita”, jednakże pojęcie to obejmuje również wirusy satelitarne np. satelitarny wirus nekrozy tytoniu (*Satellite tobacco necrosis virus*, STNV) czy mozaiki prosa (*Satellite panicum mosaic virus*, SPMV), które tak jak satRNA zależne są od replikacji wirusa pomocniczego, ale kodują własne białko płaszczka i nie będą tu omawiane [1,2]. Pierwsza cząsteczka satRNA została odkryta w 1969 roku w wirusie pierścieniowej plamistości tytoniu (*Tobacco ringspot virus*, TRSV) [1,3].

Cząsteczka satelitarnego RNA związana z wirusami roślinnymi jest stosunkowo niewielka, długość sekwencji wynosi od 194 do ok. 1500 nt [4] (Tabela 1). Może występować w postaci liniowej np. nepowirusy, kukumowirusy, bądź kolistej, która przeważa wśród sobemowirusów (np. wirus przemijającej pasiastości lucerny, *Lucerne transient streak virus*, LTSV). Zidentyfikowano również małe liniowe cząsteczki tworzące koliste formy pośrednie podczas replikacji (małe satelity nepowirusów np. TRSV) (Ryc. 1). Niektóre satelitarne RNA, szczególnie formy koliste, wykazują podobieństwo cech strukturalnych z wiroidami i określane były jako wirusoidy. Obecnie jednak zaprzestaje się stosowania tego terminu. Wiroidy w przeciwieństwie do satelitarnych RNA mają zdolność do samoreplikacji, nie są oplaszczane. Ponadto cząsteczki te różnią się lokalizacją procesu replikacji w komórkach zainfekowanych tkanek roślinnych – wiroidy

idą najczęściej replikują się w jądrze komórkowym (niektóre w chloroplastach), podczas gdy satRNA replikowane są na terenie cytoplazmy [1,3].

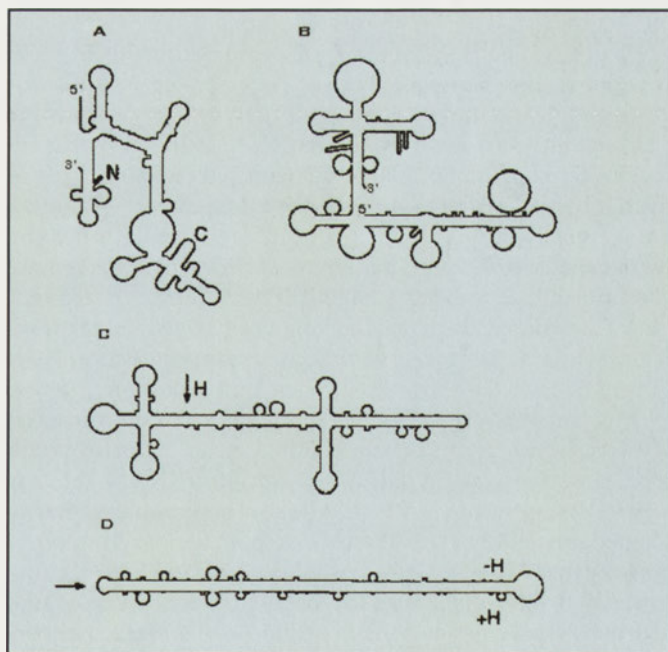
Ze względu na potencjal kodujący, satelity możemy podzielić na dwie grupy. Do pierwszej należą większe satRNA, posiadające otwarte ramki odczytu (ang. *open reading frame*, ORF), których produkty ekspresji mogą odgrywać pewną rolę w replikacji oraz patogenezie. Przykładem jest satRNA wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (*Tomato black ring virus*, TBRV), który zachowuje się jak mRNA. Doświadczalnie wykazano obecność białka, które powstało na nici satRNA w protoplastach zainfekowanych TBRV, natomiast nie zostało zidentyfikowane w zdrowej roślinie [3]. Drugi typ satelitarnego RNA to małe cząsteczki (194-700 nt), które mogą posiadać krótkie ORF, jednak nie kodują żadnych funkcjonalnych białek, np. w rodzaju *Cucumovirus*. Pomimo braku ekspresji białka, satelitarny RNA może mieć duży wpływ na symptomy chorobowe wywoływane przez wirusa pomocniczego. Jego biologiczna aktywność zależy częściowo od sekwencji nukleotydowej i determinowanej przez nią struktury drugorzędowej oraz od prawdopodobnych interakcji z genomowymi RNA i białkami wirusa.

Funkcja ORF większych satRNA nie jest jasna. Większość kodowanych przez nie białek jest zasadowa, o charakterze hydrofobowym, co sugeruje, że mogą pełnić rolę podczas wiązania RNA (przypominają histony) [3]. Możliwe są też inne funkcje, np. w satRNA Y wirusa mozaiki ogórka (*Cucumber mosaic virus*, CMV) wywołującego żółtą mozaikę na tytoniu znaleziono motyw komplementarny do sekwencji tRNA<sup>Glu</sup>. Cząsteczka ta jest kofaktorem w pierwszym etapie syntezy chlorofilu. Możliwe jest więc, że chloroza ta wynika z działania sekwencji satRNA Y jako antysensu, który blo-

Tabela 1. Przykładowe wielkości satelitarnych cząsteczek RNA

Wirus pomocniczy	Liczba nukleotydów satRNA	Masa molowa satRNA (kDa)
CMV	333-342	110-125
PSV	369-386	127
TBSV	~700	231
CyRSV	621	205
TBRV	1,375 <sup>a</sup>	480

a – liczba nukleotydów nie obejmuje ogona poli(A) (wg [3], zmodyfikowane).



Rycina 1. Przykłady drugorzędowych struktur satelitarnych cząsteczek RNA. A: liniowa cząsteczka satRNA B2 CMV; domena C odpowiada za indukcję chlorozy w tytoniu i pomidorze, region N indukuje nekrozę w komórkach pomidora; B: liniowy satRNA TCV; C: kolista replikacyjna forma pośrednia liniowego satelity TRSV; H oznacza lokalizację rybozomu typu „głowa młotka”; D: kolista satRNA LTSV, H+ i H- określają miejsca autokatalityczne, strzałka wskazuje pierwszy rybonukleotyd (wg [3], zmodyfikowane).

kując kofaktor uniemożliwia jego działanie. Wśród wielu hipotez jest również taka, wg której peptyd kodowany przez satRNA może modulować replikazę, preferencyjnie prowadząc syntezę satRNA [1]. Zwarta struktura drugorzędowa satelitarnych RNA powstająca wskutek wysokiego stopnia parowania zasad (około 49–73%) wpływa na ich stabilność zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* [1].

Satelitarne cząsteczki RNA są zwykle replikowane w sposób identyczny jak wirusy ssRNA o dodatniej polarności. Nieliczne, głównie małe i cyrkularne, podlegają temu procesowi wg mechanizmu toczonego się koła. Proces replikacji satRNA odbywa się z udziałem wirusowego kompleksu replikacyjnego. Powielone cząsteczki satelitarne są następnie pakowane do wirionów dzięki wirusowemu białku płaszczka. Często wiele kopii pakowanych jest do jednej cząsteczki, np. w TRSV około 12–25 satRNA znajduje się w jednym wirionie. Z kolei w CMV satelitarny RNA pakowany jest wraz z niciami genomowymi RNA 1 i 2, bądź też w różnej liczbie kopii do cząsteczek nie posiadających żadnych nici genomowych [1]. Pochodzenie tych subwirusowych cząsteczek nie jest jednoznacznie określone. Wydaje się, że pojawienie się satRNA nastąpiło wielokrotnie w czasie ewolucji. Według hipotez wyjaśniających pochodzenie satelitarnych cząsteczek, istnieją trzy możliwe sposoby ich powstawania: 1) od wirusów – wskazuje na to sposób replikacji niektórych z nich, identyczny z replikacją wirusa typu ss(+)RNA, a także niekiedy występująca przy końcach cząsteczek szczątkowa homologia z sekwencjami wirusowymi; 2) od wiroidów, których właściwości niektóre z nich zachowały; 3) na skutek rekombinacji pomiędzy końcowymi sekwencjami wirusa pomocniczego z sekwencjami gospodarza roślinnego. Brak w trakcie ewolucji presji selekcyjnej w stosunku do sekwencji gospodarza mogłoby doprowadzić do dywergencji, tak że pochodzenie od gospodarza przestało być widoczne [1]. Istnieje również hipoteza, że satelitarne RNA pojawiają się spontanicznie w zainfekowanych wirusem tkankach roślinnych [3].

Zsekwencjonowanie wielu satRNA różnych wirusów wykazało nie tylko homologię sekwencji wewnątrz określonych rodzin, ale przede wszystkim podobieństwo do innych patogennych cząsteczek, np. wiroidów, a nawet intronów występujących w eukariotycznym, jądrowym rRNA oraz w genomie mitochondrialnym [1,5]. Przykładem są tu sekwencje satelitarne wirusów mozaiki ogórka (*Cucumber mosaic virus*, CMV) oraz karłowatości orzecha ziemnego (*Peanut stunt virus*, PSV), będących przedstawicielami kukumowirusów. W PSV znajdują się sekwencje homologiczne do intronów występujących w mitochondrialnym genie cytochromu b *cob* u drożdży oraz do jądrowego intronu rRNA u *Tetrahymena*. Poza tym satRNA tych wirusów są komplementarne względem siebie i swoich wirusów pomocniczych w obrębie końców 5' i 3'. Obydwa posiadają strukturę kap (5') oraz grupę hydroksylową (3'), a ich formy dwuniciowe mają niesparowaną guanozynę na końcu 3' nici o ujemnej polarności [1,5]. Badania sekwencji satelitarnych RNA dowiodły istnienia wielu typów tych cząsteczek związanych z tym samym wirusem wspomagającym, co jest wynikiem licznych spontanicznych mutacji. Niewielkie zmiany ich sekwencji nukleotydowej mają wpływ na strukturę przestrzenną, mogą również determinować różne kierunki odpowiedzi rośliny

na infekcję [1]. Istnieją jednak pewne wyjątki – u wirusów LTSV i TRSV zmiany sekwencji satRNA nie mają wpływu ani na biologię, ani na strukturę tych cząsteczek [3].

Na uwagę zasługują także występujące w niektórych wirusów cząsteczki RNA tylko strukturalnie przypominające satelity – tzw. RNA satelitarno-podobne (ang. *satellite-like RNAs*). W przeciwieństwie jednak do satelitarnych RNA, których brak nie pociąga za sobą istotnych konsekwencji dla naturalnego cyklu życiowego wirusa, nieobecność cząsteczek satelitarno-podobnych osłabia znacznie jego aktywność biologiczną i ma zdecydowany wpływ na rozwój choroby i ekspresję symptomów przez tego wirusa wywoływanych. Wydaje się, iż obecność „satelitopodobnych” elementów, obok nici genomowych wirusa pomocniczego, pojawiła się na drodze jego adaptacji do efektywniejszej infekcji. Przykładem jest wirus nekrotycznego żółknięcia nerwów buraka (ang. *Beet necrotic yellow vein virus*, BNYYV), którego genom stanowią nici 1 i 2. Natomiast nici 3, 4, 5 to cząsteczki RNA satelitarno-podobne. Każda z nich posiada otwartą ramkę odczytu i odgrywa rolę w patogenezie wirusa. RNA 3 wpływa na intensywność choroby, RNA 4 zwiększa wydajność transmisji przez wektory grzybowe, zaś RNA 5 wpływa zarówno na rozwój symptomów jak i transmisję wirusa [1,3].

#### RÓŻNORODNOŚĆ SEKWENCJI SATELITARNEGO RNA A WPLYW NA SYMPTOMY CHOROBY; INTERAKCJE SATELITA – WIRUS-ROŚLINA

Największą różnorodnością sekwencji cechują się satRNA wirusów CMV oraz PSV, należące do *Cucumovirus*. Genom tych wirusów stanowią trzy nici ss(+)RNA: RNA 1 i 2 kodujące składniki kompleksu replikacyjnego oraz RNA 3 kodujący białko płaszczka i białko odpowiadające za transport. Podczas transkrypcji powstają dwie nici subgenomowe: RNA 4 powstający na matrycy RNA 3, na którym dochodzi do ekspresji białka płaszczka i RNA 4a powstający na matrycy RNA 2 – kodujący białko 2b (obecne u wszystkich kukumowirusów, funkcjonujące jako supresor procesu wyciszenia genów u roślin). W niektórych izolatach występuje też piąta nić będąca satRNA [6-8]. Najlepiej scharakteryzowane cząsteczki satelitarne tych wirusów to tzw. CARN 5 (ang. *CMV-Associated RNA 5*) oraz PARN 5 (ang. *PSV-Associated RNA 5*), nasilające zmiany nekrotyczne w zainfekowanych tkankach pomidora [1]. Wśród 28 izolatów CMV znaleziono kilkanaście wariantów sekwencji satelitarnych RNA. Niektóre zmiany w sekwencji RNA tych cząsteczek mają wpływ na regulację infekcyjności wirusa oraz proces replikacji [3]. Przekształcenia te nie są przypadkowe, lecz zachodzą w ściśle określonym rejonie. Jeśli w obrębie danego fragmentu, odpowiadającego za pojawianie się ostrych objawów chorobowych zajdzie zmiana kilku nukleotydów, to może to wpłynąć na rodzaj odpowiedzi, indukowanej przez gospodarza roślinnego wskutek zaistniałej infekcji. W wirusie PSV znaleziono satRNA-G, hamujący symptomy chorobowe w tytoniu zainfekowanym PSV oraz satRNA-V, który nie ma wpływu na rozwój choroby. Różnica w sekwencji pomiędzy tymi cząsteczkami wynosi zaledwie 6 nukleotydów (5 substytucji oraz 1 delecja) [9]. Podobnie cząsteczka WL1-satRNA wirusa CMV, hamująca objawy choroby, różni się pozycją 3 nukleotydów w obrębie konserwatywnego rejonu 3' od satRNA CMV nasilających sympto-



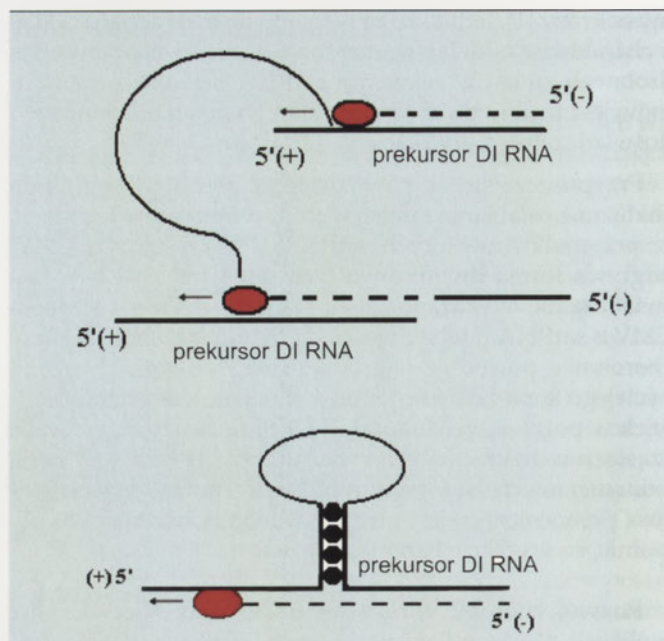


## DEFEKTYWNY RNA

### POCHODZENIE CZĄSTECZEK DEFEKTYWNYCH

Cechą charakterystyczną wszystkich defektywnych elementów jest homologia ich sekwencji z genomem wirusa wspomagającego. Cząsteczki defektywnego RNA (D RNA) posiadają delecje wewnątrz zachowanych kodujących fragmentów genomu macierzystego. W obrębie tych sekwencji znajdują się jednak pewne sygnały do replikacji, procesu pakowania wirionu i akumulacji, rozpoznawane przez kompleksy enzymatyczne dostarczane dzięki wirusowi pomocniczemu. Defektywne RNA, które zakłócają replikację wirusa wspomagającego określane są mianem defektywnych interferujących RNA (DI RNA). Cząsteczki te, by móc się efektywnie namnażać, współzawodniczą z wirusem pomocniczym o kompleks replikacyjny. Taka ingerencja w proces replikacji wirusa przejawia się obniżaniem, bądź zwiększaniem poziomu akumulacji potomnych wirionów, a tym samym zmianą intensywności symptomów chorobowych, które on wywołuje. DI RNA zidentyfikowane zostały w wielu wirusach roślinnych, które posiadają zarówno podzielony, jak i jednoczęściowy genom RNA. Pierwszą taką cząsteczkę wykryto w tkankach pomidora zainfekowanych wirusem krzaczastej karłowatości pomidora (ang. *Tomato bushy stunt virus*, TBSV), należącym do tombuswirusów. Jest to najlepiej scharakteryzowany DI RNA wśród wirusów o niepodzielonym genomie. Z kolei cząsteczką reprezentującą rodziny wirusów o genomie segmentowanym jest DI RNA wirusa pstrości bobiku (ang. *Broad bean mottle virus*, BBMV) należącego do bromowirusów. W przeciwieństwie do DI RNA, cząsteczka D RNA nie oddziałuje na proces replikacji wirusa pomocniczego i jest neutralna dla patogeny [7].

Istnieją dwie teorie tłumaczące powstanie cząsteczek defektywnego RNA. Według pierwszej, DI RNA powstał wskutek „przeskakiwania” replikazy wirusowej, podczas syntezy w inne miejsce na tej samej nici lub na inną matrycę (w przypadku genomów podzielonych), co w efekcie prowadziło do powstania potomnej nici nie w pełni komplementarnej do matrycy. Podczas replikacji na nici matrycowej mogą także powstawać struktury drugorzędowe, które są omijane przez polimerazę. Wskutek tego nici potomna będzie posiadała delecję danego obszaru genomu (Ryc. 2) [4]. Druga koncepcja zakłada, że cząsteczki te są wynikiem replikacji zrekombinowanych nici RNA. Rekombinacje zachodzą najczęściej w tak zwanych „gorących miejscach” (ang. *'hot spots'*), w pobliżu których występują regiony wykazujące duże podobieństwo sekwencji, bogate w pary AU lub zdolne do formowania dupleksów RNA [13,14]. W świetle powyższych teorii defektywne interferujące RNA można podzielić na dwa podstawowe typy. Pierwszy to DI RNA, stanowiący mozaikę fragmentów genomu wirusa pomocniczego, np. u TBSV, wirusa pierścieniowej plamistości storczyka (*Cymbidium ringspot virus*, CyRSV), wirusa kędzierzowatości rzepy (*Turnip crinkle virus*, TCV), wirusa nekrozy ogórka (*Cucumber necrosis virus*, CNV), drugi to cząsteczki powstałe na drodze pojedynczej wewnętrznej delecji w niciach genomowych (np. u CMV, BBMV). Do drugiej grupy zalicza się również defektywny RNA (D RNA), który jest związany z wirusami żółtej mozaiki koniczyny (*Clover yellow mosaic virus*, CIYMV) i mozaiki stokłosa (*Bro-*



Rycina 2. Modele powstawania cząsteczki DI RNA. U góry replikaza (oznaczona kolorem czerwonym) przeskakuje z jednego miejsca do drugiego, co wynika z homologii sekwencji. Poniżej delecja spowodowana komplementarnością sekwencji w obrębie matrycy, która powoduje tworzenie się struktury drugorzędowej, pomijanej przez polimerazę podczas replikacji; strzałki wskazują kierunek poruszania się polimerazy na matrycy (wg [4], zmodyfikowane).

*me mosaic virus*, BMV) [7,13,15]. Przykładowo, defektywny RNA, związany z CMV powstał na nici genomowej RNA 3 poprzez delecję w części kodującej białko 3a (odpowiada za transport z komórki do komórki), z kolei matrycą dla DI RNA wirusa BBMV jest RNA 2, w którym zaszła zmiana w obrębie sekwencji białka 2a (składnika kompleksu replikacyjnego). Mimo, że delecja nie przesuwaa ramki odczytu tuż za usuniętym fragmentem, defektywny RNA nie stanowi matrycy dla funkcjonalnych białek aktywnych w procesach namnażania, transporcie czy pakowaniu. Powstawanie D, DI RNA, jak i wirusów defektywnych stanowi podstawę szybkiego tempa ewolucji, będącego skutkiem adaptacji do nowych warunków środowiska.

### STRUKTURA PIERWSZORZĘDOWA DEFEKTYWNYCH RNA

Defektywne cząsteczki RNA są stosunkowo niewielkie, długość sekwencji wynosi od 400 do 800 nukleotydów. W zależności od sposobu powstawania, mamy DI RNA składające się w większości z przylegających do siebie fragmentów genomu wirusa wspomagającego, bądź stanowiących jego nieuporządkowaną mozaikę. Wspólną cechą naturalnie pojawiających się cząsteczek DI RNA jest zachowanie konserwatywnych sekwencji terminalnych 5' i 3' genomu wirusa pomocniczego, jak i zachowanie za miejscem delecji otwartych ramek odczytu. Przykładowo u tombuswirusów małe DI RNA mają długość około 400–600 nt, co stanowi 10–20% ich genomu [4]. Zbudowane są z kilku konserwowanych, nie przylegających do siebie segmentów nici genomowej. Wśród tych cząsteczek występuje różnorodność wielkości sekwencji spowodowana drobnymi delecjami wewnątrz obszarów konserwowanych. Generalnie mówi się o dwóch klasach DI RNA naturalnie występujących w koinfekcji z tombuswirusami: małych, stanowiących większość

i będących cząsteczkami modelowymi defektywnych RNA oraz dużych, które najprawdopodobniej są formami pośrednimi w powstawaniu tych mniejszych. Typowa cząsteczka zbudowana jest z czterech fragmentów homologicznych z genomem macierzystym: I i IV odpowiednio występujących na końcach 5' i 3' oraz II i III zlokalizowanych wewnątrz nici genomowych. Rejony I i II posiadają odpowiednio kodon start i stop dla białek wchodzących w skład kompleksu replikacyjnego (33 kDa, 92 kDa), natomiast rejony III i IV pochodzą z końca 3' i nie posiadają sekwencji kodujących (Ryc. 3). Często w obszarach konserwowanych (np. IV) występują komplementarne rejony, co prowadzi do tworzenia na ich obszarze struktur drugorzędowych [4,12,16,17].

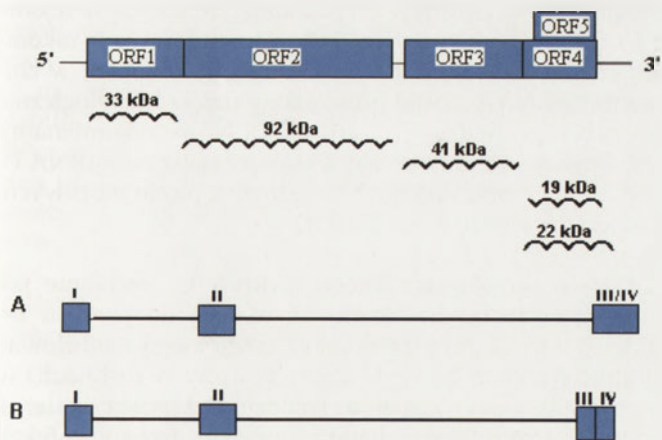
#### INTERFERENCJA Z WIRUSEM WSPOMAGAJĄCYM, AKUMULACJA DI RNA, WPŁYW NA SYMPTOMY CHOROBOWE

Cząsteczki defektywnego interferującego RNA podobnie jak satelitarny RNA, wymagają obecności wirusowego kompleksu replikacyjnego. Głównym efektem obecności DI RNA jest interferencja z replikacją wirusa. Dzięki obecności na nici DI RNA konserwowanych rejonów końcowych, wirusowa polimeraza odnajduje swoje promotory, co umożliwia amplifikację defektywnych cząsteczek. Badania prowadzone w warunkach ograniczonej ilości wirusowej polimerazy dowiodły, że cząsteczki DI RNA współzawodniczą z genomem wirusa o kompleks replikacyjny [4]. Oddziaływania cząsteczek defektywnego interferującego RNA i wirusa nie jest do końca zbadane. Interferencję z wirusem pomocniczym można obserwować na poziomie molekularnym – DI RNA ma wpływ na stężenie i poziom akumulacji wirusowego RNA oraz makroskopowo – wpływ na objawy chorobowe [4]. Akumulacja DI RNA hamuje replikację genomu wirusowego, obniża ilości mRNA dla białek, które wywołują symptomy choroby (np. u tombuswirusów

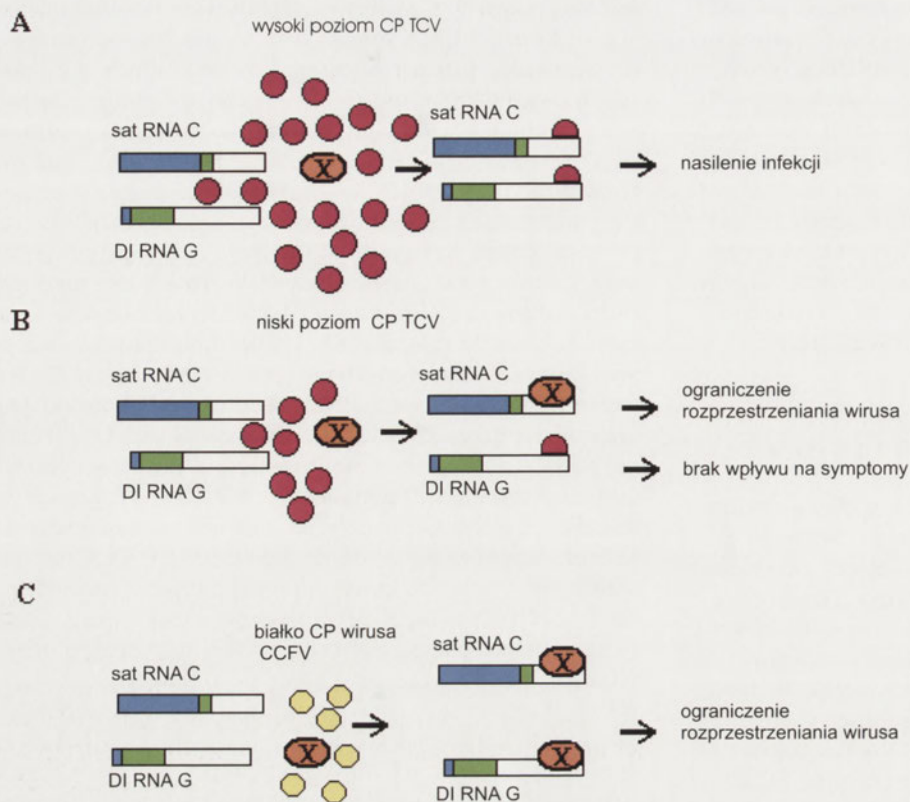
białka 19 i 22 kDa), a tym samym powoduje spadek tempa ich ekspresji [4]. Cząsteczki defektywne zwykle osłabiają wirusy, np. DI RNA wirusa BBMV niweluje ostre objawy towarzyszące infekcji wirusowej u wszystkich gatunków roślin bobowych, za wyjątkiem grochu, u którego obserwuje się nasilenie choroby [6]. Naturalnie związana z wirusem TCV cząsteczka DI RNA G również powoduje nasilenie rozwoju infekcji. DI RNA G jest mozaikową cząsteczką nie przypominającą genomu macierzystego. Spośród sekwencji gospodarza zachowały się w niej tylko rejony końcowe oraz krótkie powtórzone sekwencje, znajdujące się blisko nich. Rośliny zainokulowane DI RNA G oraz dzikim szczepem TCV wykazują nasilone symptomy choroby. Na powierzchni zainfekowanych liści pojawiają się ciemnozielone zabarwienia, zaś na starszych liściach dodatkowo objawy chlorozy, a także karłowatość i skręcanie liści [18]. Nasilenie patogenyzy zależy prawdopodobnie od białka płaszczka (ang. *coat protein*, CP) wirusa TCV. Według tej hipotezy cząsteczka DI RNA G posiada na końcu 3' domenę wiążącą, komplementarną zarówno do sekwencji CP TCV, jak i roślinnego czynnika X, który za pośrednictwem wiązek przewodzących uczestniczy w transporcie wirusa w organizmie rośliny. Białko płaszczka oraz czynnik X konkurują o miejsce wiążące, gdyż związanie czynnika X powoduje zahamowanie transportu wirusa, a tym samym rozwoju choroby. Natomiast związanie CP wirusa TCV do DI RNA G nie ogranicza naturalnych funkcji czynnika X, prowadząc do rozprzestrzeniania cząstek potomnych wirusa w tkankach gospodarza (Ryc. 4) [19].

Warunkami efektywnej akumulacji DI RNA są nie tylko obecność wirusa pomocniczego oraz rejonów promotorowych dla kompleksu replikazy, ale również zachowanie sekwencji kodujących (otwartych ramek odczytu) [4,7,20]. Ponadto zaobserwowano, że długość cząsteczek defektywnych, jak i rodzaj gospodarza roślinnego mają znaczenie w procesie ich akumulacji. Defektywne RNA wykazują specyficzność do gospodarza, a także do określonej tkanki roślinnej [7]. Cząsteczka D RNA u CMV efektywnie replikuje się w zainfekowanych tkankach tytoniu i rozprzestrzenia się w całej roślinie, natomiast w pomidorze namnaża się, ale nie ma możliwości rozprzestrzenienia się w jego tkankach [7]. Obserwacje prowadzone na wielu innych roślinach doprowadziły naukowców do wniosku, że wirusowe białko umożliwiające transport nie wystarcza, by efektywnie rozprzestrzeniać cząsteczki defektywnego RNA w komórkach gospodarzy roślinnych i bardziej istotna jest tu specyficzność tkankowa roślin [7].

Ciekawostką jest występowanie DI w wirionach wirusów satelitarnych, pokazujące, że regulacja przebiegu infekcji może być jeszcze bardziej skomplikowana i wielopoziomowa. Przykładem jest satelitarny wirus mozaiki prosa, SPMV namnażający się w obecności wirusa PMV (ang. *Panicum mosaic virus*). Wirus PMV jest jednocześnie zasocjowany z satRNA oraz wyżej wymienionym wirusem satelitarnym, u którego w trakcie infekcji dochodzi do syntezy DI RNA. Specyficzna interakcja między komponentami tego układu wpływa na kierunki rozwoju choroby wirusowej. Wirus satelitarny SPMV zwiększa akumulację i rozprzestrzenianie wirusa PMV prowadząc do zaostrzenia objawów chlorozy i karłowatości. Wykazuje również



**Rycina 3.** Schemat genomu tombuswirusów oraz naturalnie występującej cząsteczki DI RNA. W DI RNA kolorem niebieskim oznaczono rejony pochodzące z genomu wirusa: białka 33 kDa i 92 kDa zaangażowane są w replikację, 41 kDa to białko płaszczka, 22 kDa białko pośredniczące w transporcie z komórki do komórki i białko 19 kDa również ułatwiające rozprzestrzenianie w tkankach gospodarza roślinnego. A) klasa większych cząsteczek DI RNA zawierająca trzy segmenty homologiczne z genomem tombuswirusów I, II, III/IV, B) klasa mniejszych cząsteczek (modelowa cząsteczka DI RNA), składających się z czterech segmentów I, II, III, IV; cząsteczka jest mniejsza, ponieważ nastąpiła delekcja odcinka homologicznego z genomem pomiędzy regionami III i IV (wg [4], zmodyfikowane).



**Rycina 4.** Wpływ białka płaszczka wirusa TCV na modulowanie infekcji za pośrednictwem cząsteczek subwirusowych zasocjowanych z wirusem TCV. A) wysoki poziom CP wirusa TCV powoduje preferencyjne przyłączanie go do domeny na końcu 3' subwirusowych cząsteczek, co prowadzi do zaostżenia infekcji; B) obniżona ekspresja białka CP powoduje związanie do satRNA C czynnika X, współuczestniczącego w transporcie wirusa w roślinie, co zakłóca jego funkcję i hamuje wirus. CP wiąże się natomiast do DI RNA. Nie ma to jednak wpływu na zakażenie (mechanizm ten jest niewyjaśniony). C) ekspresja białka CP wirusa CCFV zamiast CP wirusa TCV ogranicza chorobę, CP obcego wirusa nie rozpoznaje domeny wiążącej cząsteczek subwirusowych (wg [19], zmodyfikowane).

pewne preferencje do oplaszczania cząsteczek satRNA, które nie mają wpływu na jego akumulację, pozostając niezależne od jego replikacji, jak i transportu. Z kolei cząsteczki DI RNA wirusa SPMV, powstające *de novo* wskutek delecji białka płaszczka, determinującego nasilenie infekcji, zakłócają namnażanie „macierzystego” wirusa SPMV, co w efekcie łagodzi patogenezę. Wynika z tego fakt, że najbardziej istotna w tym układzie jest kompetycja między wirusem satelitarnym a jego DI RNA o czynniki ułatwiające replikację oraz rozprzestrzenianie w komórkach gospodarza [2,21].

## CHIMERYCZNY RNA

### POCHODZENIE I KORELACJE Z WIRUSEM WSPOMAGAJĄCYM

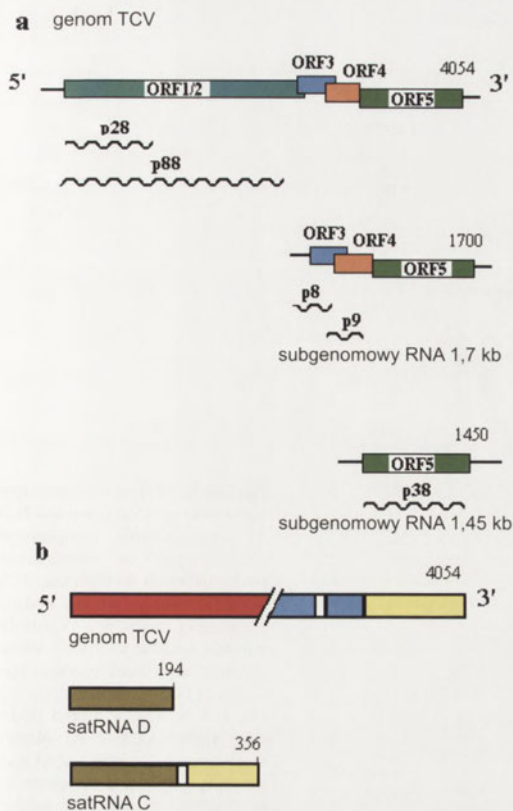
Ostatnim z omawianych subwirusowych elementów jest chimeryczny RNA, powstający w procesie rekombinacji. Cząsteczka taka jest konstruktem zawierającym sekwencje pochodzące z genomu wirusa pomocniczego oraz innych źródeł, np. satelitarnego RNA. Mimo prowadzonych badań istnieje niewiele informacji na temat tych cząsteczek oraz ich przykładów. Jedną z przyczyn jest prawdopodobnie szybkie tempo rekombinacji w świecie wirusów.

Wskutek licznych rearanżacji sekwencji powstają również wirusy, które charakteryzują się chimerycznym genomem. Następstwem tych procesów są zmiany symptomów chorobowych, w stosunku do wywoływanych przez dżkie typy wirusów. Przykładem jest chimeryczny genom RNA wirusa mozaiki wspięgi (*Cowpea mosaic virus*, CPMV), u której objawy infekcji zależą od rodzaju zawartego w genomie wirusa obcego insertu, wielkości białka kodowanego przez tę sekwencję oraz jego punktu izoelektrycznego [22]. Podobne obserwacje dotyczą wirusa żółtej mozaiki rzepy (ang. *Turnip yellow mosaic virus*, TYMV) [23].

Jednym z najlepiej poznanych przykładów subwirusowych chimerycznych cząsteczek jest satelitarny RNA C, związany z wirusem kędzierzowatości rzepy, należącym do karmowirusów. Cząsteczka satRNA C powstała wskutek rekombinacji pomiędzy satelitarnym RNA D, naturalnie zasocjowanym z wirusem TCV, a dwoma segmentami genomu tego wirusa, leżącymi przy jego końcu 3'. Sekwencja tego chimerycznego RNA składa się z 356 par zasad (Ryc. 5). Wskutek dalszego różnicowania na drodze ewolucji cząsteczki satRNA C zmniejszyły homologię sekwencji zarówno z satRNA D jak i

z genomem TCV [24]. Badania dowiodły, że w tkankach zainokulowanych satRNA C (posiadającym delecję w rejonie 5'), satRNA D oraz wirusem TCV zakumulowane są rekombinanty satRNA C/satRNA D. Utracony fragment w chimerze satRNA C został odtworzony dzięki homologicznej sekwencji pochodzącej z satRNA D. Nowe rekombinanty zbudowane są z prawie całej długości cząsteczki satRNA D, połączonej z nią satRNA C w jednym z pięciu możliwych, konserwowanych miejsc [24,25].

Cząsteczki chimerycznego satRNA C, podobnie jak inne subwirusowe elementy wymagają do procesu replikacji wirusa pomocniczego, a także mogą modulować symptomy chorobowe w zainfekowanych roślinach, w których TCV wywołuje patogenezę. Przypuszcza się, iż istotnym czynnikiem determinującym rozwój infekcji jest białko płaszczka (CP) wirusa TCV. Istnieje kilka teorii wyjaśniających wpływ CP na intensywność choroby. W pierwszym etapie, satRNA C zasocjowany z wirusem kędzierzowatości rzepy zakłóca replikację, a przez to formowanie potomnych wirionów wirusa pomocniczego. Prowadzi to do nagromadzenia dużej ilości wolnego białka płaszczka, które jest wirusowym supresorem potranskrypcyjnego wyciszania genów (ang. *post-transcriptional gene silencing*, PTGS), będącego mechanizmem antywiru-



**Rycina 5.** Organizacja genomu TCV; a) pojedyncza nici genomowego RNA koduje 5 otwartych ramek odczytu. Począwszy od końca 5' karmowirusy kodują białka: p28, p88 – biorące udział w replikacji; p88 ulega translacji z tej samej ramki odczytu co białko p28, lecz wskutek supresji kodonu stop produkt ekspresji ulega wydłużeniu; p8 i p9 – uczestniczą w transporcie wirusa w roślinie, ulegają ekspresji z subgenomowego RNA (1,7 kb) oraz p38 – białko płaszczka, powstające na matrycy subgenomowego RNA (1,45 kb); b) porównanie podobieństwa sekwencji między genomem TCV a elementami subwirusowymi – satRNA D oraz chimerycznym satRNA C (wg [24], zmodyfikowane).

sowej obrony roślin [11]. W kolejnym etapie wzrost intensywności infekcji można również tłumaczyć faktem, że nagromadzone białko płaszczka wirusa TCV obniża stabilność satRNA C, ograniczając jednocześnie jego replikację na rzecz zwiększonej akumulacji i replikacji wirusa pomocniczego. W efekcie dochodzi do ostrzejszego przebiegu choroby. Infekcja rośliny samym wirusem TCV wywołuje objawy, takie jak karłowatość oraz skręcanie liści, natomiast w koinfekcji z satRNA C pojawiają się dodatkowo nekrotyczne zmiany tkanek prowadzące w efekcie do śmierci rośliny.

Chimeryczny RNA może również działać w przeciwnym kierunku, niwelując objawy chorobowe, aczkolwiek mechanizmy odpowiadające za taką aktywność nie są do końca poznane. Istotą regulacji infekcji jest wiązanie białka płaszczka wirusa TCV do sekwencji satRNA C. Analogicznie jak w przypadku cząsteczki DI RNA G wirusa TCV, satRNA C posiada na końcu 3' domenę wiążącą białko CP wirusa pomocniczego TCV. Czynniki X konkuruje z CP o miejsce wiążące w satRNA C. Podczas ograniczonej syntezy lub nieobecności CP wirusa TCV roślinny czynnik transportujący wiąże się do subwirusowego RNA uniemożli-

wiając rozprzestrzenianie potomnych cząsteczek wirusa w roślinie, hamując tym samym patogenezę. Z kolei wiązanie białka płaszczka TCV indukuje infekcję (Ryc. 4). Przykładowo, inokulacja rośliny satRNA C wraz ze szczepem TCV posiadającym delecję w obrębie białka płaszczka, lub z wirusem TCV, posiadającym w sekwencji genomu białko płaszczka wirusa chlorotycznej centkowatości rzeżuchy (ang. *Cardamine chlorotic fleck virus*, CCFV), łagodzi objawy choroby, co wynika nie tylko z podwyższonej akumulacji cząsteczek satRNA C i jednoczesnego obniżania poziomu nagromadzenia nici genomowych wirusa pomocniczego, ale przede wszystkim związane jest z hamowaniem transportu wirusa w roślinie (Ryc. 6a, 6b). Wskutek zredukowanej ekspresji CP czynnik X ma większe powinowactwo do satRNA C, natomiast białko płaszczka wirusa CCFV, wykazując niewielkie podobieństwo do sekwencji z CP TCV nie rozpoznaje domeny wiążącej satRNA C, co w efekcie ogranicza wirozę [1,19,25,26].

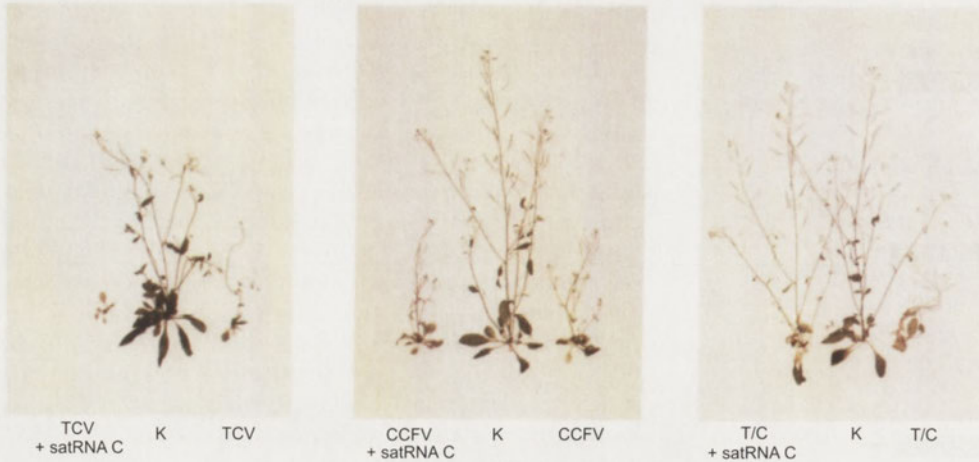
## PODSUMOWANIE

Występowanie subwirusowych cząsteczek RNA u wirusów roślinnych jest dość częstym zjawiskiem. Wpływają one modulującą na i tak już złożone interakcje wirusa z jego gospodarzem podczas infekcji. Cząsteczki te zwykle się niekiedy nazywać „pasożytnymi”, gdyż dla swojej amplifikacji i aktywności wykorzystują mechanizmy wirusa pomocniczego. Jednakże określenie to nie jest do końca adekwatne. Być może to właśnie cząsteczki subwirusowe lub przynajmniej niektóre z nich, osłabiając symptomy infekcji, zapewniły wirusom pomocniczym przetrwanie i rozprzestrzenianie w tkankach gospodarza, a tym samym ich sukces ewolucyjny.

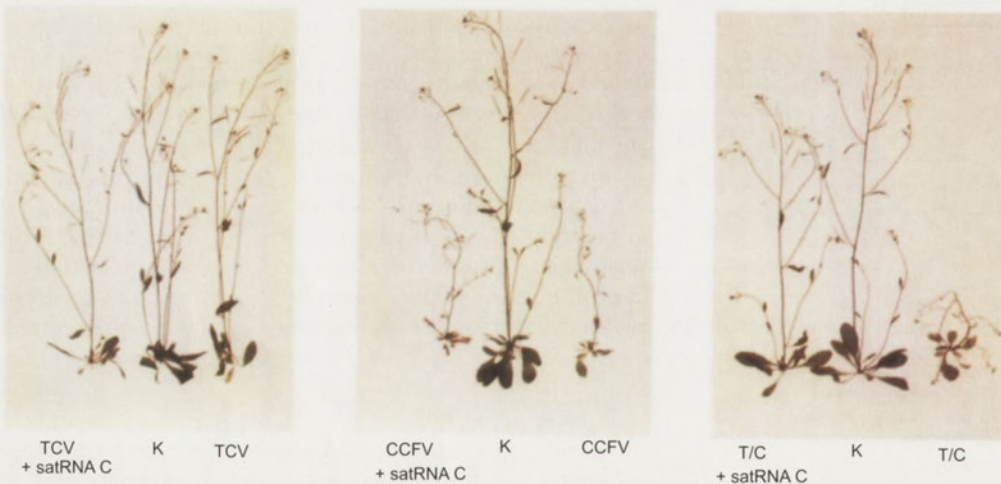
Istnieje wiele hipotez wyjaśniających mechanizmy hamowania, bądź nasilania zakażenia z udziałem cząsteczek subwirusowych. Najczęstszymi sposobami osłabiania objawów chorobowych są zakłócanie replikacji oraz zmiany poziomu akumulacji wirusa. Niektóre satelitarne, defektywne interferujące oraz chimeryczne RNA mogą również kodować domeny wpływające na procesy zachodzące w roślinie. Drobne mutacje w ich sekwencji mogą wpłynąć na kierunek odpowiedzi gospodarza roślinnego. Produkty ekspresji wirusowych genów, za pośrednictwem subwirusowych elementów również mogą indukować, bądź osłabiać odporność roślin na wirozę.

Występowanie subwirusowych cząsteczek w wirusach może mieć także aspekt praktyczny dla upraw. Ze względu na posiadane właściwości można je wykorzystywać w kontrolowaniu przebiegu chorób wirusowych. Zgromadzenie wystarczającej wiedzy na temat struktury, funkcji tych cząsteczek, a także wykazanie ich korelacji z czynnikami roślinnymi biorącymi udział w zapobieganiu infekcji jest szansą na stworzenie skutecznego środka antywirusowego. Być może subwirusowe elementy RNA staną się stabilnymi narzędziami umożliwiającymi zapobieganie chorobom wirusowym, bądź ich ograniczanie, co jest celem badań naukowych. Ten niekonwencjonalny sposób ograniczania wiroz ma istotne znaczenie przy braku możliwości bezpośredniego zwalczania wirusów.

A



B



**Rycina 6.** Wpływ chimerycznej cząsteczki satRNA C wirusa TCV na modulowanie symptomów chorobowych w zainfekowanych roślinach *A. thaliana*. TCV – dziki szcepek wirusa kędzierzawości rzepy; K – kontrola, zdrowa roślina; CCFV – wirus chlorotycznej centkowatości rzęzuchy; T/C – chimeryczny wirus TCV kodujący białko płaszczka wirusa CCFV. A) ekotyp *Arabidopsis thaliana* Col-O (Columbia). SatRNA C zwiększa intensywność infekcji TCV, osłabia symptomy chorobowe wywołane chimerycznym wirusem T/C, natomiast nie ma wpływu na patogenezę powodowaną wirusem CCFV; B) ekotyp *Arabidopsis thaliana* di-O (Dijon) (posiada gen warunkujący odporność na TCV); satRNA C nie ma wpływu na rozwój infekcji TCV, jest neutralny w stosunku do patogenezę wywołanej wirusem CCFV oraz hamuje zakażenie wirusem T/C (wg [25], za zgodą).

## PIŚMIENICTWO

- Hull R (2002) *Matthews' Plant Virology; Viroids, satellite viruses and satellite RNAs; Induction of disease 2: virus-plant interactions*. Academic Press, John Innes Center, Norwich, U.K., str. 593-626, 477-478
- Qiu W, Scholthof KG (2000) In vitro- and in vivo-generated defective RNAs of satellite panicum mosaic virus define cis-acting RNA elements required for replication and movement. *J Virology* 74: 2247-2254
- Roossinck MJ, Sleat D, Palukaitis P (1992) Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. *Microbiol Rev* 56: 265-279
- White KA (1996) Formation and evolution of tombusvirus defective interfering RNAs. *Sem Virol* 7: 409-416
- Collmer CW, Hadidi A, Kaper JM (1985) Nucleotide sequence of the satellite of peanut stunt virus reveals structural homologies with viroids and certain nuclear and mitochondrial introns. *Biochemistry* 24: 3110-3114
- Graves MV, Roossinck MJ (1995) Characterization of defective RNAs derived from RNA 3 of the fny strain of cucumber mosaic cucumovirus. *J Virology* 69: 4746-4751
- Graves MV, Pogany J, Romero J (1996) Defective interfering RNAs and defective viruses associated with multipartite RNA viruses of plants. *Sem Virol* 7: 399-408
- Kwon CS, Chung WON-II (2000) Differential roles of the 5' untranslated regions of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2, 3 and 4 in translational competition. *Virus Res* 66: 175-185
- Naidu RA, Collins GB, Ghabrial SA (1992) Peanut stunt virus satellite RNA: analysis of sequences that affect symptom attenuation in tobacco. *Virology* 189: 668-677
- Po T, Steger G, Rosenbaum V, Kaper J, Riesner D (1987) Double-stranded cucumovirus associated RNA 5: experimental analysis of necrogenic and non-necrogenic variants by temperature gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acid Res* 15: 5069-5083
- Simon AE, Roossinck MJ, Havelda Z (2004) Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new century. *Annu Rev Phytopathol* 42: 415-437
- Rubio T, Borja M, Scholthof HB, Feldstein PA, Morris TJ, Jackson AO (1999) Broad-spectrum protection against tombusviruses elicited by defective interfering RNAs in transgenic plants. *J Virology* 73: 5070-5078
- Chang YC, Borja M, Scholthof HB, Jackson AO, Morris TJ (1995) Host effects and sequences essential for accumulation of defective interfering RNAs of cucumber necrosis and tomato bushy stunt tombusviruses. *Virology* 210: 41-53
- Cheng CP, Pogany J, Nagy PD (2002) Mechanism of DI RNA formation in tombusviruses: dissecting the requirement for primer extension by the tombusvirus RNA dependent RNA polymerase in vitro. *Virology* 304: 460-473
- Damayanti TA, Nagano H, Mise K, Furusawa J, Okuno T (1999) Bromo mosaic virus defective RNAs generated during infection of barley plants. *J Gen Virol* 80: 2511-2518

16. Cheng CP, Nagy PD (2003) Mechanism of RNA recombination in carmo- and tombusviruses: evidence for template switching by the RNA-dependent RNA polymerase *in vitro*. *J Virol* 77: 12033-12047
17. Szittyá G, Salamon P, Burgyán J (2000) The complete nucleotide sequence and synthesis of infectious RNA of genomic and defective interfering RNAs of TBSV-P. *Virus Res* 69: 131-136
18. Li XH, Heaton LA, Morris TJ, Simon AE (1989) Turnip crinkle virus defective interfering RNAs intensify viral symptoms and are generated *de novo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9173-9177
19. Wang J, Simon AE (2000) 3'-end stem-loops of the subviral RNAs associated with turnip crinkle virus are involved in symptom modulation and coat protein binding. *J Virology* 74: 6528-6537
20. Zhang C, Simon AE (1994) Effect of template size on accumulation of defective interfering RNAs in protoplasts. *J Virol* 68: 8466-8469
21. Qiu W, Scholthof KG (2001) Defective interfering RNAs of a satellite virus. *J Virol* 75: 5429-5432
22. Porta C, Spall VE, Findlay KC, Gergerich RC, Farrance CE, Lomonosoff GP (2003) Cowpea mosaic virus-based chimaeras. Effects of peptides on the phenotype, host range, and transmissibility of the modified viruses. *Virology* 310: 50-63
23. Goodwin JB, Skuzeski JM, Dreher TW (1997) Characterization of chimeric turnip yellow mosaic virus genomes that are infectious in the absence of aminoacylation. *Virology* 230: 113-124
24. Simon AE, Nagy PD (1996) RNA recombination in turnip crinkle virus: its role in formation of chimeric RNAs, multimers, and in 3'-end repair. *Sem Virol* 7: 373-379
25. Kong Q, Oh JW, Simon AE (1995) Symptom attenuation by a normally virulent satellite RNA of turnip crinkle virus is associated with the coat protein open reading frame. *Plant Cell* 7: 1625-1634
26. Kong Q, Wang J, Simon AE (1997) Satellite RNA - mediated resistance to turnip crinkle virus in Arabidopsis involves a reduction in virus movement. *Plant Cell* 9: 2051-2063

## Subviral molecules of RNA associated with plant ss(+)RNA viruses

Marta Pelczyk<sup>1</sup>, Aleksandra Obrepalska-Stęplowska<sup>1,✉</sup>, Henryk Pospieszny<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Interdepartmental Laboratory of Molecular Biology, Institute of Plant Protection, 20 Miczurina St., 60-318 Poznań, Poland

<sup>2</sup>Department of Virology and Bacteriology, Institute of Plant Protection, 20 Miczurina St., 60-318 Poznań, Poland

✉e-mail: ao.steplowska@ior.poznan.pl

**Key words:** satellite RNA (satRNA), defective RNA (D RNA), defective interfering RNA (DI RNA), chimeric RNA

### ABSTRACT

Plant ss(+)RNA viruses besides their genome RNAs often are associated with additional subviral RNA molecules which occur naturally or are generated *de novo* during infection. There are such molecules like: satellite, defective, defective interfering and chimeric RNAs. Subviral RNAs can not replicate and encapsidate by oneself. Helper viruses supply the protein complexes that are necessary to these processes. The subviral molecules are characterized by small size. Recombination, deletion and accumulation of mutation are the main ways of arising subviral elements, although the origin of satRNAs is unknown. The unique feature of subviral RNAs is their ability to modify of infection progress caused by helper virus. They can attenuate or enhance the intensity of disease symptoms. The overall influence on disease development depends on three-component complex consisting of: plant host-virus' strain – subviral RNA. This article is a synthetic review of information concerning subviral RNA molecules of plant viruses, their structure, functions and origin.

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

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

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

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

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

## WSKAZÓWKI SZCZEGÓŁOWE:

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

## PRZYGOTOWANIE MANUSKRYPTU:

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

## ORGANIZACJA MANUSKRYPTU:

Wskazany jest podział artykułu na nienumerowane rozdziały i podrozdziały.

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

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

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

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

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

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

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

Prace w formie elektronicznej prosimy przysyłać na adres:

[postepy@nencki.gov.pl](mailto:postepy@nencki.gov.pl)

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

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



# CYTOMETR PRZEPEŁYWOWY

## BD FACSCanto II



BADAJ WIĘCEJ

ODKRYWAJ

WIĘCEJ

PRZY POMOCY

**BD FACSCANTO II**

*Najnowszego  
Cytometru BD*

Idealnego do badań  
naukowych oraz  
diagnostyki klinicznej

- BD FACSCanto II może mierzyć do **8 kolorów** z **dwu** lub **trzech** laserów
- Pełna automatyka pracy i obsługi
- Może być wyposażony w Automatyczny Podajnik Probówek albo w moduł HTS – Podajnik z płytek wielodołkowych

BD Biosciences, ul. Królowej Marysieńki 90, 02-954 Warszawa

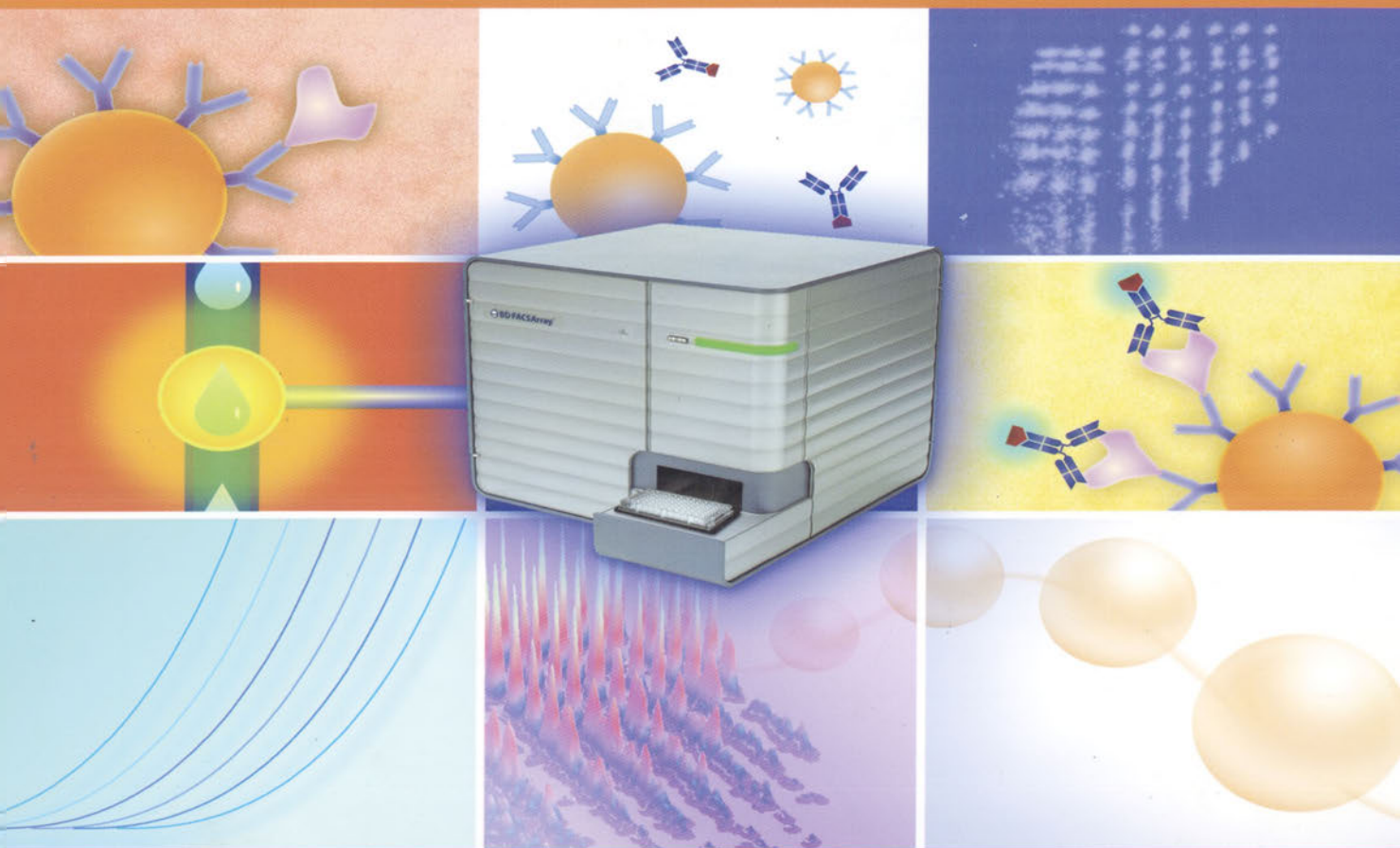
tel.: +48 22 651 75 88, faks: +48 22 651 75 89

<http://rcin.org.pl>  
[www.bdbeurope.com](http://www.bdbeurope.com)



**BD**

# UŻYWASZ TESTÓW ELISA I MASZ CYTOMETR PRZEPEŁYWOWY



## W naszej ofercie posiadamy zestawy ELISA na cytometr: **FlexSet**

- Zestawy do **ilościowego** oznaczania **cytokin i chemokin** w surowicy, płynach ustrojowych i nadsączach hodowlanych
- Zestawy do **ilościowego** oznaczania **białek sygnałowych** – całkowitych i/lub ufosforylowanych w lizatach komórkowych
- **FlexSet zawiera:** kulki opłaszczane przeciwciałami monoklonalnymi wiążącymi badane białka, przeciwciała wykrywające połączone z PE oraz zestaw buforów. Każdy FlexSet zawiera także rekombinowane standardy oznaczanych białek.
- W **50 µl** próbki można oznaczyć jednocześnie do **72 białek**

**Zapewniamy fachową pomoc przy wdrażaniu pomiarów  
z naszymi odczynnikami na cytometrze.**

BD Biosciences, ul. Królowej Marysieńki 90, 02-954

Warszawa

tel.: +48 22 651 75 88, faks: +48 22 651 75 89

www.bdbeurope.com



# BD