

POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2008
TOM 54
NUMER 4

Błędy w odszyfrowywaniu informacji genetycznej
siRNA skierowane przeciwko telomerazie
Metabolizm siarki w roślinach i jego regulacja



5 LAT



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medlinie /PubMed

www.postepybiochemii.pl

<http://rcin.org.pl>

Benzonase[®] Nuclease

Calbiochem[®]

Novagen[®]

Novabiochem

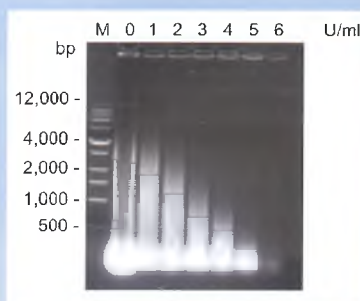
Efektywna redukcja lepkości i usuwanie kwasów nukleinowych z ekstraktów białkowych

- Degraduje wszystkie formy DNA i RNA.
- Efektywna w szerokim zakresie warunków działania.
- Wyjątkowo wysoka specyficzna aktywność.
- Idealna do usuwania kwasów nukleinowych z ekstraktów białek rekombinowanych.
- Redukuje lepkość, skraca czas wykonywania preparatów oraz poprawia wydajność otrzymywania białek z ekstraktów komórkowych.
- Poprawia rozdział prążków białek na żelach poliakrylamidowych.

Benzonase[®] Nuclease degraduje wszystkie formy DNA i RNA i nie wykazuje żadnej aktywności proteolitycznej. Jest idealna m.in. do usuwania chromosomalnego DNA, znacznie redukując lepkość ekstraktów białek rekombinowanych z *E. coli*. Enzym ten współdziała z odczynnikami do ekstrakcji białek - BugBuster[®] i PopCulture[®], znacznie zwiększając wydajność procesu ekstrakcji. Benzonase[®] może być również wykorzystywana podczas oczyszczania białek z kultur komórek owadzych lub ssaczy.



Zmniejszenie lepkości preparatu z zastosowaniem Benzonase[®].



Trawienie kwasów nukleinowych z zastosowaniem Benzonase[®].

Więcej informacji na:
www.merckbio.eu/Benzonase

Nazwa produktu

Nr kat.

Opk.

Cena*

Benzonase [®] Nuclease, czystość > 90% (25 U/μl)	70746-4	2.5 KU	158 zł
Benzonase [®] Nuclease, czystość > 90% (25 U/μl)	70746-3	10 KU	435 zł
Benzonase [®] Nuclease, czystość > 99% (25 U/μl)	70664-3	10 KU	654 zł
Benzonase [®] Nuclease HC, czystość > 90% (250 U/μl)	71205-3	25 KU	704 zł
Benzonase [®] Nuclease HC, czystość > 99% (250 U/μl)	71206-3	25 KU	1 351 zł

Definicja 1 jednostki Benzonase[®]: jest to taka ilość enzymu, która jest wymagana do zdegradowania 37 μg DNA, w czasie 30 min, w temp. 37°C. KU = 1 000 U.

Merck Sp. z o.o.
Aleje Jerozolimskie 178
02-486 Warszawa
tel.: 022 53 59 770
fax: 022 53 59 945
dzial.handlowy@merck.pl
www.merck.pl

Zapraszamy do sklepu internetowego

<https://mecomm.merck.pl>

* Cena nie zawiera podatku VAT (7%). Przy zamówieniu prosimy powołać się na kod promocji 13/2008, która jest ważna do 31 grudnia 2008 r. Promocja nie sumuje się z innymi zniżkami i ofertami specjalnymi.



<http://rcin.org.pl>



W NASTĘPNYM NUMERZE:

- Uracyl w DNA – przyjaciel czy wróg?**
Iza Roman, Ryszard Oliński, Marek Jurgowiak
- Regulacja ekspresji genu PAI-1**
Paulina Wyrzykowska, Aneta Kasza
- FHIT – białko zaangażowane apoptozę i regulację cyklu komórkowego**
Róża Pęcherzewska, Barbara Nawrot

Rysunek na okładce:
Pirył, zaczerpnięto z <http://www.gc.maricopa.edu/earthsci/imagearchive/pictu-re60.htm>

Pięćdziesiąt lat działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego Lech Wojtczak	327
Sprawozdanie z Kongresu Biochemii i Biologii Komórki w Olsztynie Elżbieta Kostyra, Jerzy Moraczewski	333
Rozstrzygnięcie konkursu Doktoraty 2007 Aleksandra Ellert-Miklaszewska	336

WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

Wiadomości krajowe pod red. Teresy Wesołowskiej	339
List do Redakcji Edward Bańkowski	347

ARTYKUŁY SPONSOROWANE

Systemy genów reporterowych opartych na zjawisku bioluminescencji – artykuł sponsorowany przez firmę Promega Corporation Simon T. M. Allard	350
---	-----

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Błędy w odszyfrowywaniu informacji genetycznej – rola rybosomalnego miejsca E Kamilla Bąkowska-Żywicka, Marta Sikora, Tomasz Twardowski	354
Glikozylazy DNA uracylu ssaków Dariusz Pytel, Artur Słupianek, Dominika Książek, Tomasz Skórski, Janusz Błasiak	362
Plazmocytoidalne komórki dendrytycznych patofizjologii procesów odpornościowych Paulina Kulig, Karolina Wawro, Joanna Cichy	371
Kinazy Src w procesie dojrzewania progenitorów megakariocytów Joanna Kamińska, Edyta Klimczak-Jajor, Urszula Bany-Łaszewicz	378
siRNA skierowane przeciwko telomerazie – skuteczne narzędzie w leczeniu nowotworów? Błażej Rubiś, Anna Półrolniczak, Maria Rybczyńska	384
Molekularne odpowiedzi aparatu fotosyntetycznego roślin na długoterminowe zmiany natężenia światła Małgorzata Adamiec, Grzegorz Jackowski	393
Metabolizm siarki w roślinach i jego regulacja Grzegorz Moniuszko, Agnieszka Sirko	402
Receptory sprzężone z białkami G, heterotrimeryczne białka Gi białka efektorowe roślin Stanisław Kowalczyk, Anna Hetmann	412
Regulacja ekspresji genów w komórce bakteryjnej przy udziale białek z rodziny Fur Marcin Szafran, Teresa Olczak	423
Fluorescencyjne metody badania oligomeryzacji receptorów związanych z białkami G Katarzyna Grymek, Magdalena Gąska, Sylwia Łukasiewicz, Andrzej Górecki, Marta Dziedzicka-Wasylewska	431

Events/Opinions/Comments	327
REVIEWS	
Bioluminescent Reporter Genes	350
Decoding errors – function of the ribosomal E site	354
Uracil-DNA glycosylases	362
Plasmacytoid dendritic cells in pathophysiology of immune responses	371
Src kinases in the process of maturation megakaryocyte progenitors	378
siRNA targeting telomerase – effective tool in anti-cancer therapy?	384
Molecular responses of photosynthetic apparatus of plants to long term irradiance changes	393
Sulfur metabolism and its regulation in plants	402
G-protein-coupled receptors, heterotrimeric. G-proteins and protein effectors in plants	412
Regulation of gene expression in the bacterial cell by Fur family proteins	423
Fluorescence studies of G-protein coupled receptors oligomerization	431

IV edycja konkursu na najlepszą pracę doktorską z biochemii w 2008 roku

Polskie Towarzystwo Biochemiczne i firma Merck Sp. z o.o. ogłasza trzecią edycję konkursu na najlepszą pracę doktorską z biochemii wykonaną w polskiej instytucji naukowej. Warunkiem uczestnictwa jest przyznanie autorowi pracy tytułu doktora przez właściwą radę naukową lub radę wydziału w 2008 roku. Nagroda obejmuje premię pieniężną dla autora w wysokości 4 500 zł, ufundowaną przez firmę Merck, oraz opublikowanie tej doktoratu w 4 numerze kwartalnika „Postępy Biochemii” w 2009 roku. Nagrodę przyznaje Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w porozumieniu z firmą Merck.

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

Zgłoszenia w formie listu przewodniego wraz pracą doktorską w formacie pdf należy przesłać w nieprzekraczalnym terminie do 31 maja 2009 roku, tylko drogą elektroniczną na adres:

s.pikula@nencki.gov.pl

Rollstrzygnięcie konkursu nastąpi do 31 sierpnia 2009 roku, a uroczyste wręczenie Nagrody odbędzie się na dorocznym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego we wrześniu 2009 roku.

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

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

PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII

OLYMPUS
Your Vision, Our Future

MERCK

Polska Sieć Mitochondrialna
www.mitonet.pl

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NEW Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X)

High specificity



All the advantages at a glance

- **Specificity** – Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase and the optimized buffer eliminate non-specific amplification and formation of primer dimers.
- **Sensitivity** – detects low copy number targets.
- **Wide linear range** – accurate quantification across 9 orders of magnitude.
- **Universal** – can be used on most real-time thermal cyclers.
- **Reproducibility and convenience** – ready-to-use 2X master mix minimizes pipetting error and reduces set-up time.

Applications

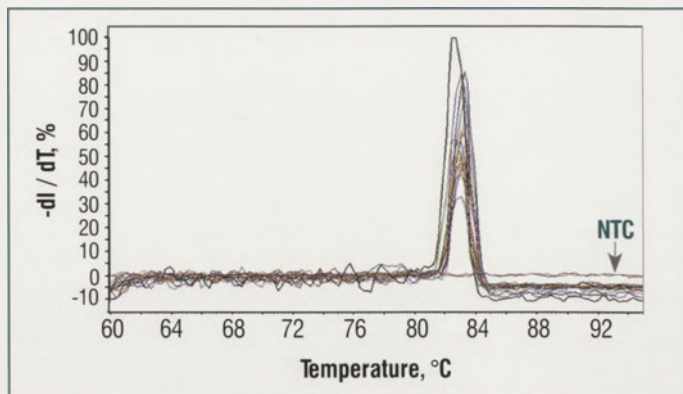
- Real-time PCR using SYBR Green dye.
- Real-time RT-PCR using SYBR Green dye.

Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X)

Cat. No. Appl.

K0221 2x1.25 ml (for 200 reactions of 25 µl)

K0222 10x1.25 ml (for 1000 reactions of 25 µl)



Melting curve analysis confirms high qPCR specificity.

Amplification of 10-fold dilutions of supercoiled plasmid DNA, starting from 10 ng down to 0.1 fg, using the Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X) in duplicate reactions. Reactions were performed on the Eppendorf Mastercycler® ep realplex instrument. NTC is the non-template control.

NEW Maxima™ Probe qPCR Master Mix (2X)

High sensitivity



All the advantages at a glance

- **Sensitivity** – detects low copy number targets.
- **Specificity** – Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase and the optimized buffer eliminate non-specific amplification and formation of primer dimers.
- **Wide linear range** – accurate quantification across 9 orders of magnitude.
- **Universal** – can be used with sequence-specific probes on most real-time thermal cyclers.
- **Reproducibility and convenience** – ready-to-use 2X master mix minimizes pipetting error and reduces set-up time.

Applications

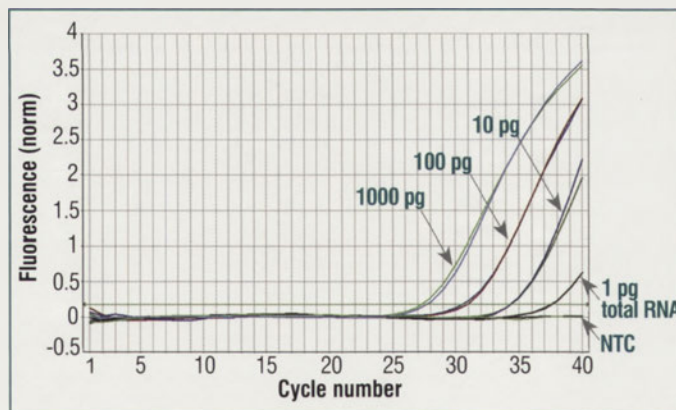
- Real-time PCR using sequence-specific probes.
- Real-time RT-PCR using sequence-specific probes

Maxima™ Probe qPCR Master Mix (2X)

Cat. No. Appl.

K0231 2x1.25 ml (for 200 reactions of 25 µl)

K0232 10x1.25 ml (for 1000 reactions of 25 µl)



Highly sensitive two step qRT-PCR.

Amplification of human PPP1CA gene was performed on serial 10-fold dilutions of Jurkat cell total RNA (from 1 ng to 1 pg). First strand cDNA was generated with the RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1621). cDNA was amplified with the Maxima™ Probe qPCR Master Mix (2X) using the TaqMan® assay specific for PPP1CA. Reactions were performed on an ABI PRISM® 7000 instrument. 1 pg of total RNA was successfully detected. NTC is the non-template control.

Collect, Preserve and Separate

Innovative Sample Standardization and Preparation
for High Quality Clinical Research and Diagnostic Studies



BD Vacutainer® CPT™

One-Step mononuclear cell separation

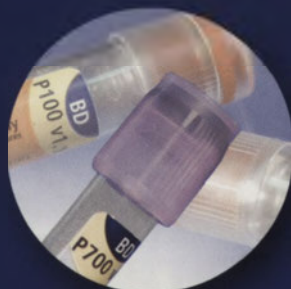
BD Vacutainer® PPT™

High quality plasma preparation



PAXgene® Blood RNA

Immediate preservation of RNA in blood samples



BD™ P100

Immediate preservation of high quality
plasma proteins for proteomics studies

BD™ P700

On-board stabilization of plasma
GLP-1 for metabolic studies



BD™ Free Flow Electrophoresis

High resolution separation of
native proteins and their isoforms



Helping all people
live healthy lives

For more information, contact us at:

www.bd.com/vacutainer/molecular • www.bd.com/proteomics

Becton Dickinson Polska Sp. z o.o.

Tel. 022 651 75 89

E-mail: MDx_Px@europe.bd.com

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2008 BD
Paxgene is a trademark of PreAnalytiX GmbH
CDS_050808_01

<http://rcin.org.pl>

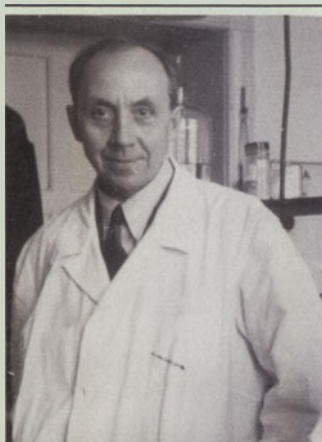
PIĘĆDZIESIĄT LAT DZIAŁALNOŚCI POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Lech Wojtczak

POWSTANIE I ROZWÓJ TOWARZYSTWA

Polskie Towarzystwo Biochemiczne powstało przez wyodrębnienie z Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego.

Przed wojną i w pierwszym okresie powojennym naukowcy pracujący w zakresie biochemii skupiali się głównie w powstałym jeszcze w okresie międzywojennym Polskim Towarzystwie Fizjologicznym. Stopniowo narastała jednak świadomość odrębności biochemii w stosunku do innych nauk fizjologicznych. Wyrazem tego stała się inicjatywa kilkunastu wybitnych profesorów wchodzących w skład Komitetu Biochemii Polskiej Akademii Nauk powołania do życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Pod koniec 1957 roku powstała grupa założycielska pod przewodnictwem prof. Włodzimierza Niemierki (Fot. 1), profesora Uniwersytetu Warszawskiego i jednocześnie kierownika Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, której zadaniem było utworzenie naszego Towarzystwa. Zarejestrowanie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i wciągnięcie do rejestru stowarzyszeń nastąpiło 22 marca 1958 roku i datę tę przyjmujemy jako oficjalny termin narodzin naszego Towarzystwa. Tymczasowy Zarząd pod kierownictwem Włodzimierza Niemierki rozpoczął przyjmowanie członków i zakładanie struktur Towarzystwa. W rezultacie 12 grudnia tego samego roku odby-

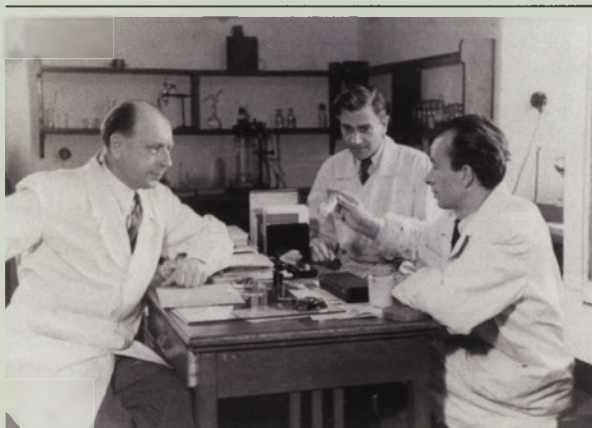


Fotografia 1. Prof. Włodzimierz Niemierko (1897-1985), przewodniczący Komitetu Założycielskiego (1957) i Zarządu Tymczasowego (1958) Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

ło się w Warszawie pierwsze Walne Zebranie, które wyłoniło pierwszy, powołany w wyniku wyborów, Zarząd Główny. Na jego czele stanął wybitny krakowski biochemik, profesor Uniwersytetu Jagiellońskiego, a następnie krakowskiej Akademii Medycznej, Bolesław Skarżyński (Fot. 2). Towarzystwo nasze liczyło wówczas około 200 członków.

Pierwszy statut Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zakładał dwuletnią kadencję władz. W wyniku zmiany statutu w 1972 r. kadencję tę przedłużono do lat

trzech. Tabela 1 pokazuje terminy i miejsca kolejnych Walnych Zebrań Towarzystwa. Warto w tym miejscu przypomnieć, że statut Polskiego To-



Fotografia 2. Prof. Bolesław Skarżyński (1901-1963), pierwszy Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1958-1961. Po prawej jego asystenci, Tadeusz Szczepkowski i Włodzimierz Ostrowski.

warzystwa Biochemicznego dopuszcza pełnienie funkcji prezesa tylko przez dwie kolejne kadencje, lecz nie wyklucza możliwości ponownego wyboru po przerwie.

Tabela 1. Walne Zebrania i wybrani na nich Prezesi.

Nr Walnego Zebrania i kadencji	Rok	Miejsce Walnego Zebrania	Nazwisko wybranego Prezesa i Oddział, z którego pochodził
I	1958	Warszawa	Bolesław Skarżyński (Kraków)
II	1961	Warszawa	Bronisław Filipowicz (Łódź)
III	1963	Łódź	Kazimierz Zakrzewski (Warszawa)
IV	1965	Gdańsk	Kazimierz Zakrzewski (Warszawa)
V	1967	Kraków	Zofia Zielińska (Warszawa)
VI	1969	Wrocław	Zofia Zielińska (Warszawa)
VII	1971	Katowice	Tomasz Borkowski (Lublin)
VIII	1974	Warszawa	Lech Wojtczak (Warszawa)
IX	1977	Gdańsk	Lech Wojtczak (Warszawa)
X	1980	Warszawa	Kazimierz Zakrzewski (Warszawa)
XI	1983	Szczecin	Kazimierz Zakrzewski (Warszawa)
XII	1986	Katowice	Zofia Porębska (Warszawa)
XIII	1989	Toruń	Zofia Porębska (Warszawa)
XIV	1992	Łódź	Liliana Konarska (Warszawa)
XV	1995	Warszawa	Liliana Konarska (Warszawa)
XVI	1998	Białystok	Jolanta Barańska (Warszawa)
XVII	2001	Toruń	Jolanta Barańska (Warszawa)
XVIII	2005	Lublin	Lech Wojtczak (Warszawa)
XIX	2008	Olsztyn	Andrzej Dżugaj (Wrocław)

Statutową siedzibą Towarzystwa jest miasto stołeczne Warszawa. Władze Polskiej Akademii Nauk przyznały Towarzystwu skromny lokal w gmachu przy ul. Freta 16, gdzie już wcześniej ulokowano Polskie Towarzystwo Chemiczne. Jest to historyczny budynek (Fot. 3), w którym



Fotografia 3. Pierwsza siedziba Zarządu Głównego Towarzystwa w Warszawie przy ul. Freta 16.

przyszła na świat Maria Skłodowska-Curie. Mieści się w nim również poświęcone jej muzeum. W 1998 r. biuro Zarządu Głównego przeniosło się do gmachu Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego przy ul. Pasteura 3, którego dyrekcja udostępniła naszemu Towarzystwu znacznie wygodniejsze pomieszczenie. Mieszczą się tam również redakcje obu wydawanych przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne czasopism, „Postępów Biochemii” i „Acta Biochimica Polonica”. Więcej informacji o pierwszych piętnastu latach działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego znajdzie Czytelnik w opracowaniu prof. Bronisława Filipowicza [1].

Liczba członków Towarzystwa szybko rosła i już w 1974 r. przekroczyła 1000. W następnych latach wzrost ilościowy był znacznie wolniejszy. Wprawdzie przybywało nowych członków, lecz starsze pokolenia odchodziły na emeryturę. Wiele osób zmieniało miejsce pracy i zamieszkania. Niektórzy wyjeżdżali na dłuższy okres lub na stałe za granicę. Dość częste były również przypadki wieloletniego zalegania przez członków z opłacaniem składek. W rezultacie władze Towarzystwa utraciły kontakt z częścią swych członków i przez pewien czas dokładną liczebność naszego Towarzystwa trudno było ustalić.

Zarząd Główny kadencji 2005–2008 wykonał żmudną pracę uporządkowania listy członków, w wyniku czego skreślono z listy członków osoby, z którymi nie udało się, mimo wielokrotnych prób, nawiązać kontaktu, a także członków zalegających, mimo upomnień, z opłacaniem składek. W rezultacie lista członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w drugiej połowie 2008 r. zamknęła się liczbą około 1200.

Zgodnie ze statutem „członkiem zwyczajnym Polskiego Towarzystwa Biochemicznego może być obywatel polski lub obcy posiadający dorobek naukowy z biochemii lub dziedzin pokrewnych”. Wymóg dorobku naukowego, rozumiany jako posiadanie przez kandydata na członka przynajmniej jednej pełnej publikacji (lecz na przykład nie streszczenia komunikatu zjazdowego), był przez wiele lat rygorystycznie przestrzegany. Jednakże pod koniec ubiegłego stulecia, kiedy szeroko otworzyły się, również dla młodych doktorantów i studentów, możliwości naukowych wyjazdów zagranicznych, w tym na kursy organizowane przez Federację Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS) oraz możliwość ubiegania się o stypendia FEBS, coraz liczniej zaczęli się do naszego Towarzystwa zgłaszać młodzi biochemicy, nie mogący wykazać się publikacjami naukowymi w takim rozumieniu. FEBS bowiem uzależniał udzielanie wsparcia finansowego na te wyjazdy od przynależności kandydata do jednego z krajowych towarzystw biochemicznych zrzeszonych w Federacji. By wyjść naprzeciw tym wymaganiom, Zarząd Główny w 1995 r. postanowił rozszerzyć możliwości przynależności do Towarzystw tworząc status „członka-studenta”, który nie byłby obowiązany wykazywać się dorobkiem naukowym, ale też nie miałby pełnych praw członkowskich, przede wszystkim praw wyborczych do władz Towarzystwa i prawa głosu stanowiącego na Walnym Zebraniu. Krok ten otworzył wrota Towarzystwa licznej rzeszy młodzieży biochemicznej i tym samym umożliwił wielu z niej skorzystanie z różnego rodzaju bardzo atrakcyjnej pomocy finansowej ze strony FEBS. Władze Towarzystwa były jednak świadome niezgodności tego rodzaju członkostwa ze statutem Towarzystwa, któ-

ry jasno stwierdzał, że „członkowie zwyczajni Towarzystwa mają prawo do ... czynnego i biernego wyboru do władz Towarzystwa”. By znaleźć wyjście z tej kłopotliwej sytuacji, Zarząd Główny minionej kadencji (2005–2008) zaprzestał przyjmowania nowych członków na status członka-studenta, natomiast znacznie złagodził definicję dorobku naukowego, uznając za takowy również krótkie doniesienia zjazdowe, a także prace magisterskie i licencjackie z biochemii lub nauk pokrewnych.

Statut Towarzystwa przewiduje tworzenie Oddziałów w ośrodkach akademickich skupiających co najmniej 15 członków. Toteż już w pierwszych trzech latach istnienia naszego stowarzyszenia powstały Oddziały w Białymstoku, Gdańsku, Krakowie, Lublinie, Łodzi, Poznaniu, Szczecinie, Warszawie i Wrocławiu, a w ciągu następnych kilku lat kolejno w Olsztynie, Katowicach i Toruniu. Najliczniejszym spośród tych dwunastu oddziałów jest Oddział Warszawski, skupiający ponad połowę wszystkich członków Towarzystwa. Główną formą działalności Oddziałów były zebrania naukowe z referatami zaproszonych gości, nierzadko z zagranicy. W późniejszym okresie jednak, wobec częstszego organizowania otwartych zebrań naukowych przez placówki badawcze, ta forma działalności osłabła. Odrodziła się jednak w ostatnich latach w formie organizowania monotematycznych mini-sympozjów. Przewodzi tu Oddział Warszawski, który z dużym sukcesem zorganizował kilka takich spotkań wspólnie z warszawskim oddziałem Towarzystwa Biologii Komórki. Inną formą działalności oddziałów, bardzo istotną a zarazem stanowiącą poważne wyzwanie, jest organizacja dorocznych zjazdów Towarzystwa, o czym dalej.

OGÓLNOPOLSKIE ZJAZDY POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Do głównych statutowych zadań Towarzystwa należy organizowanie zjazdów, sympozjów i konferencji naukowych. Pierwsze takie ogólnopolskie sympozjum odbyło się w 1960 r. w Białymstoku i poświęcone było enzymom oddechowym, rozdzielaniu i oczyszczaniu białek oraz przemianom aminokwasów. Następne sympozjum



Fotografia 4. Prof. Józef Heller (1896–1982), pierwszy redaktor naczelny „Postępów Biochemii” w latach 1953–1958, i prof. Irena Mochnacka (1905–1979), wchodząca w skład pierwszego zespołu redakcyjnego „Acta Biochimica Polonica” w latach 1954–1979.

zorganizowane w 1962 r. w Poznaniu miało za tematykę biochemię krwinki czerwonej. Natomiast pierwszy ogólnopolski szerokotematyczny zjazd naszego Towarzystwa odbył się w 1963 r. w Łodzi. Nazwany Pierwszym Kongresem Biochemii Polskiej, zapoczątkował coroczne (z nielicznymi wyjątkami) spotkania, już pod skromniejszą nazwą „Zjazdów”, których ostatni, czterdziesty trzeci, miał miejsce w 2008 r. w Olsztynie (w tym przypadku, ponieważ było to spotkanie zorganizowane wspólnie przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne i Polskie Towarzystwo Biologii Komórki, zjazd otrzymał nazwę Kongresu Biochemii i Biologii Komórki).

Organizacja Zjazdów, zarówno od strony technicznej, logistycznej jak i programowej, pozostaje niemal wyłącznie w gestii oddziału, na terenie którego Zjazd się odbywa. Jest to poważne wyzwanie nie tylko dla zarządu oddziału, ale także wobec szerokiego rzesz jego członków. Należy stwierdzić, że wszystkie oddziały z zadania tego wywiązywały się znakomicie. O popularności Zjazdów, a zarazem o ich potrzebie, świadczy fakt, że już w pierwszym z nich w 1963 r. wzięło udział ponad 600 biochemików, a w następnych liczba ta utrzymywała się na poziomie 400–600 uczestników, by w 2008 r. osiągnąć liczbę około 800 osób. Sukces tego ostatniego, zorganizowanego, jak już wspomniano, razem z Polskim Towarzystwem Biologii Komórki, być może przyczyni się do częstszego odbywania krajowych zjazdów wspólnie z innymi towarzy-

stwami naukowymi o zbliżonym profilu.

WYDAWNICTWA

Drugą ważną formą działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego jest działalność wydawnicza. Bezpośrednio po swoim powstaniu Towarzystwo nasze przejęło wydawanie przeglądowego czasopisma „Postępy Biochemii”. Pismo to zostało utworzone kilka lat wcześniej i prowadzone przez Komitet Biochemii PAN. Pierwszym redaktorem naczelnym

„Postępów”, również po przejściu pisma przez nasze Towarzystwo, był prof. Józef Heller, dyrektor powstałego w tym okresie Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN (Fot. 4). Po nim redaktorem pisma była prof. Irena Chmielewska z Uniwersytetu Warszawskiego, a następnie przez prawie 30 lat (1973–2000) kierowała Redakcją „Postępów” prof. Zofia Zielińska z Instytutu im. Nenckiego (Fot. 5).



Fotografia 5. Prof. Zofia Zielińska, redaktor naczelna „Postępów Biochemii” w latach 1973–2000.

„Postępy Biochemii” od swego powstania w 1953 r. (na Fot. 6 przedstawiono okładkę tego historycznego zeszytu) cieszą się dużym zainteresowaniem polskiej społeczności biochemicznej, i to zarówno młodych adeptów biochemii, studentów, jak i doświadczonych pracowników naukowych. Spełniają bowiem ważną rolę zarówno w pogłębianiu naszej wiedzy biochemicznej, jak również jako pomoc dydaktyczna. Obecnie, pod redakcją prof. Sławomira Pikuły (Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego) „Postępy” przyciągają uwagę czytelnika również niezwykle barwną stroną graficzną.

Drugim sztandarowym pismem naszego Towarzystwa są „Acta Biochimica Polonica”. Pismo to powstało w 1954 r. i przez wiele lat, bo aż do roku 1992, było wydawane przez Komitet Biochemii i Biofizyki PAN. Polskie Towarzystwo Biochemiczne przystąpiło do współwydawania



Fotografia 6. Strona tytułowa pierwszego zeszytu „Postępów Biochemii” (1953 r.) wydawanych w latach 1953–1954 przez Państwowe Zakłady Wydawnictw Lekarskich. W 1955 r. wydawanie „Postępów” przejęło Państwowe Wydawnictwo Naukowe, zachowując numerację tomów od początku.

„Acta” w 1993 r., ale faktycznie stało się zarówno pod względem merytorycznym jak i organizacyjnym głównym jego wydawcą. Pierwszy Komitet Redakcyjny „Acta” składał się z profesorów Włodzimierza Mozołowskiego (Fot. 7), Ireny Mochnackiej (Fot. 4) i Ignacego

Reifera. Na skutek ówczesnej sytuacji politycznej i nacisku władz państwowych

„Acta” były początkowo wydawane w języku polskim. Szybko jednak udało się przejść na język angielski, dzięki czemu pismo to mogło skutecznie wypełniać swoją misję osiągnięć

polskiej biochemii na arenie międzynarodowej. Przez 20 kolejnych lat (1979–1999) redaktorem naczelnym „Acta” była prof. Konstancja Raczyńska-Bojanowska (Fot. 8), która doprowadziła do indeksowa-



Fotografia 7. Prof. Włodzimierz Mozołowski (1895–1975), członek pierwszego komitetu redakcyjnego „Acta Biochimica Polonica” w latach 1954–1968.

nia pisma w Medline i innych dużych bazach danych i dzięki której „Acta” mają swój *impact factor*. Przez ostatnie dziesięć lat redaktorem naczelnym „Acta” była prof. Liliana Konarska z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (Fot. 9). Po Jej śmierci w sierpniu 2008 r. przed pismem stało trudne zadanie znalezienia równie oddanego i kompetentnego redaktora naczelnego.



Fotografia 8. Prof. Konstancja Raczyńska-Bojanowska, redaktor naczelna „Acta Biochimica Polonica” w latach 1979-1999.

Inicjatorzy powstania „Acta Biochimica Polonica” postawili przed pismem trzy główne zadania: (1) stworzenie *forum*, na którym polscy biochemicy mogliby prezentować swoje osiągnięcia, (2) utworzenie wizytówki osiągnięć polskiej biochemii na zewnątrz i (3) pomoc polskim biochemikom w pisaniu prac naukowych. To ostatnie zadanie, choć nigdy *explicit* nie sformułowane, stanowiło główną troskę pierwszych redaktorów pisma, Włodzimierza Mozołowskiego i Ireny Mochnackiej. Z drugiej strony idea „Acta” jako platformy publikacyjnej dla polskich biochemików stała się z czasem nieco anachroniczna wobec coraz częstszego publikowania przez nich swych osiągnięć w czasopiśmie zagranicznych i międzynarodowych. Niemniej stały napływ manuskryptów zarówno z kraju jak i z zagranicy oraz *impact factor* utrzymujący się w ostatnich latach na przyzwoitym poziomie (Ryc. 10) świadczą, że pismo jest potrzebne.

Pismo już od dawna, mimo swej nazwy „Polonica”, publikuje prace również autorów zagranicznych. W ciągu ostatnich trzech lat 25% opublikowanych prac pochodziło całkowicie z zagranicy, a 12% było wynikiem współpracy polskich biochemików z ich zagranicznymi kolegami. Redakcja przykłada dużą wagę do utrzymania wysokiego poziomu meryto-

rycznego pisma, czego wynikiem jest spory odsetek odrzutów (42% w ciągu ostatnich trzech lat). Przez ponad 50 lat swego istnienia „Acta” również przeszły przemianę swojej szaty graficznej (Fot. 11) i są obecnie redagowane i wydawane w sposób profesjonalny. Zarówno bieżące prace, prace w druku, jak i artykuły archiwalne (na razie do 1994 roku wstecz) są bezpłatnie dostępne na stronie internetowej pisma (www.actabp.pl).



Fotografia 9. Prof. Liliana Konarska (1944-2008), redaktor naczelna „Acta Biochimica Polonica” w latach 1999-2008.

W okresie drugiej kadencji Zarządu Głównego (1961-1963) Towarzystwo rozpoczęło wydawanie „Monografii Biochemicznych”. Poszczególne zeszyty „Monografii”, ukazujące się w nieregularnych odstępach czasu, były poświęcone wybranym, wąskotematycznym zagadnieniom współczesnej biochemii i były opracowywane przez znawców przedmiotu. Stanowiły one wartościowe uzupełnienie literatury biochemicznej, szczególnie w

okresie, kiedy dostęp do bieżącej literatury w wielu polskich ośrodkach akademickich był utrudniony. Ostatni, 45-ty zeszyt „Monografii” ukazał się w 2002 r.

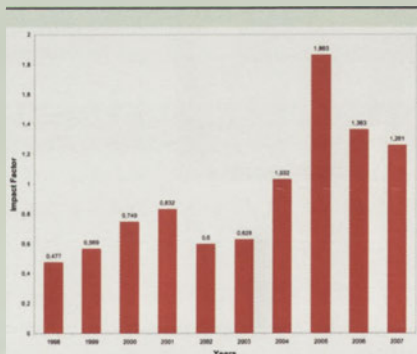
Zupełnie odmienną rolę pełnią wydawane kwartalnie od 1984 r. „Listy do członków”. Jest to *medium* służące informowaniu członków naszego Towarzystwa o aktualnych wydarzeniach w naszej społeczności. Stanowisko Redaktora „Listów” sprawuje z wielkim oddaniem dr Teresa Wesolowska z Oddziału Szczecińskiego.

SŁOWNICTWO BIOCHEMICZNE

Powstanie polskojęzycznych wydawnictw biochemicznych zwróciło uwagę na potrzebę ujednoczenia polskiej terminologii w tej dziedzinie nauki. Toteż już na początku lat sześćdziesiątych Towarzystwo nasze powołało Komisję Słownictwa Biochemicznego pod przewodnictwem prof. Tadeusza Korzybskiego. Wynikiem kilkuletnich prac tej Komisji było opublikowanie w „Postęпах Biochemii” zasad polskiej terminologii biochemicznej [2] i wydanie polskiej wersji międzynarodowego nazewnictwa enzymów zatwierdzonego przez Międzynarodową Unię Biochemiczną [3]. Niejako kontynuacją tej działalności na polu nomenklatury jest wydawany wyłącznie w wersji internetowej „Leksykon”. Strona internetowa jest obecnie przebudowywana i czasowo nie jest dostępna.

NAGRODY TOWARZYSTWA

Na początku lat sześćdziesiątych Zarząd Główny Towarzystwa ufundował dwie roczne nagrody: imienia Jakuba Karola Parnasa za najlepszą pracę wykonaną w polskim laboratorium i opublikowaną w roku poprzednim i imienia Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy artykuł opublikowany w „Postęпах Biochemii” w roku poprzednim. Nagrodę im. Parnasa Towarzystwo nasze traktuje jako najbardziej prestiżową. Jej laureaci zapraszani są każdorazowo do wygłoszenia odczytu na dorocznym zjeździe Towarzystwa. Laureaci obu nagród otrzymują dyplom honorowy oraz pewną kwotę pieniędzy. Z czasem tworzono inne nagrody. Ich liczba wynosi obecnie osiem, a pełen wy-



Rycina 10. Zmiany wartości *impact factor* „Acta Biochimica Polonica” w latach 1998-2007.



Fotografia 11. Strona tytułowa „Acta Biochimica Polonica” w latach 1954 (pierwszy zeszyt czasopiśma), 1993 i 2007.

Tabela 2. Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Patron nagrody	Nazwa	Częstotliwość przyznawania	Pierwszy raz przyznana w roku	Forma nagrody
Jakub Karol Parnas	za najlepszą pracę z zakresu biochemii wykonaną w polskim laboratorium	corocznie	1962	dyplom, nagroda pieniężna ¹ i zaproszenie do wygłoszenia wykładu
Bolesław Skarzyński	za najlepszy artykuł opublikowany w "Postęпах Biochemii"	corocznie	1962	dyplom i nagroda pieniężna
Włodzimierz Mozołowski	za najlepsze doniesienie na dorocznym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przedstawione przez młodego naukowca	corocznie	1968*	dyplom i nagroda pieniężna
Janina Opieńska-Blauth	za najlepsze doniesienie na dorocznym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przedstawione przez studenta	corocznie	1994	dyplom i nagroda pieniężna
Antoni Dmochowski	za osiągnięcia w nauczaniu biochemii, biologii molekularnej i biotechnologii	co 2 lata	1996	dyplom i medal
Bronisław Filipowicz	za najlepszą pracę z chemii i biochemii kwasów nukleinowych	corocznie	1997	dyplom i nagroda pieniężna ²
	za popularyzację biochemii i nauk pokrewnych	co 3 lata	2001	dyplom i medal
	za najlepszą pracę doktorską z biochemii	corocznie	2006	dyplom, nagroda pieniężna ³ i zaproszenie do wygłoszenia prelekcji

*Nagroda nosi imię Włodzimierza Mozołowskiego od 1975 roku

¹Fundatorem nagrody pieniężnej od 1997 r. jest dr Piotr Chomczyński, prezes Molecular Research Center, Inc., USA

²Fundatorem nagrody pieniężnej jest firma Sigma-Aldrich, Polska

³Fundatorem nagrody pieniężnej jest firma Merck, Polska

kaz ilustruje Tabela 2. Informacje na temat laureatów wszystkich nagród za ostatnie kilkanaście lat znajdują się na stronie internetowej Towarzystwa: www.ptbioch.edu.pl.

DZIAŁALNOŚĆ MIĘDZYNARODOWA

Bardzo ważnym aspektem działalności naszego Towarzystwa była od samego początku jego istnienia współpraca zagraniczna. Należy tu przede wszystkim zaliczyć udział Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych, FEBS. Towarzystwo nasze jest członkiem-założycielem tej organizacji. Wraz z siedemnastoma innymi towarzystwami biochemicznymi Europy utworzyło na początku 1964 roku Federację. Prezesem naszego Towarzystwa był wówczas prof. Kazimierz Zakrzewski (Fot. 12) i on to wziął udział w pierwszym posiedzeniu Rady FEBS w Londynie, na którym przyjęto pierwszy statut tej Federacji, miesz-

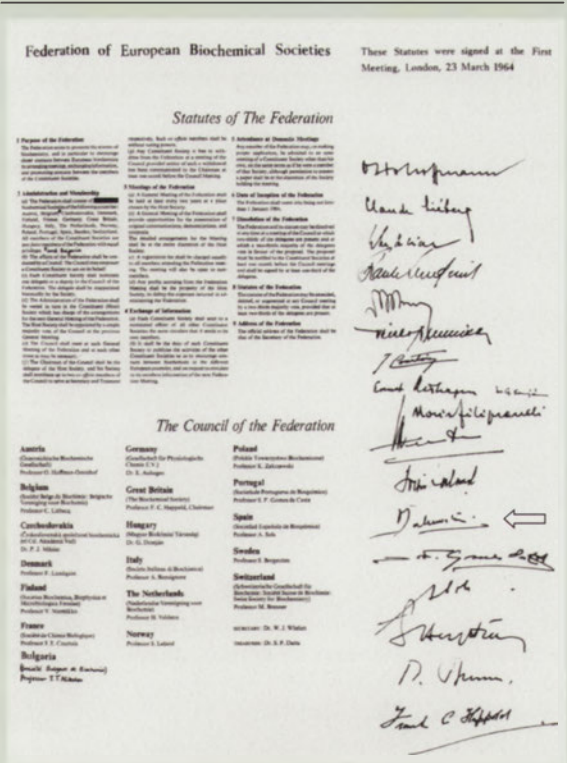


Fotografia 12. Prof. Kazimierz Zakrzewski (1918–2000), prezes Towarzystwa w latach 1963–1967 i 1980–1986, prezydent FEBS w latach 1966–1967.

czący się na jednej kartce papieru (Fot. 13).

Polska od samego początku bardzo czynnie włączyła się w prace FEBS, bo już dwa lata później, wiosną 1966 r., trzeci zjazd FEBS został zorganizowany w naszym kraju. Miejszem obrad był Pałac Kultury i Nauki w Warszawie. Zjazd ten stał się niezwykłym wydarzeniem w życiu naszego Towarzystwa, a zarazem i w rozwoju polskiej biochemii. W Zjeździe wzięło udział ponad tysiąc naukowców z całego świata, wśród nich pięciu laureatów Nagrody Nobla. W okresie ograniczonych kontaktów z biochemią światową Zjazd FEBS w Warszawie był przede wszystkim dla młodych polskich biochemików

nieocenioną okazją bezpośredniego zetknięcia się z ówczesnymi twórcami współczesnej biochemii. Na Fotografii 14 uwieczniono posiedzenie Rady FEBS z udziałem Komitetu Organi-



Fotografia 13. Pierwszy statut Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych przyjęty 23 marca 1964 r. Podpis prof. Zakrzewskiego zaznaczono strzałką.



Fotografia 14. Posiedzenie Rady FEBS wraz z komitetem organizacyjnym III Zjazdu FEBS w Warszawie, Pałac Kultury i Nauki, kwiecień 1966 r. Identyfikacja niektórych uczestników: *lewa strona stołu*: drugi od lewej – Uriel Littauer (Izrael), piąty (w kółku) – Kazimierz Zakrzewski, ósmy (z fajką) – Frank Lundquist (Dania); *prawa strona stołu*: pierwsza od prawej (w kółku) – Zofia Zielińska, drugi – Severo Ochoa (USA), trzeci – Tadeusz Kłopotowski, czwarty – Theodor Bücher (Republika Federalna Niemiec), siódmy (na tle tablicy) – Prakash S. Datta (Skarbnik FEBS, Wielka Brytania), dziesiąty (widoczny częściowo) – William J. Whelan (Sekretarz Generalny FEBS, Wielka Brytania), jedenasty (ostatni, widoczny częściowo) – Józef Heller. Zdjęcie ze zbiorów prof. Tadeusza Kłopotowskiego udostępnione przez doc. Zofię Zarębską.

zacyjnego tego Zjazdu w jednej z sal Pałacu Kultury w Warszawie.

Musiało upłynąć 38 lat, by nasze Towarzystwo ponownie zdecydowało się podjąć trud organizacji tej wielkiej imprezy, teraz już w zupełnie innych warunkach zarówno politycznych, logistycznych i ekonomicznych. Dwudziesty dziewiąty zjazd, po raz pierwszy pod oficjalną nazwą „Kongresu FEBS”, odbył się w Warszawie w 2004 r. Według powszechnej oceny, nie tylko naszej, była to również bardzo udana impreza. Część materiałów kongresowych została opublikowana w „Acta Biochimica Polonica”, co między innymi przyczyniło się do skokowego wzrostu *impact factor*. Wykład inauguracyjny wygłosił laureat nagrody Nobla, Kurt Wütrich (Fot. 15). W Kongresie licznie reprezentowani byli doktoranci kierunków biochemicznych naszych uczelni i instytutów badawczych.

Inną formą działalności FEBS są stypendia naukowe, z której to pomocy korzystają liczne rzesze naszych młodszych kolegów. Przykładowo, w latach 2005 - 2007 różne formy krótkoterminowych stypendiów naukowych uzyskało 35 członków naszego Towarzystwa, a 2 osoby przebywały na stypendiach długoterminowych. Ponadto rokrocznie kilkanaście osób z Polski uczestniczy na koszt FEBS w kursach organizowanych przez tę Federację.

Inną formą działalności są „fora młodych” – imprezy naukowe poprzedzające coroczne kongresy FEBSu i przeznaczone wyłącznie dla młodych biochemików. Ta działalność cieszy się dużym zainteresowaniem i corocznie korzysta z niej od kilku do dziesięciu osób z naszego kraju (w Forum tradycyjnie uczestniczy 100 osób).

Towarzystwo nasze nie tylko korzysta z dobrodziejstw FEBS, ale również czynnie bierze udział w działalności Federacji, uczestniczącymi bowiem we władzach FEBS. Po pierwsze, dwóch prezesów naszego Towarzystwa pełniło funkcję Prezydenta Federacji. Byli to prof. Zakrzewski wtedy, kiedy Polskie Towarzystwo Biochemiczne organizowało III Zjazd FEBS w Warszawie, i prof. Jolanta Barańska, kiedy to kolejny kongres FEBS ponownie zorganizowaliśmy w Polsce. Obecnie dwóch naszych kolegów od kilku lat sprawuje ważne funkcje w Federacji, a mianowicie prof. Maciej Nałęcz jest przewodniczącym Komisji Stypendialnej, a prof. Adam Szewczyk jest doradcą do spraw kongresów FEBS. Ponadto w skład Komisji do spraw Europy Środkowej i Wschodniej wchodzi prof. Andrzej Dżugaj, a do Komisji Wydawniczej został ostatnio wybrany prof. Mariusz Jaskólski.



Fotografia 15. Z obrad 29. Kongresu FEBS w Warszawie (26.6.2004–1.7.2004). Od lewej: David Shugar, Kurt Wütrich (laureat Nagrody Nobla), Piotr Węgleński i Włodzimierz Zagórski-Ostoja w czasie sesji otwarcia.

Spośród europejskich towarzystw biochemicznych szczególnie bliskie stosunki łączą nasze Towarzystwo z Towarzystwem Biochemicznym Ukrainy. Główną formą tej współpracy są regularne wspólne konferencje naukowe noszące imię wybitnego polskiego biochemika, przed wojną profesora Uniwersytetu Jana Kazimierza we Lwowie, Jakuba Karola Parnasa [4-6]. Zapoczątkowane w 1996 roku, odbywają się one co dwa lata, na przemian w Polsce i na Ukrainie. Ostatnia, szósta z kolei, taka konferencja miała miejsce w Krakowie w 2007 r., a następna przewidywana jest w 2009 r. w Jalcie.

ZAKOŃCZENIE

Półwiecze w istnieniu towarzystwa naukowego to we współczesnym świecie spory odcinek czasu, zwłaszcza dla tak wględnie młodej nauki, jaką jest biochemia. Można przyjąć, że aktywnie pracujące młode pokolenie polskich biochemików, którzy stanowią większość członków naszego Towarzystwa, to już czwarta generacja w stosunku do „ojców założycieli” Polskiego Towarzystwa Biochemicznego sprzed 50 lat. W okresie tym wiele zmieniło się w nauce, którą uprawiamy: problemy, metody, wyzwania. Zmieniło się również znaczenie naszego Towarzystwa. Wydaje się jednak, że jest ono nadal potrzebne i dobrze spełnia swą rolę w społecznym ruchu naukowym.

PIŚMIENNICTWO

- Filipowicz B (1974) Biochemia polska i jej reprezentacje. *Postepy Biochem* 20: 359-368
- Raczyńska-Bojanowska K, Korzybski T (1964) Sprawozdanie Komisji Słownictwa Biochemicznego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (1964). *Postepy Biochem* 10: 423-438
- Komitet Biochemiczny i Biofizyczny PAN (1967) *Enzymy: Nomenklatura i Klasyfikacja*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa
- Ostrowski WS (1986) Jakub Karol Parnas: życie i twórczość. *Postepy Biochem* 32: 247-260
- Mejbaum-Katzenellenbogen W (1986) Profesor Jakub Karol Parnas. *Postepy Biochem* 32: 261-284
- Barańska J, Dżugaj A, Kwiatkowska-Korczak J (2007) Embden-Meyerhof-Parnas, the first metabolic pathway: The fate of prominent Polish biochemist Jakub Karol Parnas. *Comprehensive Biochem* 45: 157-207



SPRAWOZDANIE Z KONGRESU BIOCHEMII I BIOLOGII KOMÓRKI OLSZTYN, 7-11 WRZEŚNIA 2008 ROKU

W dniach 7-11 września 2008 roku odbył się w Olsztynie Kongres Biochemii i Biologii Komórki. Organizatorami Kongresu był Oddział Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Olsztynie i Oddział Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki w Warszawie. Obrady odbywały się w Centrum Konferencyjnym Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (Fot. 1-4). Głównymi Sponsorami Kongresu były firmy Sigma-Aldrich oraz abo Grażyna Borejsza. Ponadto finansowo i rzeczowo Kongres wsparli: Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Komitet Cytobiologii PAN, Sieć Naukowa Mechanizmy Ruchów Komórkowych – MOBILITAS PL, Polska Sieć Mitochondrialna – Mitonet. PL, Precoptic Co. – Nikon – sponsor sesji „Cykl komórkowy

i śmierć komórki”, Carl Zeiss Sp. z o.o. – sponsor sesji „Komórki macierzyste – wyzwania biologiczne, biochemiczne i biomedyczne”, Wydawnictwo naukowe PWN S.A., Merck Sp.o.o., Bio-Rad Polska Sp. z o.o. Trzy firmy: SHIM-POL A.M. Borzymowski sp.j., Olympus Polska Sp. z o.o., Selvita Sp. z o.o., zaprezentowały specjalistyczne wykłady. Dodatkowo w kongresie uczestniczyło 26 firm z bogatą ofertą aparaturowo-odczynnikową.

Uroczystość inauguracji Kongresu poprzedzona była posiedzeniami Zarządów Głównych Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, któremu przewodniczył Prezes prof. Lech Wojtczak i Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, któremu przewodniczyła prof. Barbara Płytycz.

W organizacji Kongresu uczestniczyli przedstawiciele olsztyńskiego i warszawskiego środowiska naukowego, którymi kierował Komitet Organizacyjny pod przewodnictwem prof. Elżbiety Kostyra i prof. Jerzego Moraczewskiego (Fot. 5). Funkcję sekretarza Kongresu pełniły dr Beata Jarmołowska oraz dr hab. Hanna Fabczak. Wśród członków Komitetu Organizacyjnego znaleźli się ponadto: prof. Olga Olszowska, prof. Włodzimierz Kordan, dr hab. Anna Wasik, dr hab. Paweł Pomorski, dr Agnieszka Strzelecka-Kiliszek, dr Stanisław Krawczuk, dr Katarzyna Sobierajska, mgr Elżbieta Kocik, mgr Małgorzata Iwan, mgr Krzysztof Bielikowicz.

Honorowy patronat nad Kongresem objęli: Senator RP, J.M. Rektor Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego prof. dr hab. Ryszard Górecki, Zastępca Prezydenta Miasta Olsztyn Tomasz Głazewski oraz J.M. Rektor Uniwersytetu Warszawskiego prof. dr hab. Katarzyna Chałasińska-Macukow.

Do Komitetu Honorowego Kongresu organizatorzy zaprosili Członków Honorowych Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki: prof. czł. rzecz. PAN Marię Olszewską, prof. czł. rzecz. PAN Wincentego Kilarskiego, prof. zw. Stanisława Przystalskiego, prof. Jerzego Kawiaka, prof. zw. Zofię Bielańską-Osuchowską, prof. zw. Janinę Kwiatkowską-Korczak, prof. Mirosławę Morawiecką, prof. Konstację Raczyńską-Bojanowską, prof. zw. czł. rzecz. PAN Włodzimierza Ostrowskiego, prof. zw. czł. rzecz. PAN Mieczysława Chorążego, prof.

NOWE WŁADZE POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Walne Zebranie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, które odbyło się 9 września 2008 r. w czasie Kongresu Biochemii i Biologii Komórki w Olsztynie, powołało nowe władze Towarzystwa na lata 2008-2011. W skład Zarządu Głównego, obok Prezesa i wice-Prezesa Towarzystwa, którymi zostali prof. Andrzej Dżugaj (Wrocław) i prof. Jolanta Barańska (Warszawa), weszli prof. Wanda Baer-Dubowska (Poznań), dr hab. Joanna Bandorowicz-Pikuła (Warszawa), prof. Edward Bańkowski (Białystok), prof. Jan Barciszewski (Poznań), prof. Józef Dulak (Kraków), dr Anna Dygas (Warszawa), prof. Teresa Jakubowicz (Lublin), prof. Hanna Jańska (Wrocław), prof. Wiesława Jarmuszkiwicz (Poznań), prof. Piotr Laidler (Kraków), doc. Maria Jolanta Rędowicz (Warszawa), prof. Adam Szewczyk (Warszawa) i dr Teresa Wesołowska. Do Komisji Rewizyjnej zostały ponownie wybrane prof. Ewa Birkner (Zabrze), prof. Wierginia Janiszowska (Warszawa) i prof. Zofia Szwejkowska-Kulińska (Poznań). Na posiedzeniu Zarządu Głównego Towarzystwa w dniu 23 września zostało wyłonione jego prezydium w składzie, Prezes i wice-Prezes oraz dr Anna Dygas (skarbnik), doc. Jolanta Rędowicz (sekretarz), prof. Edward Bańkowski (członek), prof. Jan Barciszewski (członek) i dr Teresa Wesołowska (członek).

Jolanta Rędowicz
Sekretarz Towarzystwa



Fotografia 1.

zw. czł. PAN Davida Shugara, prof. zw. Jerzego Chmielowskiego, prof. zw. Mariusza Żydowo, prof. Zygmunta Machoya, prof. zw. Magdalenę Fikus. Poza wymienionymi zaproszenie do Komitetu Honorowego przyjęli: Podsekretarz Stanu w Ministerstwie Nauki i Szkolnictwa Wyższego prof. dr hab. czł. koresp. PAN Jerzy Duszyński, Prezes Polskiej Akademii Nauk prof. dr hab. czł. rzecz. PAN Michał Kleiber, Przewodnicząca Komitetu Cytobiologii PAN prof. dr hab. Elżbieta Wyroba, Prezes Zarządu na Rzecz Nauki Polskiej prof. dr hab. czł. rzecz. PAN Maciej Żylicz, Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego prof. zw. dr hab. czł. rzecz. PAN Lech Wojtczak, Prezes Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki prof. dr hab. Barbara Płytycz.

Komitet Naukowy Kongresu tworzyli przewodniczący sesji kongresowych: prof. Jolanta Barańska, prof. Jan Barciszewski, prof. Grzegorz Bartosz, prof. Jacek Bartkowiak, prof. Barbara Grzelakowska-Sztabert, prof. Mieczysław Chorąży, dr hab. Maria Ciemerych-Litwinienko, prof. Andrzej Dżugaj, prof. Bożena Kamińska, prof. Jerzy Kawiak, prof. Liliana Konarska[†], prof. Henryk Kostyra (przewodniczący), prof. Bogusław Machaliński, prof. Zbigniew Madeja, prof. Marek Maleszewski, prof. Jerzy Moraczewski (przewodniczący), prof. Agnieszka Mostowska, prof. Mieczysław Obiedziński, prof. Maria Jolanta Rędownicz, prof. Krzysztof Rolka, prof.



Fotografia 2.

Ewa Sikora, prof. Elżbieta Skrzydlewska, prof. Adam Szewczyk, prof. Zofia Szwejkowska-Kulińska, prof. Julian Świerczyński, prof. Stanisław Weidner, prof. Stanisław Wojtaszek, prof. Lech Wojtczak prof. Krzysztof Zwierz, prof. Krystyna Żółtowska.



Fotografia 3.

Pro memoria: W czasie organizacji Kongresu odeszło od nas dwoje nieodżałowanych profesorów, naukowców i ludzi szczerego serca, prof. dr hab. Liliana Konarska i prof. dr hab. Przemysław Janik. Przed uroczystością otwarcia Kongresu uczczono ich pamięć chwilą ciszy.

Uroczyste otwarcie Kongresu odbyło się 7 września o godz. 17:00 w Centrum Konferencyjnym UWM w Olsztynie. Uczestników Kongresu przywitani przewodniczący Komitetu Organizacyjnego prof. Elżbieta Kostyra i prof. Jerzy Moraczewski,



Fotografia 4.

akcentując fakt, że Kongres jest wydarzeniem szczególnym, ponieważ po raz pierwszy odbywa się w konwencji połączonego spotkania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki. W imieniu władz województwa pozdrowienia i gratulacje przekazał pełnomocnik Wojewody Warmińsko-Mazurskiego mgr Bogumił Osiński.

Dodatkową ozdobą Kongresu były obchody jubileuszu 50-lecia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Z tej okazji Prezes, prof. Lech Wojtczak

wyłosił okolicznościowe przemówienie, prezentując historię Towarzystwa, sylwetki ludzi o wyjątkowych zasługach w jego powstaniu i rozwoju. Konstatując działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego stwierdził, że zajmuje ono znaczącą pozycję na mapie naukowej Polski i stanowi dobrą płaszczyznę do rozwoju i promocji polskiej biochemii oraz stwarza coraz korzystniejsze warunki do międzynarodowych kontaktów, szczególnie młodym naukowcom. Przedstawicielem FEBS-u z okazji tego dostojnego jubileuszu był prof. Rolf K. Berge z Institute of Medicine, University of Bergen z Norwegii, który w dalszej części Kongresu wygłosił wykład pt.: „Dissipating excess energy as a strategy to prevent metabolic syndrome”. Natomiast z ramienia International Union of Biochemistry and Molecular Biology w Kongresie uczestniczył członek władz tej organizacji prof. Knut-Jan Andersen.



Fotografia 5. Prof. Elżbieta Kostyra i prof. Jerzy Moraczewski.

Działalność Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki przedstawiła Prezes prof. Barbara Płytycz. Podczas otwarcia Kongresu odbyła się również uroczystość wręczenia dyplomów Członków Honorowych Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki Paniom Profesor Zofii Bielańskiej-Osuchowskiej i Marii Olszewskiej. Uroczystą laudację dla prof. Zofii Bielańskiej Osuchowskiej wygłosiła prof. Barbara Płytycz, a dla prof. Marii Olszewskiej prof. Stanisław Przestalski.

Tradycyjnym elementem otwarcia Kongresu było również wręczenie nagród Towarzystw i sponsorów. Nagrodę Mayzla, ufundowaną przez firmę Roche, pani Michalinie Mar-niewicz i panu prof. Przemysławowi Wojtaszkowi za publikację „Pochodzenie i ewolucja śmierci komórki”, opublikowaną w PBK, 34: 599-734, 2007 wręczyli prof. Barbara Płytycz

(PTBK) i pan Rafał Kochanowski (ROCHE). Nagrodę im. Jakuba Karola Parnasa za pracę pt.: „Ribonuclese dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets”, opublikowaną w *Molecular Cell*, 2007, 25(4): 575-586 otrzymał zespół w składzie: J. Król, A. Fiszer, A. Mykowska, K. Sobczak, M. de Mezer i W.J. Krzyżosiak. Nagrodę im. Bolesława Skarżyńskiego otrzymały Józefa Węsierska-Gądek, Jolanta Bednarek i Zofia M. Kiliańska za publikację: „Nowe oblicza białek antyapoptotycznych. II. Surwiwina”, zamieszczoną w *Postęпах Biochemii* 2007, 53(3): 239-253. Wyróżnienie natomiast uzyskała praca „Rola i znaczenie surwiwiny w przebiegu mitozy”, autorstwa Kamalii Wolanin i Katarzyny Piwockiej, opublikowana w *Postęпах Biochemii*, 2007, 53(1): 10-18. Nagrodę ZG PTBioch i firmy Sigma-Aldrich za najlepszą publikację z chemii i biochemii kwasów nukleinowych otrzymał zespół: Katarzyna Skiba, Elżbieta Sochacka, Julia Kaźmierczak-Barańska, Maria Maszewska, Magdalena Janicka, Genowefa Nowak i Barbara Nawrot za publikację pt.: „Effect of base modifications on structure, thermodynamic stability, and gene silencing activity of short interfering RNA”, ogłoszoną w *RNA*, 2007, 13(8): 1301-1316. W refleksyjnej atmosferze została wręczona również nagroda PTBioch i firmy Merck Sp. z o.o. za najlepszą pracę doktorską z biochemii wykonaną w polskiej instytucji badawczej, którą otrzymała dr Aleksandra Ellert-Miklaszewska za pracę pt.: „Molekularne mechanizmy proapoptotycznego działania kannabinoidów na komórki glejaków”. Promotorem tej pracy była śp. prof. Liliana Konarska. Wszystkie nagrody PTBioch-u wręczył Prezes Towarzystwa prof. Lech Wojtczak.

Obrady Kongresu rozpoczął wykład pt.: „RNA interference of CUG and CAG repeat sequences” wygłoszony przez prof. Włodzimierza Krzyżosiaka, laureata ubiegłorocznej nagrody im. Jakuba Karola Parnasa. Przewodnią sesją Kongresu była Sesja Plenarna poświęcona tematyce komórek macierzystych, zatytułowana: „Komórki macierzyste – wyzwania biologiczne, biochemiczne i biomedyczne”, współorganizowana przez Komitet Cytobiologii PAN. Sesję tę prowadzili profesorowie Marek Ma-

leszewski i Bogusław Machaliński. Wprowadzenia do Sesji dokonał prof. Jerzy Moraczewski, a prof. Elżbieta Wyroba, Przewodnicząca Komitetu Cytobiologii zaprezentowała historię przedstawiając wyjątkowego Jubilata, jednego z kreatorów historii tegoż Komitetu, prof. Jerzego Kawiaka. 80-lecie urodzin Profesora zbiegające się z 25-leciem pierwszej konferencji Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki było najpiękniejszym prezentem dla uczestników Kongresu.

Pozostała tematyka była prezentowana w 13 następujących sesjach: Ruch i środowisko zewnątrzkomórkowe, Genomika i proteomika, Nowotwory – patologia sygnału komórkowego, Struktura, właściwości i funkcje peptydów i białek, Cykl komórkowy i śmierć komórki, Biochemia i biologia molekularna komórki roślinnej, Biochemia kliniczna, Biochemia lipidów i węglowodanów, Bioenergetyka, Stres oksydacyjny, Biochemia żywności i żywienia, Biologia nowotworów, Sesja Młodych. Sesje podzielone były na część prezentacji ustnych i plakato- wych. Prezentacje ustne obejmowały referaty sesyjne i komunikaty. W sumie wygłoszono 62 wykłady i 52 komunikaty ustne oraz zaprezentowano 497 posterów.

Podczas Kongresu wyłoniono tradycyjnie laureatów konkursów o nagrodę im. Włodzimierza Mozołowskiego i nagrodę im. Janiny Opieńskiej-Blauth. Nagrodę im. Włodzimierza Mozołowskiego otrzymała Aleksandra Wiczka za pracę pt.: „Involvement of S6 kinase in the response of cancer cell to sulforaphane, a cruciferous vegetable-derived anticancer agent”. Natomiast nagrodę im. Janiny Opieńskiej-Blauth przyznano Jackowi Grębowskiemu i Paulinie Kaźmierkiej za pracę pt.: „Laser biostimulation in generation photodynamic effect with N-methylfulleropyrrolidine”. Wszystkie nagrody wręczał Prezes P.T.Bioch. prof. Lech Wojtczak. Obok nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego przyznano dodatkowo dwa wyróżnienia: Monice Kusio za pracę pt.: „Bcr-Abl-mediated resistance to damage-induced apoptosis – the role of p53 acetylation” oraz Annie Wawrzucie za pracę pt.: „The influence of PDT of the melanoma cells *in vitro*”. Po raz pierwszy przyznano nagrody

i wyróżnienia młodym naukowcom, którzy prezentowali swoje prace w Sesji Młodych. Nagrodę ufundowaną przez firmę OLYMPUS za plakat pt.: „The study of MDR1 polymorphisms frequency in breast cancer patients from Poland” otrzymała Pani Anna Półrolniczak, a jej wręczenia dokonał przedstawiciel fundatora nagrody dr Krzysztof Borkowski. W przeprowadzonym równolegle konkursie Organizatorów na najlepszy plakat w Sesji Młodych pierwsze miejsce, uhonorowane nagrodą pieniężną, zajął Andrzej Prokop za pracę pt. „Ethidium bromide – diffusion throw the different kinds of laboratory gloves”, zaś dwa wyróżnienia wręczono: Marcie Fiołce za plakat pt.: „Raoultella planticola – gut bacterium of *Dendrobaena veneta* (Annelida) possess antimicrobial activity against five strains of *Mycobacterium*” oraz Ewie Kuźbida za plakat pt.: „The influence of glycation on biological and immunological properties of peanut 7S globulin”. Po raz drugi natomiast przyznano Nagrodę Polskiej Sieci Mitochondrialnej ufundowaną przez firmę OLYMPUS Polska za najlepsze krótkie wystąpienie. Tegoroczne wyróżnienie otrzymała Hanna Gałgańska za referat „The cytosol redox state in *Saccharomyces cerevisiae* cells is mediated by VDAC isoforms and influences protein expression in mitochondria”. Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki w konkursie na najlepsze prace wyróżnił Ilonę Kalaszczyńską za pracę pt.: „Cyclin A function in the mouse”, Łukasza Majewskiego za pracę pt.: „Nuclear localization of myosin VI in secretory PC12” i Daniela Kierzkowskiego za pracę pt.: „Subcellular localization and visualization of *in vivo* interactions between actin isoforms in *Arabidopsis thaliana* leaf epidermal cells”.

W olsztyńskim spotkaniu biochemików i biologów komórki wzięło udział około 800 osób, wśród nich goście z zagranicy (Białorusi, Norwegii, Danii). Kongres był znakomitym przykładem integracji naukowej i towarzyskiej różnych środowisk z całej Polski. Młodość ożywiała grona seniorskie, refleksje przeplatały się z twórczym optymizmem, a hedonistyczne odczucia dotyczyły zarówno podniebienia, jak i radości wspólnych tanecznych płaśów, które sympatycz-



Fotografia 6.

nie prowokował Zespół Pieśni i Tańca „Kortowo” Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. Miłośnicy piękna niepowtarzalnej przyrody mieli okazję uczestniczyć w malowniczym rejsie po Kanale Ostródzko-Elbląskim, światowej atrakcji turystycznej (Fot. 6).

ROZSTRZYGNIĘCIE KONKURSU POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO I FIRMY MERCK SP. ZO.O. NA NAJLEPSZĄ PRACĘ DOKTORSKĄ Z BIOCHEMII W 2007 ROKU

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, na podstawie opinii komisji w składzie: prof. Jan Barciszewski, prof. Piotr Laidler, prof. Jacek Otlewski, prof. Grzegorz Węgrzyn, prof. Ludmiła Żylińska, i prof. Sławomir Pikuła (przewodniczący), ogłasza, że wśród zgłoszonych na konkurs prac doktorskich nagrodę w wysokości 4 000 zł otrzymała Pani dr Aleksandra Ellert-Miklaszewska za pracę doktorską p.t. „Molekularne mechanizmy proapoptycznego działania kannabinoidów na komórki glejaki” wykonaną w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Chemii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego we współpracy z Pracownią Regulacji Transkrypcji Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Liliany Konarskiej. Wręczenie nagrody odbyło się 7.09.2008 r. podczas uroczystości inauguracji Kongresu Biochemii i Biologii Komórki w Olsztynie.



SYLWETKA ALEKSANDRY ELLERT-MIKLASZEWSKIEJ

Aleksandra Ellert-Miklaszewska ukończyła studia na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Warszawie o specjalności analityka kliniczna. Tytuł magistra farmacji uzyskała w 1998 r. za pracę pt. „Arginaza jako marker w ocenie i diagnostyce łagodnych i złośliwych guzów tarczycy i gruczołu piersiowego” wykonaną w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Chemii Klinicznej pod kierunkiem prof. dr hab. Liliany Konarskiej. W 2000 r. rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Far-

nowemu Zarządowi Głównemu Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki: Prezes – prof. Alicji Józkowicz, wice-prezes – prof. Barbarze Płytycz i pozostałym członkom. Ponadto serdeczne gratulacje i życzenia zdrowia kierujemy pod adresem nowych Członków Honorowych P.T.Bioch. w osobach prof. Jolanty Barańskiej, prof. Edwarda Bańkowskiego, prof. Andrzeja Dżugaja, prof. Aleksandra Koja i prof. Hilarego Koprowskiego z Filadelfii.

W imieniu Komitetu Organizacyjnego

**prof. Elżbieta Kostyra
i prof. Jerzy Moraczewski**

maceutycznym UM w Warszawie, a rok później została ponadto uczestnikiem kursu doktorskiego Studium Medycyny Molekularnej przy UM w Warszawie. Projekt doktorski Aleksandra Ellert-Miklaszewska wykonywała pod kierunkiem prof. dr hab. Liliany Konarskiej w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Chemii Klinicznej we współpracy z Pracownią Regulacji Transkrypcji Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN. Współpracę z IBD rozpoczęła w ramach półrocznego stażu finansowanego ze Stypendium Polskiej Sieci Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN. Następnie w latach 2001-2006 brała czynny udział w realizacji 3 projektów badawczych: grantów KBN młodego naukowca i grantu promotorskiego oraz grantu Fundacji na Rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny POLPHARMA SA. Praca doktorska została obroniona z wyróżnieniem 14.11.2007 r. przed Radą Wydziału Farmaceutycznego. Recenzentami pracy byli prof. dr hab. Joanna Strosznajder i prof. dr hab. Paweł Szulczyk.

Aleksandra Ellert-Miklaszewska jest współautorką 4 publikacji oraz rozdziału w książce „Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału” pod red. Nowak J.Z., Zawilska J.B. Dwie publikacje, w których doktorantka jest pierwszym autorem, dotyczą bezpośrednio przedmiotu pracy doktorskiej i opublikowane zostały w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Jest laureatką dwóch nagród zespołowych za

osiągnięcia naukowe przyznawanych przez rektora Uniwersytetu Medycznego w Warszawie.

Po ukończeniu badań w ramach rozprawy doktorskiej Aleksandra Ellert-Miklaszewska rozpoczęła pracę w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, gdzie nadal zajmuje się zagadnieniami biologii molekularnej glejaków, nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. Uczestniczy m.in. w realizacji polsko-niemieckiego projektu dotyczącego roli oddziaływania komórek glejaka z komórkami mikrogleju, wchodzącymi w skład mikrośrodowiska guza, w patogenezie tych nowotworów.

MOLEKULARNE MECHANIZMY PROAPOPTOTYCZNEGO DZIAŁANIA KANNABINOIDÓW NA KOMÓRKI GLEJAKÓW

STRESZCZENIE PRACY

Aleksandra Ellert-Miklaszewska

Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny, Warszawa

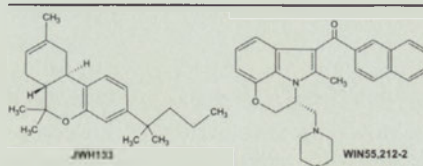
Obecnie: Pracownia Regulacji Transkrypcji, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: aellert@nencki.gov.pl

Glejaki, nowotwory wywodzące się z komórek gleju, stanowią grupę najczęstszych pierwotnych guzów ośrodkowego układu nerwowego (OUN), a ich złośliwe formy odznaczają się wyjątkowo niekorzystnym rokowaniem dla pacjenta [1]. Na skutek silnej inwazyjności glejaki tworzą z reguły rozległe guzy, co utrudnia skuteczną interwencję chirurgiczną. Ponadto wyjątkowo wysoka częstość i heterogenność mutacji w genach supresorowych i protoonkogenach, przyczyniająca się do patogenezы nowotworu oraz zaburzenia mechanizmów programowanej śmierci komórek (apoptozy), prowadzi do oporności glejaków na tradycyjne terapie przeciwnowotworowe. Istotne jest zatem znalezienie nowych, skutecznych leków, których mechanizm działania byłby odmienny niż wyko-

rzystywany przez konwencjonalne terapie.

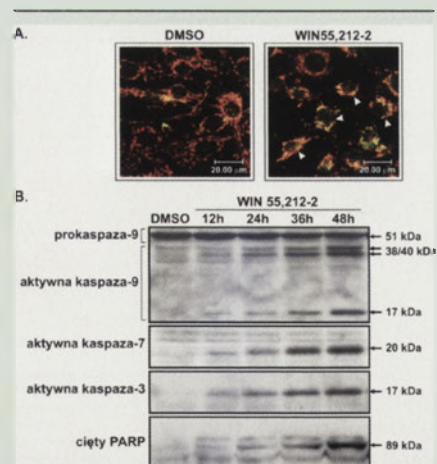
Kilka lat temu wykazano po raz pierwszy, że zawarte w konopiach indyjskich (*Cannabis sativa*) substancje czynne zwane kannabinoidami, a także ich syntetyczne analogi, hamują proliferację komórek nowotworowych w warunkach *in vitro* i ograniczają wzrost guzów u zwierząt doświadczalnych [2,3]. Niewątpliwą zaletą kannabinoidów jest receptorowy mechanizm działania, zapewniający możliwość selektywnego oddziaływania na komórki wykazujące syntezę właściwych receptorów. Stwierdzono, że w działaniu antyproliferacyjnym kannabinoidów mogą pośredniczyć oba poznane metabotropowe receptory błonowe, zwane CB1 i CB2. W komórkach nowotworowych, w tym w komórkach glejaków, w porównaniu do tkanki prawidłowej, może natomiast dochodzić do znaczącego wzrostu ekspresji genu i poziomu białka receptora CB2 [3-5]. Potencjalne zastosowanie kannabinoidów w terapii glejaków człowieka powinno zatem dotyczyć związków, które selektywnie aktywują receptory CB2, zwłaszcza że pozwala to uniknąć niepożądanych psychotropowych efektów ubocznych typowych dla marihuany, zależnych od pobudzenia neuronalnych receptorów CB1.

Celem badań opisanych w rozprawie doktorskiej było poznanie molekularnych mechanizmów działania wybranych syntetycznych kannabinoidów na komórki glejaka szczurzego, ocena wrażliwości komórek różnych linii glejaków człowieka na te związki oraz zbadanie wpływu kannabinoidów na komórki prawidłowe - astrocyty. W doświadczeniach wykorzystano syntetyczne kannabinoidy: WIN55,212-2, agonistę obu typów receptorów kannabinoidowych CB1 i CB2 oraz JWH133, związek działają-



Rycina 1. Wzory strukturalne syntetycznych kannabinoidów wykorzystanych w pracy: JWH133 i WIN55,212-2.

cy selektywnie poprzez receptor CB2 (Ryc. 1).



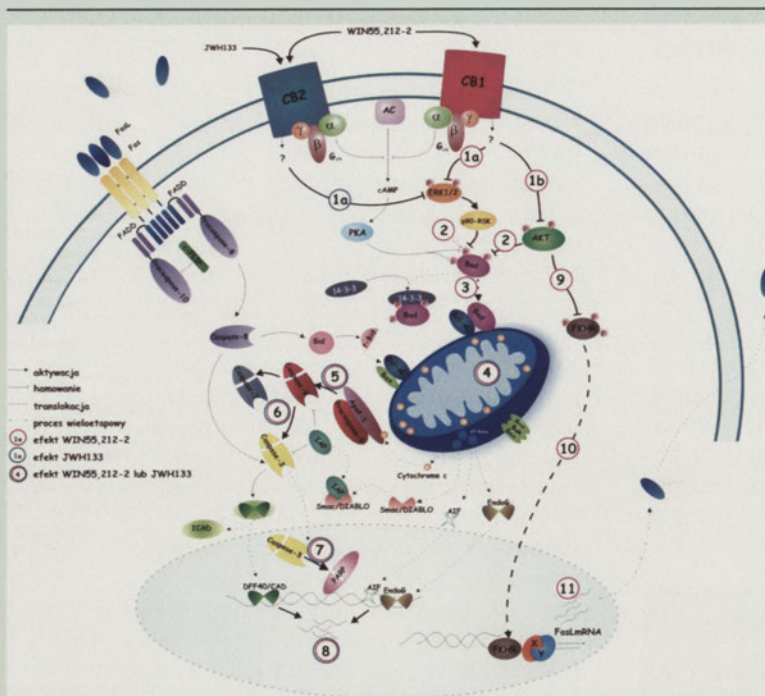
Rycina 2. Translokacja białka Bad do mitochondriów (A) i aktywacja kaskady kaspaz (B) jako elementy mitochondrialnego szlaku apoptozy indukowanej w komórkach C6 przez syntetyczny kannabinoid. A. Strzałki na zdjęciu z mikroskopu konfokalnego wskazują przykładowe komórki poddane działaniu WIN55,212-2, w których widoczne jest nałożenie fluorescencji: zielonej odzwierciedlającej lokalizację Bad i czerwonej pochodzącej od znacznika mitochondriów (MitoTracker Red). Poziom aktywnych form kaspaz w komórkach, jak również poziom ciężkiej proteolitycznie polimerazy PARP (substratu kaspazy 3), wzrastające zależnie od czasu ekspozycji, wykrywano metodą Western-blot.

W rozprawie wykazano, że kannabinoidy hamują proliferację i indukują apoptozę komórek glejaków w hodowli *in vitro* za pośrednictwem obu typów receptorów: CB1 i/lub CB2. Stwierdzono, że proces apoptozy uruchamiany jest przy udziale tzw. szlaku mitochondrialnego, gdyż w komórkach traktowanych kannabinoidami dochodziło do zmian potencjału błon mitochondrialnych, aktywacji kaspaz i fragmentacji DNA (Ryc. 2). Komórki glejaka linii C6, tworzące u szczura guzy przypominające morfologicznie glejaki wielopostaciowe u człowieka, posłużyły do bliższej charakterystyki molekularnych mechanizmów działania kannabinoidów. Sprawdzone wpływ WIN55,212-2 i JWH133 na główne szlaki przekazujące sygnał prożyciowy od receptorów czynników wzrostowych oraz na aktywność kinaz MAP, uczestniczących w odpowiedzi na stres komórkowy. Wykazano znaczące różnice w molekularnych mechanizmach działania kannabinoidów, zależnie od typu pobudzanych receptorów (Ryc. 3). Ważną rolę w indukcji apoptozy przez WIN55,212-2 odgrywało zahamowanie aktywności prożyciowej kinazy Akt oraz aktywacja proapoptotycznego białka Bad i zależna od czynnika transkrypcyjnego

FKHR indukcja ekspresji genu cytotoksycznej cytokiny – liganda Fas. Efektów tych nie wywoływało podanie JWH133, co może wskazywać na zależność wspomnianych zjawisk od aktywacji wyłącznie receptora CB1.

Wykazano także, że komórki ludzkich glejaków, linii ustalonych (T98G, U87MG, U373MG i LN229) oraz linii pierwotnych pochodzące z guzów o najwyższych stopniach złośliwości (III i IV wg. WHO) są wrażliwe na cytotoksyczne działanie kannabinoidów. W komórkach tych wrażliwość na kannabinoidy korelowała z ekspresją genów receptorów CB1 i CB2. Sprawdzone także, czy obecność mutacji w genach supresorowych w komórkach glejaków, powodujących oporność na wiele tradycyjnych cytostatyków, wpływa na sposób odpowiedzi na kannabinoidy. Przykładem takich zaburzeń genetycznych są mutacje w genach kodujących dwa supresory nowotworów: czynnik transkrypcyjny p53 - uczestniczący w blokowaniu cyklu komórkowego i indukcji apoptozy oraz fosfatazę białkowo-lipidową PTEN – biorącą udział w regulacji odpowiedzi na sygnały prożyciowe. Stwierdzono, że kannabinoidy indukują apoptozę niezależnie od tego, czy w komórkach obecne jest funkcjonalne białko p53 oraz aktywna fosfataza PTEN, a molekularny mechanizm śmierci przebiega podobnie jak w glejaku C6, tj. poprzez uruchomienie szlaku mitochondrialnego.

W pracy przeanalizowano także wpływ kannabinoidów na nietransformowane komórki glejowe, wykorzystując do tego celu pierwotne hodowle astrocytów z kory mózgowej szczura. Stwierdzono, że WIN55,212-2 w dawkach indukujących apoptozę w komórkach glejaków wpływał także na żywotność komórek prawidłowego gleju, podczas gdy JWH133



Rycina 3. Proponowany mechanizm działania syntetycznych kannabinoidów na komórki glejaka C6. W komórkach C6, JWH133 – selektywny agonista receptora kannabinoidowego CB2, podobnie jak WIN55,212-2 wiążący się z receptorami CB1 i CB2, uruchamia zmiany typowe dla procesu apoptozy, ale mechanizm działania obu związków nie jest identyczny. JWH133 i WIN55,212-2 wywołują spadek aktywności kinaz MAP (ERK1/2) w komórce (1a), ale działanie WIN55,212-2 prowadzi dodatkowo do hamowania aktywności drugiej kinazy prożyciowej – Akt (1b) i w wyniku tego do zwiększenia puli nieufosforylowanego białka Bad (2). W takiej postaci Bad ulega translokacji do błony mitochondrialnej (3), co w konsekwencji powoduje zniesienie potencjału tej błony (4), warunkujące wypływ z mitochondriów czynników biorących udział w procesie apoptozy. Do aktywacji mitochondrialnego szlaku śmierci komórek dochodzi także pod wpływem działania JWH133 (4). Oba związki inicjują w konsekwencji aktywację kaskady kaspaz (5,6) wraz z proteolizą białka PARP (7) i apoptotyczną fragmentacją DNA (8). Spadek fosforylacji Akt w wyniku działania WIN55,212-2 prowadzi także do zwiększenia puli aktywnego czynnika FKHR (9) i jego translokacji do jądra (10), gdzie czynnik ten może przyczynić się do indukcji ekspresji genu cytokiny cytotoksycznej FasL (11), zdolnej do uruchomienia receptorowego (zewnątrznego) szlaku apoptozy. Dane o procesach nieoznaczonych liczbami pochodzą ze źródeł literaturowych.

nie działał toksycznie na komórki nietransformowane.

Uzyskane wyniki wskazują, że dzięki odmiennemu mechanizmowi działania niż stosowane obecnie cytostatyki, kannabinoidy mogłyby potencjalnie stanowić alternatywę w leczeniu glejaków opornych na radio- i chemioterapię. Jako związki silnie lipofilne z łatwością przenikają przez barierę krew-mózg, która ogranicza biodostępność i przez to stanowi przeszkodę w użyciu wielu leków stosowanych z powodzeniem w terapii innych nowotworów. Szczególne zastosowanie mogą mieć związki selektywnie pobudzające receptor CB2. Dają one bowiem możliwość eliminacji komórek glejaków, bez szkodliwego wpływu na prawidłowe komórki glejowe i niepożądanych psychotropowych efektów ubocznych. Ponieważ jednak

ich skuteczność terapeutyczna ograniczałaby się do glejaków, w których wykrywa się obecność receptorów CB2, dalszych badań nad możliwością wykorzystania kannabinoidów w terapii glejaków nie należy zawężać jedynie do tej grupy związków. Ponadto, jak wykazano w tej pracy, zdolność do pobudzenia receptora CB1 zwiększa skuteczność antyproliferacyjną i cytotoksyczną kannabinoidów w stosunku do komórek nowotworowych. Przeprowadzone w ostatnich latach pierwsze badanie kliniczne z zastosowaniem kannabinoidu w terapii złośliwych glejaków obejmowało doguzowe podawanie występującego w konopiach Δ^9 -tetrahydrokannabinolu (Δ^9 -THC), nieselektywnego agonisty obu typów receptorów [6].

PIŚMIENICTWO

1. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 215-225; discussion 26-9
2. Sanchez C, Galve-Roperh I, Canova C, Brachet P, Guzman M (1998) Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett* 436: 6-10
3. Guzman M (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 3: 745-755
4. Sanchez C, de Ceballos ML, del Pulgar TG, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, Ramon y Cajal S, Guzman M (2001) Inhibition of glioma growth *in vivo* by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res* 61: 5784-5789

Profesor Józef Dulak (Fot. 1), kierownik Zakładu Biotechnologii Medycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, został wybrany w drodze kilkuetapowego konkursu do Komitetu Naukowego Innovative Medicine Initiative (IMI).

Jest to jedna z kilku wspólnych inicjatyw technologicznych (*European Joint Technology Initiative*) koordynowanych przez Komisję Europejską, a powstała jako wynik porozumienia Komisji Europejskiej oraz przemysłu farmaceutycznego, reprezentowanego przez European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA). Celem IMI jest przezwyciężenie ograniczeń w rozwoju medycyny innowacyjnej w Europie i wspieranie badań zmierzających do opracowania nowych leków. Komitet Naukowy odpowiedzialny jest za plan naukowy i ustalanie priorytetów badawczych IMI. Komitet składa się z 15 osób, przedstawicieli europejskiego środowiska naukowego, przemysłu farmaceutycznego, agencji regulujących rejestrację leków oraz przedstawicieli organizacji broniących interesów pacjentów. Na realizację celów IMI przeznaczono budżet w wysokości 2 mld Euro, budowany w równej części przez Komisję Europejską oraz EFPIA. Fundusze KE, pochodzące ze środków 7 Programu Ramowego, będą przeznaczone w całości na wsparcie badań prowadzonych w instytucjach naukowych oraz w tzw. małych i średnich przedsiębiorstwach (SME). Przemysł farmaceutyczny będzie finansował w całości swój udział w badaniach realizowanych przez konsorcja naukowo-przemysłowe.



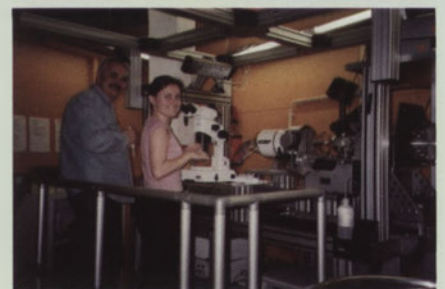
Fotografia 1. Prof. Józef Dulak.

Informacje o IMI oraz o konkursie znajdują się na stronie <http://imi.europa.eu>. Jednym z celów IMI jest także utworzenie do roku 2013 Europejskiej Akademii Badań Medycznych (EMRA – European Medicines Research Academy), kształcącej specjalistów w zakresie biomedycyny, w szczególności w dziedzinach związanych z odkrywaniem i wprowadzaniem nowych leków oraz opracowanie i wdrożenie programu europejskich studiów doktoranckich.

W roku 2008 (jak w latach ubiegłych: 2006 i 2007) w Oddziale Łódzkim Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbywały się zebrań naukowe „Forum Młodych”, podczas których młodzi pracownicy naukowci przedstawiali swoje osiągnięcia. Spośród dziewięciu prezentowanych prac wyłoniono jedną najlepszą, a uczestnik otrzymał nagrodę książkową w formie podręcznika „Podstawy Biologii Komórki”. Ujmując wydarzenia chronologicznie na kolejnych posiedzeniach naukowych w Oddziale wyniki badań naukowych prezentowali w formie wykładów – 25 kwietnia 2008 r. mgr Magdalena Bieniasz z Katedry Biochemii Medycznej UM w Łodzi (Analiza ekspresji metaloproteaz, ich inhibitorów oraz białek morfogenetycznych kości w ocenie progresji choroby nowotworowej płuc), mgr inż. Tomasz Boczek z Katedry Biochemii Medycznej UM w Łodzi (Charakterystyka wybranych białek komórek PC12 w warunkach zaburzonej homeostazy wapniowej), mgr Aneta Rogalska z Katedry Termobiologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ (Indukcja apoptozy przez akklarubicynę w nowotworowych komórkach A549, HepG i MCF-7); 30 maja 2008 r. mgr inż. Tomasz Florczak z Instytutu Biochemii Technicznej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej (Wykorzystanie lipaz *Beauveria* sp. do enancjoselektywnego rozdzia-

łu mieszanin racemicznych alkoholi II-rzędowych), mgr Joanna Rywaniak z Katedry Biochemii Ogólnej UŁ (Markery apoptozy w płytkach krwi w stresie oksydacyjnym), mgr inż. Katarzyna Struszczyk z Instytutu Biochemii Technicznej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności PŁ (Enzymatyczne preparaty z pleśni *Mucor* i ich wykorzystanie do otrzymywania oligoaminosacharydów); 13 czerwca 2008 r. mgr Mariusz Malinowski z Instytutu Biologii Medycznej PAN (Charakterystyka ekspresji i aktywności metaloproteaz macierzowych w komórkach śródbłonna aktywowanych tymozyną β 4), mgr Izabela Redzyna z Pracowni Badań Strukturalnych Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej (Poznanie struktur krystalicznych kompleksów chagasy z enzymami proteolitycznymi w celu znalezienia leku przeciw chorobie Chagasa), mgr Maciej Żelazowski z Zakładu Kancerogenezy Molekularnej UM (Analiza molekularna apoptozy i proliferacji w raku jelita grubego). **Nagrodę otrzymała mgr Izabela Redzyna (Fot. 2).**

Lauretką ukończyła studia dzienne na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, na kierunku Biotechnologia i specjalizacji Biochemia techniczna. W trakcie studiów uczestniczyła w projekcie badawczym prowadzonym przez prof. dr hab. inż. Grzegorza Bujacza (Fot. 2), a dotyczącym krystalizacji białka aneksyny VI w kompleksie z białkiem S-100. Tematem pracy magisterskiej laureatki były badania strukturalne związków fenolowych wyizolowanych z drzew iglastych



Fotografia 2. Mgr Izabela Radzyna i prof. dr hab. inż. Grzegorz Bujacz.

Picea abies i *Pinus silvestris*. Podczas studiów doktoranckich brała udział w projekcie europejskim AIMS, w ramach VI FP UE. Mgr Izabela Redzyna uczestniczyła w badaniach strukturalnych fragmentu Fc immunoglobuliny IgG1 w kompleksach z ligandami – aktywnymi komponentami wypełnień kolumn chromatograficznych. W ramach pracy doktorskiej prowadziła badania strukturalne chagasyny – inhibitora proteaz cysteinowych, biorącego udział w rozwoju pasożyta wywołującego tropikalną chorobę Chagasa. Podobnie jak pracę magisterską, tak i pracę doktorską mgr Redzyna wykonuje w Pracowni Badań Strukturalnych Instytutu Biochemii Technicznej PŁ, a prof. dr hab. inż. Grzegorz Bujacz jest promotorem obydwu tych prac. Pracownia Badań Strukturalnych Instytutu Biochemii Technicznej PŁ jest przystosowana do prowadzenia badań strukturalnych makromolekuł oraz niskocząsteczkowych związków biologicznie czynnych metodami krystalograficznymi. W Pracowni realizowane są projekty: Badania strukturalne nienukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy HIV-1; Badania strukturalne inhibitorów proteazy wirusa HIV; Badania strukturalne białek związanych z patogenezą roślin klasy PR10; Krystalizacja białek selektywnie wiążących cytokininy (CSBP); Badania krystalograficzne enzymów zaangażowanych w syntezę czynnika modulacyjnego bakterii *Rhizobium* żyjącymi w symbiozie z roślinami motylkowymi; Struktura białek wiążących hormony juvenilne (JHBP); Synteza cysteiny w bakteriach, czynniki transkrypcyjne CysB i Cbl; Badania strukturalne białkowego inhibitora proteaz serynowych (AGTI) z nasion kąkol polnego oraz jego kompleksu z trypsyną; Badania strukturalne domeny Fc przeciwciał monoklonalnych z peptydomimicznymi ligandami; Określenie struktury krystalicznej chagasyny – inhibitora proteaz cysteinowych oraz jej kompleksów z enzymami proteolitycznymi; Badania krystalograficzne czynnika transkrypcyjnego wyizolowanego z *Thermotoga maritima* (TM1030); Badania strukturalne dehydrogenazy mleczanowej w kompleksie z pirogronianem i oksymianem (LDL).

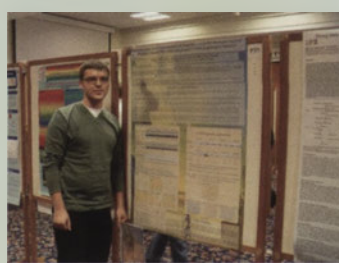


FEBS Advanced Course
Cytochrome P450 Systems: from Structure to Application
September 23-28, 2008
Kranjska Gora, Slovenia

FEBS Advanced Course. W dniach 23–28 września b.r. w Kranjskiej Gorze w Słowenii, pod patronatem FEBS, odbył się trzeci kurs poświęcony cytochromom P450, szeroko rozpowszechnionej nadrodziny enzymów, uczestniczących w metabolizmie ksenobiotyków, i wielu związków endogennych, np. hormonów, kwasów żółciowych, kwasów tłuszczowych, witamin, czy cholesterolu. Podobnie jak sześć lat wcześniej, Organizatorami Kursu oraz Przewodniczącymi Komitetu Naukowego byli: prof. **Bronislava Črešnar** (Uniwersytet w Ljubljanie, Słowenia) oraz prof. **Rita Bernhardt** (Uniwersytet Saarland, Niemcy). Polskę reprezentowały trzy osoby: dr **Marta Kot** (Instytut Farmakologii PAN w Krakowie), dr **Michał Cichocki** (Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu) i student **Rafał Skowronek** (Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach; Fot. 3). Warto wspomnieć, iż wszyscy polscy uczestnicy przywieźli ze sobą plakaty, które prezentowali w trakcie, podzielonej na dwa dni sesji plakatowej obejmującej trzydzieści dziewięć komunikatów. Dr M. Kot przedstawiła opracowanie „Is the activity of liver CYP regulated by brain noradrenergic or serotonergic system?”, dr M. Cichocki „The effect of initiating doses of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene on the expression of cytochrome P450 and phase II enzymes in mouse epidermis”, a R. Skowronek „Does the long-term administration of dalarelin – a GnRH receptor agonist – influence hepatic hormone-dependent CYP3A expression pattern?”. Pod względem naukowym kurs był przygotowany wyśmienicie. Wśród zaproszonych wykładowców znaleźli się najlepsi specjaliści – głównie europejscy, np. prof. **Urs Meyer** (Uniwersytet w Bazylei) i prof. **Magnus Ingelman-Sundberg** (Uniwersytet Karolin-

ska), doskonale znani badaczom CYP. W trakcie wykładów i warsztatów przedstawiono nowoczesne trendy wszystkich głównych „gałęzi” współczesnej nauki o cytochromach P450: medycyny, fizjologii, farmakologii, toksykologii, mikrobiologii, chemii, nauki o roślinach i owadach, bioinformatyki, biotechnologii oraz nauk środowiskowych. Niezwykle oryginalne i interesujące były wykłady prof. **Archakova** (Instytut Chemii Biomedycznej, Rosja), który przedstawił problem przetwarzania stale rosnącej liczby danych naukowych oraz wyjaśnił, jak z pomocą nanotechnologii, można teoretycznie, „odwrócić liczbę Avogadro”. Inne wybrane ciekawe zagadnienia poruszone przez wykładowców to: epigenetyka ekspresji genów CYP, ich rola w metabolizmie mózgu, zastosowanie mikromacierzy DNA do badania profili ekspresji genów; niedobory enzymatyczne jako istotny problem kliniczny, np. niedobór CYP 19 (aromatazy), zespół Antler Bixler (jak się okazało, pierwotny niedobór reduktazy NADPH:cytochrom P450) oraz wykorzystanie hydrolaz steroidowych jako celów w terapii nadciśnienia, zespołu metabolicznego, raka

sutka, raka gruczołu krokowego etc. Łącznie wygłoszono siedemnaście wykładów oraz przeprowadzono cztery zajęcia warsztatowe: „Human cytochrome P450 deficiencies and gene polymorphisms”, „Systems biology”, „New cytochrome P450s and their role in health and disease”, „P450 expression systems”. Organizatorzy oczywiście nie zaniedbali aspektu towarzyskiego. W trakcie zorganizowanej wycieczki uczestnicy zwiedzili zabytkowe centrum miasteczka Radovljica, gdzie spróbowali wyrabianego w sposób tradycyjny piernika, a także zobaczyli słynne jezioro Bled z uroczym kościółkiem na wyspie. W czasie wolnym od spotkań naukowych studenci mogli podziwiać malownicze krajobrazy Alp Julijskich i rozwijać nowo nawiązane znajomości. Kurs zgromadził w Kranjskiej Gorze 75 osób reprezentujących wszystkie dziedziny badań nad cytochromami P450 z 14 krajów:



Fotografia 3. FEBS Advanced Course – Rafał Skowronek prezentuje pracę Katedry Morfologii SUM na sesji posterowej (fot. Michał Cichocki).

Francji, Hiszpanii, Kazachstanu, Niemiec, Polski, Rosji, RPA, Słowenii, Szwajcarii, Szwecji, Turcji, Węgier, Wielkiej Brytanii i Włoch. Staraniem organizatorów przygotowano książkę zjazdową, w której opublikowano streszczenia wszystkich wykładów, warsztatów i komunikatów naukowych prezentowanych na Kursie.

Relację przygotował Rafał Skowronek, student IV roku Śląskiego Uniwersytetu Medycznego z Koła STN przy Zakładzie Histologii Katedry Morfologii SUM w Katowicach.

Nagrody Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia naukowe i naukowo-techniczne (Fot. 4) przyznano w trzech kategoriach. W kategorii „Badania na rzecz rozwoju nauki” nagrodę otrzymał specjalista od teorii chaosu

prof. Marian Mrozek z UJ za zastosowanie narzędzi matematycznych do wyjaśniania zjawisk przyrodniczych i atmosferycznych. W kategorii „Badania na rzecz rozwoju społeczeństwa” nagrodę otrzymał onkolog z Kliniki Gastroenterologii Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, prof. Jarosław Reguła. Profesor Reguła koordynuje rozległe badania przesiewowe metodą kolonoskopii, których celem jest wczesne wykrywanie nowotworów jelita grubego. Nagrodę w kategorii „Badania na rzecz rozwoju gospodarki” otrzymał prof. Zdzisław Smorąg, biotechnolog z Instytutu Zootechniki PAN w Krakowie, zajmujący się wspomaganiem rozrodu zwierząt hodowlanych przez zastosowanie m.in. zapłodnienia in vitro. W wyniku prowadzonych przez Laureata badań uzyskano transgeniczne świnie o zmodyfikowanej barierze immunologicznej człowiek-świnia. Efekty tych prac stwarzają nowe możliwości dla rozwoju medycyny i farmacji oraz hodowli. Uroczystość wręczenia nagród odbyła się 8 października 2008 w Zamku Królewskim w Warszawie,



Fotografia 4. Laureaci nagrody ministra nauki i szkolnictwa wyższego za wybitne osiągnięcia naukowe i naukowo-techniczne.

w obecności Premiera RP, Donalda Tuska. Nominowanymi do nagrody Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego byli poza laureatami: w kategorii badań na rzecz rozwoju nauki, prof. Michał Głowiński (specjalista języka propagandy oraz zideologizowanej mowy publicznej, oraz prof. Henryk Kozłowski zajmujący się problematyką modelowania układów bionieorganicznych, a szczególnie badaniem białek wiążących jony metali w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych: Alzheimerera i Parkinsona oraz chorób demencyjnych; w kategorii badań na rzecz rozwoju społeczeństwa prof. Jerzy Mikułowski Pomorski, autor szeregu prac naukowych z dziedziny komunikacji interpersonalnej; prof. Ewa Przybylska, twórczyni międzynarodowego projektu TEACH – Teaching Adult Educators in Continuing and Higher Education, w ramach którego postawiono diagnozę koncepcji kształcenia w krajach Europy Środkowo-Wschodniej i Południowo-Wschodniej, przeprowadzono ewaluację tej koncepcji oraz wypracowano szereg rozwiązań wspierających jakość kształcenia ustawicznego. W kategorii badań na rzecz rozwoju gospodarki nominowano prof. Andrzej Jajszczyka, znawcę zagadnień z obszaru telekomunikacji i sieci komputerowych nowej generacji, a w szczególności własności kombinatorycznych pól komutacyjnych oraz metodologii zapewnienia niezawodności i zwiększenia odporności na uszkodzenia optycznych pól komutacyjnych.

Firma L’Oreal przyznała już po raz ósmy stypendia habilitacyjne i doktoranckie dla kobiet – naukowców. Stypendia habilitacyjne otrzymują dr Barbara Klajnert z Uniwersytetu Łódzkiego, dr Iwona Łakomska z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, a stypendia doktoranckie otrzymują: mgr Edyta Dyguda-Kazimierowicz z Wro-

clawia, mgr Joanna Matyjasik z Zakładu Genetyki i Patomorfologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie oraz mgr Katarzyna Stachowicz z Krakowa.

Prezydium PAN w oparciu o rekomendacje Kapituły Medalu przyznało Medal PAN im. Mikołaja Ko-



Fotografia 5. Medal PAN im. Mikołaja Kopernika.

pernika (Fot. 5) profesorowi Włodzimierzowi Zagórskiemu-Ostojie (Fot. 6) za wybitne osiągnięcia



Fotografia 6. Prof. Włodzimierz Zagórski-Ostojia wraz z prof. Lilianą Konarską na Zjeździe FEBS w Warszawie w czerwcu 2004 roku (z archiwum redakcji).

naukowe w dziedzinie wirusologii molekularnej i biotechnologii roślin. Włodzimierz Zagórski-Ostojia należy do najwybitniejszych współczesnych polskich biochemików, którzy przyczynili się swoimi pracami do rozwoju nauk przyrodniczych w Polsce i na świecie; specjalizuje się w badaniach mechanizmu biosyntezy białka i związanej z tym ekspresji genetycznej wirusów roślinnych. W 1963 roku ukończył studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Pracę badawczą rozpoczął w Katedrze Biochemii UW w 1963 r. Zajmował się wówczas procesami oddechowymi bakterii tlenowych. Prace poświęcone izolacji i określeniu własności kilku enzymów oddechowych *Mycobacterium phlei* weszły w skład jego pracy doktorskiej obronionej w 1968 roku. W tym samym roku prof. Zagórski podjął pracę w

Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, gdzie zajmował się dwoma zagadnieniami: mechanizmami syntezy białka i ekspresją genetyczną wirusów o genomie występującym w postaci tzw. nici (+) RNA. Dużym sukcesem prof. Zagórskiego było stworzenie w latach 1970–1978 warsztatu metodycznego zezwalającego na prowadzenie badań nad regulacją syntezy białek wirusowych. Badania nad mechanizmami i regulacją syntezy białek RNA fagów zostały wyróżnione w 1978 roku Nagrodą Państwową I-go stopnia. Naturalnym rozwinięciem tych badań było zajęcie się translacją i ekspresją genetyczną wirusów roślinnych, a w konsekwencji mechanizmami syntezy białek w komórce roślinnej. Doprowadziło to do opracowania uniwersalnego roślinnego systemu translacji i stało się podstawą przyjętej w literaturze metody syntezy białek roślinnych. Badania nad regulacją syntezy białek wirusowych w układzie komórkowym, oparte o fosforylacje czynników inicjujących, zostały opublikowane w kilku pracach, nagrodzonych w 1981 roku przez Wydział II Nauk Biologicznych PAN. Kontynuacją prac prowadzonych przez prof. Zagórskiego nad wirusami roślinnymi były badania budowy genomów wirusów ziemniaczanych. Był to rezultat kilkuletniej współpracy z zespołami naukowców Polsce i spoza kraju. Po zsyntetyzowaniu i sklonowaniu kopii DNA fragmentów genomów różnych patogenów ziemniaka, prof. Zagórski wraz z zespołem wykazali, że ich zastosowanie pozwala w niezawodny sposób wykryć patogeny – nawet przy infekcjach bezobjawowych. System ten był pierwszym krajowym zastosowaniem w skali masowej programu diagnostycznego w rolnictwie opartego o metody inżynierii genetycznej. Za opracowanie metodyki hybrydacyjnego wykrywania wiroida ziemniaczanego prof. Zagórski i jego zespół otrzymali w 1985 r. nagrodę Sekretarza PAN. Sprawny system detekcji jest w dalszym ciągu podtrzymywany jako standard krajowy. Elementy metodyczne systemu są podstawą dwu patentów uzyskanych w 1992 roku. W 1991 r. prof. Zagórski rozpoczął prace nad

analizą sekwencyjną szczepów wiroida ziemniaczanego (PSTV) pochodzących z polskich kolekcji laboratoryjnych i podjął badania nad syntezą białek i składaniem genów u drożdży, wychodząc z założenia, że ta wiedza może stać się przydatna do rozważań nad patogenezą wiroidów. Badania nad patogenami roślin i genetyką drożdży doprowadziły do podjęcia systematycznych prac nad sekwencjonowaniem dużych odcinków genomu drożdży. W latach 1990–2007 prof. Zagórski pełnił funkcję dyrektora Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN. Na podkreślenie zasługują tu osiągnięcia prof. Zagórskiego przy budowie nowej siedziby Instytutu oraz stowarzyszenia Instytutu z Uniwersytetem Warszawskim. Na uznanie zasłużył rozwój w tym czasie stosunków Instytutu z laboratoriami zagranicznymi. Dzięki tym działaniom zespoły Instytutu weszły w związek bliźniaczy z laboratoriami CNRS, przetworzony w Polsko-Francuskie Centrum Biotechnologii Roślin. Współpraca zagraniczna prof. Zagórskiego jest bardzo obszerna. W latach 1974–1976 pracował na Uniwersytecie w Wisconsin, zaś w latach 1980–1991 zatrudniony był jako profesor stowarzyszony VI i VII Uniwersytetu Paryskiego. W latach 1989–1990 pełnił funkcję Directeur de Recherche CNRS, Centrum Genetyki Molekularnej CNRS w Gif-sur-Yvette. Prof. Zagórski pełnił również wiele funkcji organizacyjnych, między innymi był: przewodniczącym Komitetu Organizacyjnego XXIX Kongresu FEBS Warszawa 2004, ekspertem Komitetu Programowego „Genomics for Health and Environment” VI Programu Ramowego Komisji Europejskiej, przedstawicielem Polski w Komitecie Programowym „Quality of Life” V Programu Ramowego Unii Europejskiej. Na wzmiankę zasługuje także praca prof. Zagórskiego w Radzie Dyrektorów Placówek PAN, której był przewodniczącym. Prof. Zagórski jest członkiem korespondentem Polskiej Akademii Umiejętności i Towarzystwa Naukowego Warszawskiego.

Medal PAN im. Mikołaja Kopernika został przyznany także **prof. dr hab. Tadeusz Chojnackiemu**, profesorowi Instytutu Biochemii i Biofizyki

PAN i zasłużonemu biochemikowi. Jego zainteresowania badawcze koncentrują się na metabolizmie lipidów oraz na biochemii porównawczej. Wykształcenie lekarskie prof. Chojnackiego pozostawiło ślad w jego działalności i wielokrotnie powodowało powroty do zagadnień związanych z kliniką i analityką lekarską. Prof. Chojnacki współpracował z wieloma uznanymi na świecie zespołami botaników, fitochemików i chemików w zakresie izoprenoidów roślinnych. Wiele jego prac prowadzonych jest we współpracy z Karolińskim Instytutem Medyczo-Chirurgicznym w Sztokholmie oraz z ośrodkami naukowymi w Indiach i Japonii. Dorobek naukowy prof. Chojnackiego to przede wszystkim wyniki badań nad specyficznością enzymów biosyntezy fosfolipidów, prace nad strukturą, funkcją i metabolizmem izoprenoidów roślinnych. Wielką jego zasługą jest utworzenie w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN ośrodka referencyjnego dla badań nad koenzymami lipidowymi. Na to zagadnienie złożyły się publikacje na temat struktury i funkcji poliprenoli, dolicholi i ich pochodnych oraz opracowania dotyczące metod syntezy i analityki tych substancji. Prof. Tadeusz Chojnacki badał również możliwości pozyskiwania tych związków z materiału roślinnego, często pochodzącego z egzotycznych rejonów świata. W ostatnim okresie opublikował około 50 prac doświadczalnych, w ogromnej większości w recenzowanych czasopismach specjalistycznych o wysokim „impact factor”. Jego osiągnięcia badawcze są wymieniane w podręcznikach biochemii. Jest uznanym międzynarodowym autorytetem w dziedzinie biochemii lipidów.

Program komputerowy do lokalizowania obszaru tęczywki w obrazie oka uzyskany przy pomocy specjalnej kamery, opracowany w Katedrze Mikroelektroniki i Technik Informatycznych Politechniki Łódzkiej (PŁ), zajął drugie miejsce w międzynarodowym konkursie zorganizowanym przez University of Beira Interior z Portugalii. Autorem wyróżnionego rozwiązania jest **mgr inż. Wojciech Sankowski** (Fot. 7), a opiekunem jego pracy **prof. Andrzej Napieralski**. Zaprezentowany pro-

gram realizuje segmentację obrazu oka, co umożliwi zlokalizowanie obszaru tęczówki w obrazie oka uzyskanym przy pomocy specjalnej kamery. Rozwiązanie Po-

laków w prezentacji okazało się na tyle nowatorskie i konkurencyjne na tle innych prac konkursowych z całego świata, że jury zdecydowało o przyznaniu mu drugiej nagrody. Segmentacja obrazu oka, czyli precyzyjne zlokalizowanie w obrazie wykonanym kamerą, tęczówki oraz elementów ją przesłaniających, takich jak powie-

ki czy odbłyski występujące na powierzchni oka, pozwala na przetworzenie zlokalizowanego obrazu na liczby. Uzyskuje się matematyczny opis struktury tęczówki. To pozwala na rozpoznanie fotografowanej osoby przez porównanie z istniejącymi opisami zgromadzonymi w bazie danych, ale koniecznym warunkiem prawidłowego procesu identyfikacji jest poprawna segmentacja obrazu oka. Niezbędne są dalsze badania, dzięki którym możliwe będzie użycie technologii identyfikacji osób na podstawie wzoru tęczówki oka w tak wymagających systemach, jak np. sieci bankomatów. Katedra Mikroelektroniki i Technik Informatycznych już od kilku lat prowadzi badania nad identyfikacją osób na podstawie wzoru tęczówki. Równolegle rozwijany jest problem i złożony, i niezwykle istotny z punktu widzenia możliwych zastosowań w wielu ośrodkach badawczych na świecie. Konkurs miał charakter prestiżowy, a autorzy najlepszych ośmiu rozwiązań zostali zaproszeni do publikacji swoich wyników w czasopiśmie „Elsevier Image and Vision Computing”, które znajduje się wśród najwyższej ocenianych czasopism na świecie. Do konkursu zgłosiło się 97 ośrodków badawczych, a ostatecznie przystąpiło 27 ośrodków, a spośród nich wybrano osiem najlepszych. Ich autorami byli Chińczycy, Portugalczycy, Koreańczycy, Amerykanie, Włosi, Hiszpanie i Polacy.

Apteka z głębin morskich wg dr hab. Kseni Pazdro z Instytutu Oceanologii PAN w Sopocie. Podczas

Festiwalu Nauki w Jabłonie dr Pazdro opowiadała nie tylko o walorach odżywczych ryb, ale też o występujących w nich i w morzu związkach



Fotografia 7. Mgr inż. Wojciech Sankowski.

aktywnych biologicznie wykorzystywanych w medycynie i kosmetologii. Farmakologicznie aktywne związki pochodzące z mórz bywają skuteczniejsze w zwalczaniu dolegliwości i chorób, niż leki syntetyzowane w laboratoriach chemików. Tłuszcze rybnie zawierają wielonienasycone kwasy tłuszczowe (omega-3) redukujące stężenie cholesterolu lipoprotein

o niskiej gęstości (LDL-C) i ograniczające choroby krążenia. Glony (np. morskocyn żyjący w Morzu Bałtyckim) są źródłem jodu, potasu, magnezu, wapnia i żelaza. W przemyśle żywnościowym wykorzystuje się agar izolowany z krasnorostów i brunatnic. Nazwano go E-406 i zastosowano w wielu produktach jako zagęszczacz, substancję żelującą. Przetworzony wodorost morski *Eucheuma* to karagen oznaczony symbolem E-407, stosowany jest m.in. w jogurtach i skondensowanej bitej śmietanie. Biorąc pod uwagę zawartość korzystnych dla zdrowia elementów, nie zawsze „E” zawarte w produktach spożywczych jest czymś, przed czym konsument powinien się bronić. Farmakologia morska to dziedzina wiedzy zajmująca się izolowaniem z morza organizmów i substancji o potencjale leczniczym. Biologiczna aktywność tych związków może przekładać się na aktywność farmakologiczną. W ciągu 30 lat rozwoju farmakologii morskiej wyizolowano i opisano 20 tys. związków o takim potencjale – substancji antybakteryjnych, antywirusowych, antygrzybiczych i antynowotworowych. Opatentowano 300 z nich, a kilkanaście dopuszczono do obrotu. Komercyjne wykorzystanie zidentyfikowanych substancji aktywnych farmakologicznie wymaga wielu długoletnich zabiegów badawczo-rozwojowych. Ich końco-

wy etap – testy kliniczne – mogą trwać od 7 do 30 lat, a koszt opracowania jednego leku wynosi około 800 milionów dolarów. Przykładem leków z „głębinowej apteki” jest Zyklotyd, środek do leczenia silnego bólu neuropatycznego, około stu razy bardziej aktywny niż morfina. Lek uzyskiwany jest ze ślimaków morskich *Conus* żyjących w Pacyfiku. Ich jad zawiera paraliżujące toksyny. Drugi lek, o którym wspomniała badaczka Instytutu Oceanologii PAN, ma działanie przeciwnowotworowe. Użyto w nim substancji wydzielanych przez organizmy morskie (w tym wypadku glony). Badania wykazały, że neurotoksyczne i hepatotoksyczne zakwity można wykorzystać w farmakologii. Toksyny izolowane z cyjanobakterii wykazały aktywność przeciwnowotworową, antybakteryjną, cytotoksyczną, antywirusową i antygrzybiczną.

Zwycięzcą pierwszej edycji konkursu na najlepszy tekst popularnonaukowy w polskiej prasie za rok 2008 został Adam Zubek. Niezależne jury, w osobach prof. Magdaleny Fikus z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Anny Mazurkiewicz – dyrektor Wyższej Szkoły Komunikowania i Mediów Społecznych im. J. Giedroycia w Warszawie i znanego dziennikarza telewizyjnego – Wiktora Niedzickiego, nagrodziło dwa artykuły Zubka: „Dolina pięciu skarbów” i „A jednak potop”. Oba teksty ukazały się w „Polityce”.



Fotografia 8. Prof. Ewa Bartnik.

zes Polskiego Stowarzyszenia Dziennikarzy Naukowych „Naukowi.pl” **Sławomir Zagórski** (laureat z roku 2008 nagrody im. Prof. Bronisława Filipowicza, przyznawanej przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne), poinformował, że jury przyznało też trzy honorowe wyróżnienia. Nadto organizator konkursu przyznał także **specjalną honorową nagrodę dla naukowca przyjaznego mediom.** Laureatką za rok 2008 została **prof. Ewa Bartnik** (Fot. 8) z Uniwersytetu Warszawskiego i Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN. Przyznawane w tym roku po raz pierwszy powyższe nagrody

są inicjatywą Polskiego Stowarzyszenie Dziennikarzy Naukowych „Naukowi.pl”. Nagroda nosi imię Karola Sabatha – zmarłego przedwcześnie w październiku 2007 r. członka Stowarzyszenia, najlepszego znawcy i popularyzatora dinozaurów w Polsce.

Tematem **dorocznej, trzynastej już konferencji z cyklu Fundacji dyskusje o nauce**, przeprowadzonej w Serocku k. Warszawy w dn. 16–18 października, była „Odpowiedzialność uczonych”. Uczestniczyło w niej kilkudziesięciu uczonych, zaproszonych z różnych ośrodków naukowych z całego kraju. Tematykę konferencji wyznaczyły dwa podstawowe aspekty odpowiedzialności uczonych, tj. jej ujęcie „wewnętrzne” czyli odpowiedzialność naukowców za jakość badań, za dobór ich tematyki, za przesuwanie granic podejmowanych badań, a także ujęcie „zewnętrzne” czyli odpowiedzialność uczonych wobec środowisk pozanaukowych, związana z wykorzystywaniem wyników badań, ich popularyzacją i używaniem w dyskusjach publicznych. Referaty przedstawione podczas konferencji przez profesorów: Piotra Węgleńskiego, Dariusza Dolińskiego, Andrzeja Friszke, Ryszarda Gryglewskiego, Antoniego Sulka, Zbigniewa Jaworowskiego, Andrzeja Staruszkiewicza i Andrzeja Szostka oraz głosy w dyskusjach zainspirowanych podnoszonymi w nich problemami, opublikowane zostaną w kolejnym tomiku z serii *Fundacji dyskusje o nauce*. Wyjątkowym wydarzeniem tegorocznej konferencji było uroczyste wręczenie Honorowych Odznaczeń FNP dwóm osobom, które od wielu lat w szczególny sposób wspierają działania Fundacji: **prof. Barbarze Skardze** i **prof. Lechowi Szczuckiemu**.

Fundacja Nauki Polskiej dziękuje darczyńcom, którzy przekazali w tym roku 1% swojego podatku

dochodowego na dobro Fundacji. Zgodnie z nową procedurą od 1 stycznia do 31 sierpnia br. urzędy skarbowe przekazały na konto FNP **43 240,80 zł**. Kwota ta stanowi prawie dwukrotność środków, które Fundacja otrzymywała z odpisów na organizację pożytku publicznego w latach ubiegłych. Jesteśmy niezmiernie wdzięczni wszystkim darczyńcom. Dzięki przekazanym darowiznom 15 tegorocznych laureatów programu **POWROTY/HOMING** – młodych, zdolnych naukowców powracających do Polski po długoterminowym pobycie naukowym za granicą, otrzymała wyższe stypendium. Stypendium każdego z laureatów programu **POWROTY/HOMING** – edycja 2008, zostanie podwyższone o 4.000 zł. Na kwotę tę składają się środki otrzymane z odpisów 1% podatku, a także część darowizny w wysokości 100 tys. zł, przekazanej Fundacji w roku 2006 przez indywidualnego darczyńcę.

W Łodzi powstaje Centrum Bio- i Nanotechnologii (CBNT). W



Fotografia 9. Prof. Krzysztof Matyjaszewski.

jego tworzenie zaangażowały się przede wszystkim Politechnika Łódzka oraz instytuty PAN. Centrum ma być jednym z najnowocześniejszych ośrodków badawczych w kraju, kierunkowo zgodnych z priorytetami badawczymi Programu Ramowego UE. CBNT ma być wspomagane przez Międzynarodowy Komitet Doradczy, któremu przewodniczy **prof. Krzysztof Matyjaszewski** (Fot. 9) z

Carnegie Mellon University w Pittsburghu. Jest to ceniony na świecie specjalista od polimerów, wymieniany jako jeden z kandydatów do Nagrody Nobla. W skład komitetu wchodzi także naukowcy m.in. z Włoch, Wielkiej Brytanii i Belgii. W Centrum prace prowadzić będą zespoły naukowców z polskich i zagranicznych ośrodków akademickich i przemysłowych. Ma to sprzyjać dołączeniu do światowych liderów w dziedzinie zaawansowanych technologii. Tematycznie badania będą się skupiać przede wszystkim wokół

ochrony środowiska, energii i medycyny, a realizacja ma następować od badań teoretycznych do wdrożeń. Na potrzeby realizacji konkretnych projektów będą powoływane konsorcja badawczo-wdrożeniowe.

Prof. Tadeusz Więckowski, rektor elekt Politechniki Wrocławskiej, został nowym przewodniczącym Kolegium Rektorów Uczelni Wrocławia i Opola. Zastąpił na tym stanowisku prof. Tadeusza Lutego z Politechniki. Kadencja Kolegium będzie trwała 4 lata, a funkcje przewodniczącego będzie pełnił wybrany prof. Tadeusz Więckowski przez jeden rok, a przez następne trzy lata Kolegium będzie prowadzone przez aktualnych wiceprzewodniczących (w kolejności j.n.), prof. dr hab. Marka Bojarskiego, prof. dr hab. Bogusława Fiedora i prof. dr hab. Ryszarda Andrzejaka. Zmiana przewodniczącego nastąpić będzie 15 listopada, począwszy od 2009 r., kiedy to prof. Więckowski zastąpi prof. Bojarski. Misją Kolegium, obradującego raz w miesiącu, jest integracja środowiska akademickiego Wrocławia i Opola, wspieranie rozwoju społecznego i gospodarczego poprzez przybliżanie środowiska akademickiego i wiedzy, która w nim powstaje, mieszkańcom regionu, politykom i przedsiębiorcom oraz działania lobbingsowe na rzecz rozwiązań zmierzających do poprawy polskiej nauki.

Powstało Wrocławskie Centrum Akademickie, czyli instytucja, której zadaniem będzie koordynacja miejskich projektów edukacyjnych oraz współpraca miasta z uczelniami. Będzie to miejsce nawiązywania kontaktów i pozyskiwania informacji dotyczących wrocławskiego środowiska akademickiego, a przede wszystkim przyczyni się ono do integracji środowiska akademickiego. Z Centrum współpracować będą mogły także niepaństwowe uczelnie i ośrodki naukowe. Na czele Centrum stanął prof. Tadeusz Luty.

Po czerwcowym spotkaniu z współodkrywcą DNA prof. Jamesem Watsonem w listopadzie br. w Collegium Maius UJ odbyły się dwa spotkania z cyklu „Nauka a przemysł” z wybitnymi uczonymi, zaj-

mującymi się naukami biomedycznymi – prof. Chrisem Lipinskim i prof. Johnem Martinem. Organizatorami tych wydarzeń były CITTRU, Jagiellońskie Centrum Badań Medycznych, Fundacja Kościuszkowska oraz Klaster Life. **Prof. Chris Lipinski** jest uznanym autorytetem w dziedzinie chemii leków, konsultantem naukowym wielu firm farmaceutycznych oraz współtwórcą innowacyjnej firmy Melior Discovery. Jednym z jego ważnych osiągnięć jest opracowanie tzw. „reguły pięciu”, która dotyczy badania właściwości leków. **Prof. John Martin** zaś, wybitny specjalista-kardiolog, autor wielu nowatorskich terapii farmakologicznych i genetycznych oraz założyciel firmy biotechnologicznej ARK Therapeutics, mówił o współpracy z biznesem jako najlepszej drodze do urzeczywistnienia.

Tytuł „Ambasadora Polszczyzny”, który będzie przyznawany za wybitne zasługi w krzewieniu pięknej, poprawnej i etycznej polszczyzny, ustanowiła Rada Języka Polskiego Polskiej Akademii Nauk. Przewodniczący kapituły tytułu, prof. Andrzej Markowski, poinformował, iż godność ta będzie nadawana w pięciu kategoriach: Ambasadora Polszczyzny w Mowie, Ambasadora Polszczyzny w Piśmie, Ambasadora Polszczyzny poza Granicami Kraju, Młodego Ambasadora Polszczyzny oraz Ambasadora Polszczyzny Regionalnej. Ambasadorami Polszczyzny w Mowie został: abp Tadeusz Gocłowski za wystąpienia odznaczające się bardzo dobrą polszczyzną oraz zwięzłością i prostotą, prof. Franciszek Ziejka – w uznaniu jego wybitnego talentu oratorskiego – oraz red. Grażyna Wrońska-Walczak za radiowe audycje z cyklu „Język na zakręcie”. Tytuły **Ambasadora Polszczyzny w Piśmie** otrzymają: felietonista Jacek Fedorowicz za teksty poruszające często problematykę kultury języka i sprawności porozumiewania się, prozaik i dramaturg Janusz Głowacki – m.in. za umiejętność swobodnego posługiwania się

różnymi stylami polszczyzny, a także prof. Andrzej Szczeklik (Fot. 10) – za język pozwalający na poruszanie w twórczości problemów egzystencjalnych w sposób prosty, lecz wrażliwy i pełen humanizmu. Godność Ambasadora Polszczyzny poza Granicami Kraju kapituła przyznała: prof. Yi Lijun – tłumacze i badacze literatury polskiej kierującej Katedrą Języka Polskiego Pekińskiego Uniwersytetu Języków Obcych; prof. Barbarze Rzyski, popularyzującej polską historię, kulturę i język w Brazylii oraz dr Annie Barańczak, zarażającej polszczyzną swoich studentów w Uniwersytecie



Fotografia 10. Prof. Andrzej Szczeklik.

Harvarda.

Jubileuszowy 20. Ogólnoeuropejski Konkurs Prac Młodych Naukowców Unii Europejskiej, który odbywał się w dniach 19-26 września 2008 r. w Kopenhadze, zakończył się podwójnym sukcesem Polaków. 19-letni Paweł Maryniak z Nysy otrzymał przyznaną przez duński rząd nagrodę specjalną za badania nad zachowaniem hodowanych przez siebie karaczanów madagaskarskich; okazało się, że samce radzą sobie z orientacją przestrzenną lepiej od samic. Jedną z trzech pierwszych nagród po 7 tysięcy euro przyznano 17-letniej Magdalenie Bojarskiej za badania nad teorią grafów.

Podczas **XXII Międzynarodowych Mistrzostw w Grach Matematycznych i Logicznych w Paryżu, przeprowadzonych 29 i 30 sierpnia 2008 r.** młodzi Polacy zdobyli 8 medali (dwa złote, pięć srebrnych i brązowy). W mistrzostwach wzięło udział ok. 300 osób z 12 krajów, w tym 27 osób z Polski. Polski zespół wyłoniono w krajowych eliminacjach spośród najlepszych uczniów szkół podstawowych, średnich i studentów.

Prof. dr hab. inż. Wojciech Wróblewski z Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, otrzy-

mując z rąk Prezydenta RP tytuł profesora nauk chemicznych, stał się **najmłodszym „belwederskim” profesorem na tej uczelni;** naukowiec uzyskał stopień profesora w wielu 39 lat. Prof. Wróblewski specjalizuje się w chemii analitycznej (miniaturowe systemy analityczne). Dorobek naukowy jest bogaty; obejmuje trzy patenty i trzy zgłoszenia patentowe, około 60 publikacji z listy filadelfijskiej (sumaryczny Impact Factor 108,958), liczne referaty i wystąpienia konferencyjne oraz artykuły w czasopismach recenzowanych i monografie. Od 1992 r. prof. Wojciech Wróblewski prowadzi także aktywną działalność dydaktyczno-wychowawczą. Jest wykładowcą, kierownikiem laboratorium, promotorem rozpraw doktorskich i kilkunastu prac magisterskich. Jest także członkiem Rady Programowej międzywydziałowego kierunku studiów „Ochrona Środowiska” oraz prodziekanem ds. Nauki Wydziału Chemicznego PW w kadencji 2005/08. Najmłodszy profesor PW był wielokrotnie wyróżniany za swe osiągnięcia naukowe i dydaktyczne. W swoim dorobku ma m.in. nagrody rektora PW, granty KBN i MNiSzW.

Laureatem „Złotej róży” – II edycji nagrody Festiwalu Nauki, Instytutu Książki i Redakcji Nowych Książek, został dr Marek Ostrowski, przyrodnik z Uniwersytetu Warszawskiego. Książki jego autorstwa – „Spojrzenie Warsa”, „Oblicze Sawy” i „Pokolenie Varsovia.pl” z cyklu „Tryptyk Warszawski”, zostały uznane przez jury za najlepsze książki popularnonaukowe w sezonie wydawniczym 2007/2008. Rada Programowa FN wyróżniła także młodego badacza dr. Michała Bilewicz z Wydziału Psychologii UW za prezentację „Swoi i obcy. Jak ich widzimy?”

Odszedł ojciec nowoczesnej medycyny, prof. dr hab. med. Tadeusz Orłowski (Fot. 11), pionier transplantologii, twórca interny w Polsce, wielki naukowiec, wychowawca wielu pokoleń lekarzy, taternik i alpinista. Tadeusz Orłowski uważany jest za pioniera polskiej transplantologii i ojca interny. Urodził się 13 września 1917 w Kazaniu nad Wołgą. Dyplom lekarza uzyskał na taj-

nym Uniwersytecie Warszawskim w 1943 r., na którym był później wykładowcą i gdzie w 1949 r. uzyskał tytuł doktora. W czasie Powstania Warszawskiego pracował jako lekarz w warszawskich szpitalach. Należał do AK. Był odznaczony m. in. Warszawskim Krzyżem Powstańczym oraz Krzyżem Komandorskim z Gwiazdą Orderu Odrodzenia Polski. Prof. Tadeusz Orłowski był wybitnym specjalistą w zakresie medycyny wewnętrznej, nefrologii oraz transplantologii. Stworzył polską szkołę dializoterapii. W roku 1959 uruchomił w Warszawie ośrodek dializacyjny, tzw. sztuczną nerkę.



Fotografia 11. Prof. dr hab. med. Tadeusz Orłowski, po lewej.

Dzięki pracy profesora i jego zespołu udało się wyprodukować i opatentować polską sztuczną nerkę arkusową i dializatory zwojowe. W 1966 r. wraz z prof. Janem Nielubowiczem dokonał pierwszego udanego przeszczepu nerki ze zwłok. W 1975 r. z jego inicjatywy powstał Instytut Transplantologii Akademii Medycznej w Warszawie. W 1986 r. profesor przeszedł na emeryturę, ale niemal do ostatnich dni życia poświęcał się badaniom nad przeszczepianiem wysepek trzustkowych u chorych z cukrzycą. Jego pasją było wspinanie się po górach. W latach 1939-45 prof. Orłowski zasiadał w zarządzie konspiracyjnego Klubu Wysokogórskiego oraz był redaktorem tajnego pisma „Taternik”.

17 sierpnia 1991 roku wysłał pierwszy polski e-mail. Wiadomość (ale nie list tylko pakiet IP) przesłali z budynku Instytutu Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego Krzysztof Heller i Rafał Pietrak do Jana Sorensena, szefa Ośrodka Komputerowego Uniwersytetu Kopenhaskiego. Bezpośrednie połączenie między serwerami dwóch uniwersytetów, umożliwiające przesłanie maila, nastąpiło już w lipcu 1991 roku, a już wcześniej polscy naukowcy mogli łączyć się z placówkami naukowymi w Europie, ale było to bardzo skomplikowane i osiągalne

przez zwykłe połączenia telefoniczne pomiędzy wieloma instytucjami. Główne prace nad możliwością przesyłania informacji pomiędzy komputerami rozpoczęły się pod koniec lat 80. Polscy profesorowie nawiązali wówczas kontakt z profesorami z kluczowych uczelni amerykańskich. Odegrali oni kluczową rolę w podłączeniu Polski do Internetu. Sześciu naukowców – w tym Rafał Pietrak – otrzymało od prezydenta Aleksandra Kwaśniewskiego Krzyż Zasługi. Rafał Pietrak w roku 1991 roku był jedynie młodym pracownikiem Instytutu Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego,

a później był bezrobotny. Kilka lat wcześniej skończył studia. Zainteresował się komputerami i był jedynie częścią środowiska, któremu zależało na przyłączeniu Polski do globalnej sieci internetowej. Oficjalne przyłączenie Polski do globalnej sieci internetowej nastąpiło w styczniu 1991 roku, po zgodzie administracji ówczesnego prezydenta USA Georgea Busha. Dzisiaj szacuje się, że z Internetu korzysta ponad 800 milionów osób, z czego w naszym kraju – ponad 9 milionów.

Biologiczne uwarunkowania życia człowieka, genetyczny ślad wędrówek organizmów w czasie i przestrzeni, związki ekologii z biologią ewolucyjną – to tylko niektóre z całej serii wykładów, jakie proponuje wszystkim chętnym Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, w trzecim już cyklu comiesięcznych, poniedziałkowych spotkań z biologią XXI wieku. Organizatorzy zapraszają do uczestnictwa przede wszystkim uczniów i nauczycieli biologii i nauk pokrewnych. Pierwsze spotkanie z serii odbyło się na początku października. W jego trakcie prof. Jerzy Dzik (Instytut Paleobiologii PAN) mówił o granicach poznania w biologii ewolucyjnej. Kolej-

ne, listopadowe spotkanie poprowadził prof. Jan Kwiatowski (Instytut Botaniki UW), a podczas następnego głos należeć będzie do profesorów – Andrzeja Kaczanowskiego (Instytut Zoologii UW), Tomasza Umińskiego (Szkoła Wyższa Przymierza Rodzin), Krzysztofa Spalika (Instytut Botaniki UW) i Piotra Dawidowicza (Instytut Zoologii UW). III cykl wykładów zakończy w kwietniu przyszłego roku – rok 2008/2009 jest rokiem Karola Darwina na Uniwersytecie Warszawskim – referat prof. Piotra Węgleńskiego (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), byłego rektora UW, zatytułowany „Wszystkie geny człowieka”.

Biologia molekularna człowieka (Fot. 12) to podręcznik obejmujący wiedzę nie tylko z zakresu biologii molekularnej, ale również genetyki, biotechnologii i cytologii. Zaprezentowano w nim najnowsze odkrycia w badaniach nad genami, genomem, komórkami, wirusami i bakteriami. Omówiono m.in.: chromatyny i chromosomy, ekspresję genu, RNA i translację, strukturę i funkcję białek, błony i kanały, receptory na powierzchni komórki i rozpoznawanie antygeny, białka cytoszkieletu, przewodzenie sygnału, bioaktywne lipidy i cytokiny pośredniczące w procesach zapalnych, hormony i czynniki wzrostowe, czynniki hemopoetyczne, czynniki angiogenne, czynniki o aktywności naczyniowej, a także rozwój i jego przebieg, metabolizm, zagadnienia związane z krwią, problemy odporności i funkcje przeciwciał, zagadnienia związane z neurobiologią, genetyczne układy eksperymentalne, badania genów i białek, nokauty



Fotografia 12.

genetyczne oraz transgeniczność i klonowanie. Podręcznik uzupełniają liczne tabele i ryciny. Na końcu każdego rozdziału zamieszczono pytania kontrolne, które pozwalają na sprawdzenie przyswojonej wiedzy. „Biologia molekularna człowieka” prezentuje najnowsze dane w tej bardzo szybko rozwijającej się dziedzinie nauki. Profesjonalne opracowanie tekstu oraz indeks hasel ułatwiają zrozumienie i odszukanie potrzebnych informacji.

Dział pod redakcją Teresy Wesołowskiej

Szanowny Pan
 Profesor Sławomir Pikuła
 Redaktor Naczelny
 Postępy Biochemii

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Szanowny Panie Profesorze,

Z przykrością stwierdzam, że niektóre artykuły opublikowane w Postępkach Biochemii w latach 2006–2007 zawierają błędy rzeczowe i nomenklaturowe. A przecież Postępy Biochemii są jedynym czasopiśmie polskojęzycznym, poświęconym tej (jakże ważnej) dyscyplinie naukowej. Mają być autorytetem w zakresie terminologii biochemicznej i źródłem nowoczesnej wiedzy, przede wszystkim dla młodych biochemików i innych adeptów szeroko pojętej biologii.

Przedstawiam dość długą listę rażących uchybień.

Zdziwieniem napawa stwierdzenie, że autorzy zgłaszający pracę na temat patobiochemii procesu krzepnięcia krwi nie potrafią nawet poprawnie nazwać opisywanych zjawisk i opisują rzeczy sprzeczne z elementarną wiedzą na ten temat. Produktem krzepnięcia krwi wyznaczonym jest **skrzep** krwi (łac. *coagulum sanguinis*, ang. *blood clot*), natomiast w świetle naczyń powstaje **zkrzep**, czyli **skrzepina** (łac. *thrombus*, ang. *thrombus*). Nie ma „**skrzepów wewnątrznaczyniowych**”, są natomiast **zkrzepy**, czyli **skrzepiny** i to wyłącznie wewnątrznaczyniowe [1].

Nie istnieje „**tromboza**”. To dziwoląg językowy wprowadzony przez Autorów. Zespół chorobowy polegający na powstawaniu zkrzepów (skrzepin) nosi nazwę **zkrzepicy**. Nie istnieją „skrzepy miażdżycowe” [1]. Nie istnieje „ostry proces trombozy” [1]. Nie jest prawdą, że „niskie dawki kwasu acetylosalicylowego zwiększają przepuszczalność skrzepów u ludzi zdrowych” [1], chociażby dlatego, że u ludzi

zdrowych „skrzepy” nie powstają. Nonsensem jest twierdzenie, że „proces polimeryzacji fibryny rozpoczyna się od przecięcia przez trombinę **peptydów A i B fibryny** od N-końca łańcuchów $A\alpha$ i $B\beta$ ” [1]. Fibryna w ogóle nie zawiera ani peptydów A i B, ani łańcuchów $A\alpha$ i $B\beta$. To **fibrynogen** zawiera takie łańcuchy. To fragmenty N-końcowe łańcuchów $A\alpha$ i $B\beta$ fibrynogenu, a nie fibryny, odpowiednio fibrynopeptyd A i fibrynopeptyd B są odłączane na drodze proteolitycznej przez trombinę. Nie jest prawdą, że „monomery fibryny asocjują w dwuniciową macierz” [1]. Taka „dwuniciowa macierz” w ogóle nie istnieje. Nie jest też prawdą, że włókna fibryny są rozgałęzione [1].

Fibrynogen **nie jest** „czynnikiem ryzyka występowania choroby wieńcowej, udaru mózgu i śmiertelności niezależnej od układu krwionośnego” [1]. Szkoda, że nie wymieniono choćby jednej choroby „niezależnej od układu krwionośnego” i wywołanej przez fibrynogen. Białko to jest normalnym, fizjologicznym składnikiem osocza. To nie fibrynogen lecz **hiperfibrynogenemia** predysponuje do rozwoju niektórych chorób. Skrzep nie jest „**odporny**” [1] lecz **oporny** na lizę. Odporność i oporność to różne zjawiska.

Kwas salicylowy nie wpływa na układ bódźco-przewodzący serca, dlatego nie ma zastosowania w „leczeniu migotania przedsionków” [1]. Oczywiście może zapobiegać powstawaniu zkrzepów w migoczących przedsionkach. W polskiej terminologii medycznej i biochemicznej nie funkcjonuje „**uremia**” ani „**koagulacja krwi**” [1]. Właściwe terminy to „**mocznica**” i „**krzepnięcie krwi**”. Nie jest prawdą, że mocznik jest przekształcany w „**izocyjanat**”, który powoduje „**karbamylację**” białek [1]. Taki związek w ogóle nie istnieje, a wspomniany proces nie zachodzi. W cytowanym oryginale jest mowa o *isocyanate*, czyli o **izocyjanianie** i o *carbamoilation*, czyli o **karbamoilacji**.

Nie ma osób „potencjalnie zdrowych” [1], są natomiast osoby zdrowe lub chore. Zmiany, o których mowa w tym artykule nie są „**patogenne**” lecz **patologiczne**.

Znajomość chemii przydaje się także i biochemikowi. Trudno uwieźnić, że biochemik nie odróżnia **siarczanu** od **sulfonianu** [2,9]. Sulfonowanie tyrozyny jest możliwe jedynie *in vitro*, i to w drastycznych warunkach. *In vivo* reszty tyrozylowe nie podlegają sulfonowaniu, lecz siarczanowaniu. A przecież w cytowanych oryginałach proces ten jest nazwany poprawnie; *sulfation* czyli siarczanowanie.

Nie jest prawdą, że „metabolity rezorcynolu okazały się ...sulfonowymi i glukuronosulfonowymi koniugatami” [9]. *Sulphate* nie jest sulfonianem lecz siarczanem. Metabolity, o których mowa, są estrami siarczanowymi lub glukuronianowymi rezorcynolu. Zdziwieniem napawa rycina 3 w pracy [9]. Przedstawia ona „proponowany szlak degradacji alkilorezorcynoli”. W jednym z etapów tego procesu ma zachodzić „koniugacja z glukuronianami i sulfonianami”. A przecież istnieje tylko jeden kwas glukuronowy i jeden anion zwany glukuronianem. Szkoda, że nie wymieniono chociażby jednego „sulfonianu”, który „koniuguje się” z alkilorezorcynolami. Przecież to zupełny nonsensem. A prawda jest taka, że w procesie biotransformacji alkilorezorcynoli nie uczestniczą żadne „glukuroniany” ani „sulfoniany”, lecz reszty glukuronianowe i siarczanowe, których dostarczycielami są odpowiednio UDP-glukuronian i 3'-fosfoadenozyno-5'-fosfosiarcezan, zwany także aktywnym siarczanem. Powstają siarczan lub glukuronian odpowiedniego alkilorezorcynolu.

Nie jest prawdą, że „podjednostki CYP4A i CYP4F cytochromu P₄₅₀ katalizują niespecyficzną ω -hydroksylację...” (9). **Takie podjednostki w ogóle nie istnieją**. Wymienione symbole oznaczają odpowiednie

izoformy (izoenzymy) cytochromu P₄₅₀, a nie jego podjednostki.

Cytochromy P₄₅₀ podzielono na rodziny i podrodziny, a każdemu izoenzymowi przypisanemu do określonej podrodziny nadano indywidualny numer identyfikacyjny. CYP oznacza przynależność enzymu do cytochromów P₄₅₀. Następujący po nim symbol cyfrowy oznacza przynależność izoenzymu do określonej rodziny tych cytochromów. Kolejny symbol literowy oznacza podrodzinę w obrębie rodziny, a dalszy symbol cyfrowy wskazuje indywidualny numer identyfikacyjny izoenzymu w obrębie podrodziny.

Nie ma hamowania „kompetencyjnego” [9]. Proces, o którym mowa w cytowanym artykule jest hamowaniem kompetencyjnym. Tabela 1 w artykule [9] przedstawia skład procentowy całych ziaren zbóż. Suma zawartości wymienionych tam składników wynosi 130,6%. A wydawałoby się, że powinna wynosić 100%.

Przedrostek „extra” w łacinie i języku angielskim oznacza „poza”, np. *extravascularis*, *extravascular* (pozanaczyniowy), *extraperitonealis*, *extraperitoneal* (pozaotrzewnowy), *extrauterinus*, *extrauterinal* (pozamaciczny). To łaciński i angielski przedrostek „inter” odpowiada polskiemu przedrostkowi „między”, np. *intercellularis*, *intercellular* (międzykomórkowy). Dlatego *extracellular matrix* jest macierzą **pozakomórkową**, a nie „międzykomórkową” [2]. Ta ostatnia, gdyby istniała, nosiłaby nazwy, łacińską i angielską, odpowiednio *matrix intercellularis* i *intercellular matrix*.

Reszty tyrozyny – to reszty tyrozylowe, a reszty leucyny, to reszty leucylowe, przez analogię do innych reszt kwasowych: formylowych, acetylowych, propionylowych, butyrylowych, *etc.* Terminy: „reszta tyrozynowa”, „reszta leucynowa”, „reszta serynowa” [2] są niepoprawne. Można je zaakceptować w wersji rzeczownikowej: np. reszta tyrozyny, reszta leucyny, reszta seryny.

Nie istnieje „syntetaza tlenu azotu” [2]. *Nitric oxide synthase* jest **syntazą**. Syntazy i syntetazy to zupełnie różne enzymy, należą do różnych klas, odpowiednio do 4-ej i 6-ej.

Nie ma „drugorzędowych przekazników informacji” [2], są natomiast wtórne przekazy (secondary messengers). Terminy te funkcjonują w polskiej terminologii biochemicznej co najmniej od początku lat 70-tych ubiegłego wieku. Wielki Słownik Angielsko-Polski przypisuje angielskim terminom *second* i *secondary* szereg polskich odpowiedników. Nie ma wśród nich terminu: „drugorzędowy”. Określenie to oznacza coś zupełnie innego. W chemii i biochemii jest zarezerwowane dla określenia struktury przestrzennej: amin, alkoholi, kwasów nukleinowych i białek.

PI-3K (*phosphoinositide-3 kinase* inaczej *phosphatidylinositol-3-kinase*) nie jest kinazą 3-fosfatydyloinozytoli [2,6], bo nie fosforyluje 3-fosfatydyloinozytoli. Zresztą taki związek **w ogóle nie istnieje**. Nie jest też kinazą 3-fosfo-fosfatydyloinozytoli [5]. Jest po prostu 3-kinazą fosfatydyloinozytoli lub fosfatydyloinozytoli-3-kinazą. Fosforyluje grupę -OH w pozycji 3 pierścienia inozytoli zawartego w fosfatydyloinozytoli. Tej poprawnej nazwy używa Autorka innej pracy opublikowanej w *Postęпах Biochemii* [7].

Z całą pewnością nie zachodzi „mutacja aminokwasów” [2]. To nie aminokwasy, lecz DNA (u niektórych wirusów RNA) ulega mutacji.

Aminoheksozy, to odpowiednio: glukozoamina, galaktozoamina i mannozoamina, a nie „glukozamina”, „galaktozamina” czy „mannozamina” [3]. Nie ma „heksozamin”, są heksozoaminy.

Nie jest prawdą, że w skład cząsteczki owomukoidu „wchodzą trzy łańcuchy polipeptydowe ułożone liniowo i połączone wiązaniami peptydowymi” [4]. Jeżeli trzy łańcuchy polipeptydowe są ułożone liniowo i połączone wiązaniami pep-

tydowymi, to są jednym łańcuchem polipeptydowym. Tak też wynika z ryciny 1, zawartej w cytowanej pracy. Owomukoid jest polipeptydem jednołańcuchowym, złożonym ze 186 reszt aminokwasowych. Bardzo jestem ciekaw, na czym polega „redukcja wolnych grup aminowych w owomukoidzie” [4]? Co jest produktem tej reakcji? Przecież azot występujący w tej grupie jest maksymalnie zredukowany. Grupa aminowa nie może się redukować, może się jedynie utleniać. Co to są „izomeryczne łańcuchy inhibitorów” wchodzące w skład owomukoidu [4]? To dziwna forma izomerii. Każdy z trzech „izomerów” ma inny skład aminokwasowy. Na czym więc polega ta izomeria? Co to znaczy „nonkowalentny półprodukt” [4]? Co to jest „determinant antygeniczny” [4]? Domyślam się, że chodzi o determinantę antygenową? Determinanta jest rzeczownikiem rodzaju żeńskiego i wcale nie jest „antygeniczna”, lecz antygenowa. Bezsensownym jest twierdzenie, że „pomiędzy alergenami jaj różnych gatunków ptaków istnieje reakcja krzyżowa” [4]. Reakcje nie istnieją, lecz zachodzą, lub przebiegają. Ciekaw jestem w jaki sposób alergen jaja przepiórki japońskiej reaguje z alergenem jaja strusia afrykańskiego? Przecież antygeny (wśród nich alergeny) reagują krzyżowo nie pomiędzy sobą, lecz z przeciwciałami. Co to jest „inaktywacja aktywności” [4]?

Z lektury artykułu [4] dowiedziałem się, o możliwości „mechanicznego usunięcia owomukoidu z białka”. Czy w ogóle można usunąć mechanicznie jakiegokolwiek białko z białka, czy z jakiegokolwiek materiału biologicznego? Byłby to nowy, nieznaný dotąd sposób izolacji białka. Szkoda, że Autorki nie wyjaśniły na czym to polega. Niezwykle „ciekawa” jest tabela 1 w cytowanej pracy [4]. Jak wynika z legendy ma ona wskazywać „umieszczenie centrów aktywnych w trzech domenach owomukoidów wybranych gatunków ptaków”, ale ich nie wskazuje. Zamiast 3 domen Autorki przedstawiają 7 nieobjaśnionych symboli: P₁, P₂, P₁, P₁, P₂, P₃ i P₄. Wbrew informacji zawartej w legendzie nie wskazują

„umiejscowienia centrów aktywnych”. Przedstawiają jedynie (nie wiadomo po co) trzyliterowe symbole niektórych aminokwasów. A przecież cząsteczka owomukoidu zawiera wiele reszt Cys, Thr, Leu, etc. Które z nich tworzą „centra aktywne”? Równie „ciekawa” jest tabela 2 w tym samym artykule [4]. Przedstawia ona między innymi „chemiczną charakterystykę owomukoidu”. Dziwna to charakterystyka. Pokazuje zawartość różnych składników w 1 molu owomukoidu. Są tam wymienione między innymi heksoza, „mannowa” (prawdopodobnie chodzi o mannozę), galaktoza i glukozamina, „reszta acetylowi”, tyrozyna oraz tryptofan, którego nie ma. A przecież nie istnieje cukier o nazwie „heksoza”. Tym terminem określa się wszystkie cukry sześciowęglowe. Galaktoza, mannoza i glukozoamina są właśnie heksozami. Dlaczego więc suma ich zawartości jest wielokrotnością ilości heksoz wymienionych w tabeli?

Odrębną pozycję stanowią związki azotowe występujące w owomukoidzie. Ich zawartość wynosi 22 mole na mol owomukoidu. A jakież to „związki azotowe” może zawierać owomukoid? Jest on białkiem, a każdy z aminokwasów w nim zawarty jest „związkiem azotowym”. 1 mol owomukoidu zawiera 186 moli aminokwasów, czyli nie mniej niż 186 moli związków azotowych. A przecież glukozoamina zawarta w tej glikoproteinie jest także związkiem azotowym. Skąd więc wzięła się wartość: „22 mole związków azotowych na mol owomukoidu”? Stwierdzenie, że „w skład trzeciego z homologów owomukoidu” jaja gęsi domowej wchodzi 51 reszt aminokwasowych [4] jest pozbawione jakiegokolwiek sensu. Z całą pewnością „trzecia domena owomukoidu” [4] nie jest „trzecim homologiem” tego białka [4].

Nie ma cząsteczek „niskich” ani „wysokich”, dlatego nie może być związków „niskocząsteczkowych” [4] ani „wysokocząsteczkowych” [2]. Są natomiast cząsteczki małe (drobne) lub wielkie, stąd zasadnymi są terminy „małocząsteczkowy”, „drobnocząsteczkowy” lub „wiel-

kocząsteczkowy”. Anglojęzyczne terminy: „low” i „high” nie są bynajmniej prostymi odpowiednikami naszych przymiotników: niski i wysoki. Przecież człowieka niskiego wzrostu nie określamy terminem „low”, lecz „short”, a wysokiego nie określamy przymiotnikiem „high” lecz „tall”. Czy jakiegokolwiek białko może być „niskocząsteczkowe” [8]? Przecież białko jest typowym, podręcznikowym przykładem substancji wielkocząsteczkowej. Przecież różni się od podobnie zbudowanych peptydów właśnie **wysoką** masą cząsteczkową.

Co to są „tłuszcz całkowite” lub „błonnik całkowity” [9]? Czy istnieją tłuszcze „niecałkowite” (np. „półtłuszcz”) ? Angielski termin „total” ma szereg znaczeń. *Total lipids* oznacza całkowitą (ogólną, sumaryczną) ilość tłuszczów, a nie „tłuszcz całkowite”.

Receptor purynoergiczny P2Y₁₂ nie jest „tarczą” [2] lecz „celem” dla leków przeciwwązkrzepowych (vide J. Stanisławski, Wielki Słownik Angielsko-Polski). Jest miejscem, poprzez które lek odnajduje komórkę docelową (*target cell*). Gdyby receptor był „tarczą”, nie wiązałby leku, lecz (jak na tarczę przystało) chroniłby komórkę przed jego wianiem.

Gości zapewniam, że nie ma choroby zwanej „artretyzmem” [7]. Nie można mówić o „tkance łącznej i kostnej” [7]. To tak, jakby ktoś opowiadał o zwierzętach i wielbłądach. Przecież wielbłąd to też zwierzę, a kość to także tkanka łączna.

Wydawałoby się, że nazewnictwo hormonów, przynajmniej tych znanych od dziesięcioleci, to sprawa oczywista i już zamknięta. A jednak nie. Pojawił się neologizm i to zupełnie bezzasadny. FSH (*follicle-stimulating hormone*) – nie jest „hormonem folikularnym” [7], lecz (jak wskazuje jego angielska nazwa) jest hormonem pobudzającym pęcherzyki (Graafa), lub jak zaleca Wielki Słownik Medyczny PAN-PZWL Warszawa 1996, hormonem folikulotropowym.

Gości apeluję o zwiększenie nadzoru redakcyjnego nad Postępami Biochemii. Wyżej opisane „wypadki przy pracy” nie powinny się powtarzać.

Z wyrazami szacunku,

Edward Bańkowski

Zakład Biochemii Lekarskiej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Mickiewicza 2c, 15-089 Białystok

Białystok, 24 września 2008 r.

PRZYPISY

1. Sikora M, Twardowski T, Jakubowski H (2006) Rola tiolaktanu homocysteiny w niektórych chorobach człowieka. *Postepy Biochem* 52: 417-423
2. Kralisz U, Stasiak M (2007) Udział receptorów kolagenu płytek krwi w hemostazie pierwotnej. *Postepy Biochem* 53: 344-355
3. Krześlak A (2007) Wpływ modyfikacji białek komórkowych przez O-GlcNAc na proces przekazywania sygnału. *Postepy Biochem* 53: 389-399
4. Winiarska-Mieczan A, Kwiecień M (2007) Charakterystyka owomukoidu – jednego z ważniejszych alergenów pokarmowych. *Postepy Biochem* 53: 212-217
5. Dzikiewicz A, Szwejkowska-Kulińska Z (2006) Degradacja mRNA niosących przedwczesny kodon stop (NMD) – na straży jakości mRNA. *Postepy Biochem* 52: 390-398
6. Zych Z, Szatkowska I, Czerniawska-Piątkowska E (2006) Szlaki sygnałowe hormonu wzrostu. *Postepy Biochem* 52: 367-372
7. Zimowska M (2006) Ścieżki sygnalizacyjne rodziny transformujących czynników wzrostowych typu β. *Postepy Biochem* 52: 360-366
8. Węsierska-Gądek, Bednarek J, Kiliańska ZM (2007) Nowe oblicze białek antyapoptotycznych. II. Surwiwina. *Postepy Biochem* 53: 239-253
9. Kulawinek M, Kozubek A (2007) 5-n-alkilorezorcynole pełnych ziaren zbóż i pełnoziarnistych produktów spożywczych jako biomarkery zdrowej diety. *Postepy Biochem* 53: 287-296

Systemy genów reporterowych opartych na zjawisku bioluminescencji*

Simon T.M. Allard

Promega Corporation

*Tekst i ilustracje przedrukowano za zgodą Promega Corporation eNotes, wydanie: Październik 2008. Produkty omawiane w niniejszym artykule posiadają lub ubiegają się o patenty i mogą posiadać pewne ograniczenia w użyciu. Prosimy o sprawdzenie strony www.promega.com patent and trademark celem uzyskania dokładnych informacji. Dual-Glo, Dual-Luciferase and Stop & Glo są zarejestrowanymi znakami towarowymi Promega Corporation. DLR i Rapid Response są zarejestrowanymi znakami towarowymi Promega Corporation.

STRESZCZENIE

Geny reporterowe są zwykle używane do monitorowania zmian wydajności transkrypcji, które mogą zachodzić bardzo szybko, w odpowiedzi na specyficzne reakcje wewnątrz komórki. Poniżej przedstawiono podstawy dotyczące oznaczeń z wykorzystaniem bioluminescencyjnych systemów genów reporterowych oraz ich zastosowań w badaniach naukowych.

WPROWADZENIE

Bioluminescencja jest specyficzną formą chemiluminescencji, zachodzącą w organizmach żywych. Ten rodzaj chemiluminescencji jest procesem katalizowanym przez enzymy, w którym wysoka efektywność emisji fotonu została osiągnięta na drodze naturalnej ewolucji. Enzymy odpowiedzialne za ten proces nazywane są lucyferazami, a zdolne do emisji fotonów substraty lucyferynami. Systemy oznaczeń, wykorzystujące bioluminescencyjne właściwości chemiczne różnych związków, powstały z różnych, niezależnych źródeł i składa się na nie wiele charakterystycznych cząsteczek. Pośród wielu naturalnych form, do wykonywania oznaczeń z wykorzystaniem systemów genów reporterowych, dwie używane są powszechnie: lucyferaza ze świetlików i lucyferaza z renilli [1].

Geny reporterowe są szeroko wykorzystywane w badaniach farmakologicznych, biomedycznych, w biologii molekularnej oraz biochemii, jako wskaźniki ekspresji genów oraz reakcji wewnątrzkomórkowych z nią powiązanych. Zwykle gen reporterowy jest klonowany wraz z badaną sekwencją DNA w wektor ekspresyjny, którym następnie transfekowana jest wybrana komórka. Po transfekcji, komórki bada się na obecność genu reporterowego poprzez bezpośredni pomiar obecności produktu – białka reporterowego lub też pośrednio, poprzez oznaczenie aktywności enzymatycznej tego białka. Dobrej jakości gen reporterowy jest łatwy do identyfikacji i oznaczeń ilościowych, jeśli tylko ulega ekspresji w badanym organizmie lub komórkach.

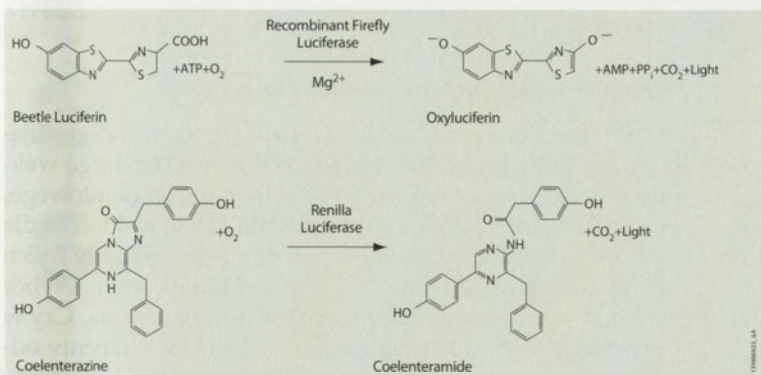
Na użytek laboratoriów opracowano cały szereg technologii reporterowych. Oznaczenia wykorzystujące jako reporter lucyferazę odznaczają się nieporównywalną z innymi metodami czułością, zakresem dynamicznym, wszechstronnością i łatwością użycia. Większość technologii wykorzystujących systemy genów reporterowych zostało opracowanych przez firmę Promesa. Poniższy artykuł będzie więc koncentrował się na dwóch z nich, w których zastosowanie znalazła lucyferaza ze świetlika lub renilli, oraz na rozwoju technologii rekombinowanych białek i ich zastosowań w oznaczeniach z wykorzystaniem systemów podwójnych genów reporterowych. Omówione także zostaną czynniki mające wpływ na dobór odpowiedniego dla danego reportera wektora ekspresyjnego, a także korzyści płynące z wykorzystania zjawiska bioluminescencji oraz inne zastosowania reporterów lucyferazowych.

PRZEWAGA BIOLUMINESCENCJI

Bioluminescencyjne oznaczenia genów reporterowych mają znaczną przewagę nad oznaczeniami fluorescencyjnymi, np. wykorzystującymi zielone białko fluorescencyjne (GFP), ponieważ dzięki ich zastosowaniu osiąga się od 10 do 1000 razy wyższą czułość. Tak zwiększona czułość może znacząco poprawić jakość wykonywanych analiz, szczególnie jeśli oznaczenia wykonywane są na złożonych próbkach biologicznych [2]. Przyczyna takiego stanu rzeczy staje się jasna, kiedy prześledzi się mechanizmy produkcji światła poprzez fluorescencję i luminescencję. W wyniku obydwóch procesów wytwarzane są fotony, w konsekwencji przechodzenia elektronów z orbitali molekularnych w stanie energetycznego wzbudzenia do stanu o niższej energii. Jednakże procesy te różnią się



Wesołych Świąt oraz Do Siego roku 2009
dla firmy Symbios Sp. z o.o., wyłączny
dystrybutor firmy Promega w Polsce.



Rycina 1. Diagram reakcji katalizowanych przez lucyferazy: świetlika i *Renilla* z ich odpowiednimi substratami, lucyferyną chrząszcza i koelenterazyną celem wytworzenia światła. Przedrukowane za zgodą Promega Corporation.

sposobem wywoływania stanu wzbudzenia elektronów. W luminescencji, stany wzbudzenia są produktem egzotermicznych reakcji chemicznych, podczas gdy w przypadku fluorescencji stany wzbudzenia powstają poprzez absorpcję światła. W analizie reporterów, bioluminescencja wykazuje przewagę nad fluorescencją, ponieważ do zaistnienia stanu wzbudzenia nie jest wymagane dostarczenie fotonów z zewnątrz. Dzięki temu, nie mogą one dokładać się do powstawania efektu świecenia tła, które ma miejsce podczas mierzenia wpływu fotonów z wzbudzonej próbki, w czasie pomiarów fluorescencyjnych. W rezultacie możliwy jest niezwykle precyzyjny pomiar niewielkich zmian w emisji światła z próbek, zachowujący w oznaczeniach luminescencyjnych liniowość w zakresie od czterech do ośmiu rzędów wielkości.

REPORTERY LUCYFERAZOWE

Technologia reporterów lucyferazowych oparta jest na oddziaływaniach enzymu lucyferazy z luminescencyjnym substratem - lucyferyną, uwalniającą światło na drodze procesu bioluminescencji. Bioluminescencja występuje naturalnie u szeregu organizmów, jednakowoż, ze względu na osiąganą czułość oznaczeń, jak i wygodę stosowania oraz silne sprzężenie syntezy białka z aktywnością enzymu, najczęściej wykorzystywanym do badań naukowych reporterem bioluminescencyjnym jest lucyferaza świetlika (*Photinus pyralis*). Ten monomeryczny enzym (61 kDa) katalizuje dwustopniową oksydację w celu wytworzenia światła, mieszczącego się zwykle w zakresie spektralnym od zieleni do żółci – 550–570 nm (Ryc. 1). W wyniku zmieszania z substratami, lucyferaza świetlika produkuje wstępny wyrzut światła, który następnie ulega zanikowi, przez około 15 sekund, osiągając po tym czasie niski poziom trwałej luminescencji. Gen kodujący lucyferazę świetlika (*luc*) to cDNA i nie wymaga potranslacyjnych modyfikacji. Oznacza to, że jest on dostępny, jako enzym bezpośrednio po translacji z mRNA, co jest szczególnie ważne, jeśli wykorzystuje się gen reporterowy poza jego rodzimym środowiskiem.

Inną powszechnie używaną lucyferazą jest lucyferaza z renilli (*Renilla reniformis*), jamochłona (*Coelenterata*), odpowiadającego jasnozielonymi błyskami na stymulację dotykową. Lucyferaza z renilli (36 kDa) jest monomerycznym

enzymem, katalizującym oksydację koelenterazyny, w wyniku której powstaje cząsteczka koelenteramidu i wydzielane jest niebieskie światło, o fali 480 nm (Ryc. 1). Tak jak lucyferaza świetlika, gen reporterowy *Renilla* to cDNA nazywany *Rluc*, który nie wymaga modyfikacji potranslacyjnej.

Poprzez wiązanie funkcjonalnych elementów regulatorowych z ekspresją genu lucyferazy, zazwyczaj, poprzez umieszczenie ich „upstream” – w pozycji poprzedzającej gen kodujący lucyferazę, reakcja wewnątrzkomórkowa może zostać wykryta przez pomiar sygnału luminescencyjnego. W ten sposób, sygnalizacja lub proces komórkowy może zostać poddany badaniom bez konieczności bezpośredniego oznaczania komórkowego produktu genu. Zwykle, geny reporterowe lokuje się „downstream” czyli w pozycji po sklonowanych elementach odpowiedzi. Transfekowane do komórki, w połączeniu z silniejszymi promotorami, wywołują one zwiększoną syntezę *luc* mRNA, a w następstwie produkcję zwiększonej ilości białka. Intensywność światła wytwarzanego w obecności lucyferyny umożliwia więc naukowcom określenie siły użytego w danym systemie doświadczalnym promotora lub stwierdzenie jak dany promotor odpowiada na poddawanie działaniu zewnętrznych czynników chemicznych.

LUCYFERAZY OPTYMALIZOWANE

Naturalne lucyferazy, takie jak lucyferaza ze świetlika i renilli, nie zawsze stanowią optymalne reportery genetyczne. W związku z tym, wzmocnione zostało działanie tych natywnych białek, poprzez: poprawienie ich zdolności do ekspresji w doświadczalnych systemach ssaczych, a tym samym redukcję ryzyka wystąpienia w nich ekspresji nietypowej, w niektórych przypadkach prowadzącej do ich destabilizacji. Aby wzmocnić ekspresję u ssaków, zoptymalizowano wykorzystanie kodonów w procesie translacji białek lucyferazy ze świetlika i *Renilla*. Dodatkowo, zminimalizowano ilość występujących niewłaściwych lub niezamierzonych sekwencji regulatorowych transkrypcji, które mogłyby być użyte w komórkach ssaków. W rezultacie tych działań uzyskano rekombinowane reportery lucyferazowe, wykazujące znacznie wyższą ekspresję specyficzną w systemach ssaczych.

Prędkość, z jaką reporter genetyczny może odpowiedzieć na zmiany w natężeniu procesu transkrypcji skorelowana jest ze stabilnością samego reportera wewnątrz komórki. Wysoce stabilne reportery gromadzą się w komórkach w większej ilości, ale ich koncentracje zmieniają się powoli, w wyniku zmian zachodzących w procesie transkrypcji. I na odwrót, niższa stabilność reporterów powoduje ich mniejszą akumulację, ale znacznie przyspiesza tempo samej odpowiedzi. Aby dostarczyć systemów reporterowych spełniających różne wymagania badawcze, stworzono rodziny genów lucyferazy mające różne stabilności wewnątrz komórki. Promega rozwinęła systemy destabilizowanych reporterów lucyferazowych, poprzez fuzję genetyczną sekwencji degradacji białka z genami lucyferazy [3] w wektorze ekspresyjnym. Dzięki zwiększeniu tempa ich degradacji, destabilizowane reportery odpowiadają szybciej i czę-

sto wykazują większy zakres odpowiedzi na nagłe reakcje transkrypcji.

OZNACZENIA Z WYKORZYSTANIEM SYSTEMÓW PODWÓJNYCH GENÓW REPORTEROWYCH (DLR)

W tradycyjnych oznaczeniach wykorzystujących systemy genów reporterowych używa się pojedynczego reportera, celem monitorowania badanej aktywności transkrypcyjnej. Ograniczeniem tej metody jest fakt, że w niektórych warunkach doświadczalnych mogą wystąpić zmiany luminescencji powodowane czynnikami poza kontrolą transkrypcyjną podlegającą badaniu. Na przykład, w trakcie szybkich badań ekspresji genu reporterowego, mogą pojawić się w nich niezgodności typu „well-to-well”, powodowane zmienną wydajnością procesu transfekcji pomiędzy badanymi próbkami. Pojawia się także inna kwestia, kiedy w wyniku doświadczalnego zadziałania na komórki zewnętrznymi czynnikami, obniżona zostaje ich żywotność, co prowadzi do nietranskrypcyjnej redukcji w sygnale lucyferazy.

Termin „podwójny reporter” (*dual reporter*) odnosi się do symultanicznej ekspresji i pomiaru aktywności dwóch indywidualnych enzymów reporterowych w pojedynczym systemie. W normalnych warunkach, badany reporter jest skorelowany jedynie z efektem specyficznych warunków doświadczenia, natomiast aktywność kotransfekowanego, drugiego reportera dostarcza wewnętrznej kontroli służącej do wyznaczenia punktu początkowego odpowiedzi. Normalizacja aktywności reportera doświadczalnego do poziomu kontroli wewnętrznej, minimalizuje zmienność powodowaną różnicami w żywotności komórek lub w efektywności transfekcji. Inne źródła zmienności, takie jak: rozbieżność w pipetowanych objętościach, różnice w wydajności lizy komórkowej oraz efektywności oznaczeń, mogą także zostać wyeliminowane. Dlatego też, oznaczenia wykorzystujące systemy podwójnych genów reporterowych, często pozwalają na dokonanie bardziej wiarygodnej interpretacji danych doświadczalnych. Lucyferazy ze świetlika i *Renilli*, z powodu ich różnego pochodzenia ewolucyjnego, posiadają odmienne struktury enzymatyczne, a co za tym idzie – wymagania substratowe. Różnice te umożliwiają wybiórczo różnicowanie ich bioluminescencyjnych reakcji, w pojedynczej próbie, bez konieczności dzielenia lizatu.

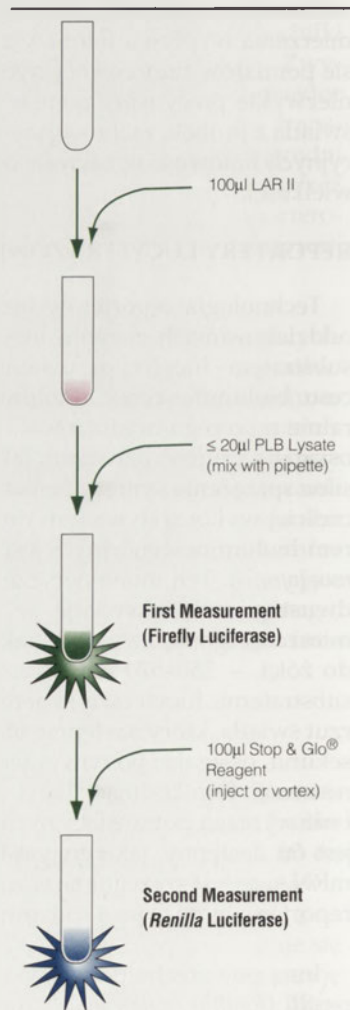
Oznaczenia DLR składają się z: genu lucyferazy świetlika, umieszczonego poniżej badanego elementu odpowiedzi; drugiego reportera, lucyferazy *renilli* – kontrolowanego przez promotor genu „housekeeping” lub przez promotor pochodzenia wirusowego, zaprojektowany tak, by zachowywał aktywność we wszelkich możliwych warunkach; oraz odczynników detekcyjnych, które mogą mierzyć sekwencyjnie aktywność lucyferazy. Dwa przykłady takich odczynników, które wprowadzają świetlikowy substrat - lucyferinę, wygaszają jej sygnał, a po dodaniu drugiego substratu *renilli* - koelentrazyny stanowią funkcjonalną całość, to Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay i Dual-Glo® Assay (Ryc. 2). Toksyczność komórki i zmienność w wydajności transfekcji mogą być normalizowane poprzez sporządzenie wykresu wzbudzenia lucyferazy ze świetlika

w stosunku zależnym od odczytu wzbudzenia lucyferazy z *renilli*.

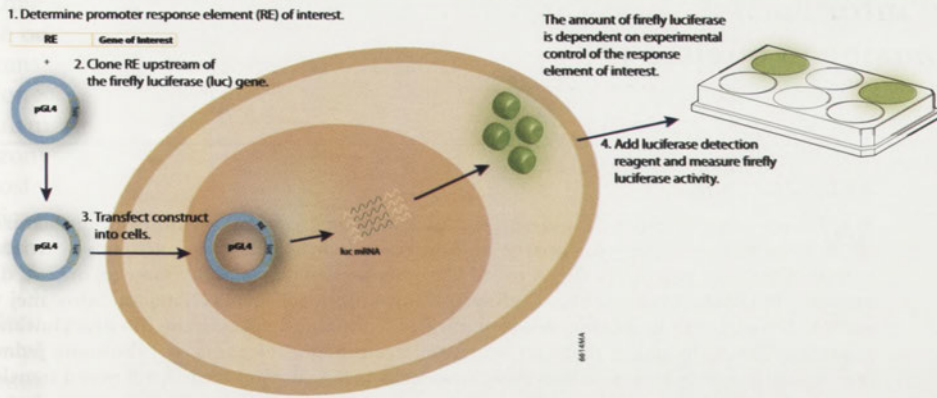
DOBÓR WEKTORA DO REPORTERA

Punkt początkowy każdego oznaczenia wykorzystującego systemy reporterowe stanowi dobór właściwego wektora, będącego czynnikiem krytycznym dla prawidłowego, całościowego przebiegu badania. Cała paleta wektorów dla reportera lucyferazy istnieje z powodu tego, że każdy z nich sprawdza się lepiej w innym systemie biologicznym. Wybór wektora musi zależeć od warunków doświadczenia. Czy w przebiegu doświadczenia zamierza się badać elementy odpowiedzi takie, jak CRE, nowo odkryty wzmacniacz, nowo zdefiniowany promotor lub szlak sygnałowy? Czy badanie wymagać będzie stabilnej, czy krótkotrwałej transfekcji? Czy dokonywany będzie pomiar punktu końcowego, czy sygnał będzie monitorowany w sposób ciągły? Czy oznaczenie z wykorzystaniem jedynie reportera lucyferazy da wystarczającą ilość informacji, czy próba „dual-reporter” będzie bardziej właściwa? Czy potrzebny będzie bardziej wrażliwy gen reporterowy do przestudiowania nagłych zdarzeń transkrypcyjnych, czy raczej zajdzie potrzeba wygenerowania najsilniejszego możliwego sygnału luminescencyjnego? Zrozumienie tego, czego oczekuje się po badaniu i w jaki sposób powinny zostać zmierzone jego rezultaty pomaga określić, które wektory są najwłaściwsze w danym przypadku.

Z tych powodów, firma Promega dysponuje szerokim wachlarzem wektorów do lucyferaz ze świetlika i *renilli*. W rzeczywistości, wektory z rodziny pGL4 Luciferase Reporter Vectors ucieleśniają w sobie szereg postępowych osiągnięć w dziedzinie technologii genów reporterowych, włączając w to: optymalizację kodonów genu reporterowego służącą wzmocnieniu jego ekspresji w komórkach ssaków, inkluzję genów reporterowych, które odpowiadają natychmiast na dynamikę procesu transkrypcji, wbudowanie ssaczych markerów selekcyjnych, ułatwiających stabilne tworzenie linii komórkowych [4-6]. Poprzez wybór właściwego wektora pGL4 dla wybranego systemu eksperymentalnego, w połączeniu z użyciem Luciferase Assay Systems



Rycina 2. Schemat protokołu DLR™. Przedrukowane za zgodą Promega Corporation.



Rycina 3. Oznaczenia z wykorzystaniem genów reporterowych są proste do zaprojektowania i łatwe do przeprowadzenia. Przedrukowane za zgodą Promega Corporation.

firmy Promega, można wykonać bardzo czułe oznaczenia, umożliwiające precyzyjne badanie mechanizmów regulacyjnych i aktywności białek lub też całego szlaku sygnalizacji wewnątrz komórek lub w ich lizacie.

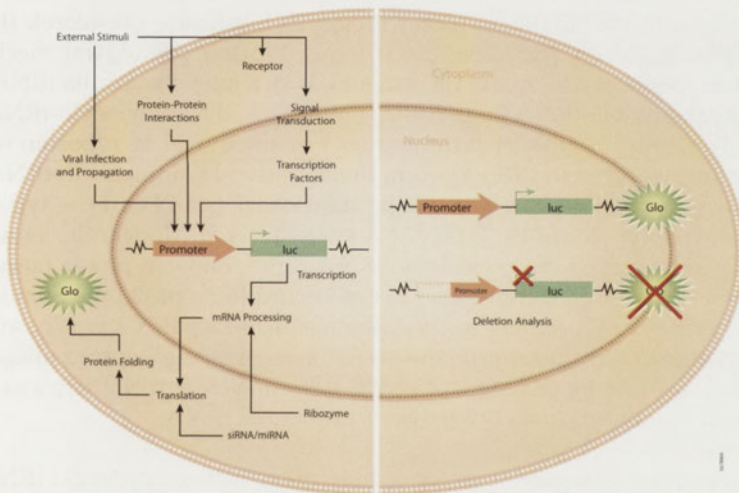
ZASTOSOWANIA REPORTERÓW BIOLUMINESCENCYJNYCH

Powszechnie, konfigurowanie genu reporterowego wiąże się z wstawieniem genu reporterowego poniżej elementu promotor/odpowiedź w ssaczym wektorze ekspresyjnym,

a następnie transfekowanie nim komórek hodowlanych. Po obróbce transfekowanych komórek, efekt biologicznej stymulacji może zostać zmierzony poprzez określenie ilości aktywnej lucyferazy, która uległa ekspresji (Ryc. 3). Z szerszym aspektem ekspresji genów wiąże się znacznie więcej niż tylko sama transkrypcja, a systemy genów reporterowych mogą być wykorzystywane do badania szeregu innych zdarzeń komórkowych [7,8]. Rycina 4 przedstawia wiele możliwości zastosowania ich w badaniach, do których doskonale nadają się proste oznaczenia genów reporterowych typu „dodaj-wymieszaj-zmierz” (ang. *add-mix-measure*), takich jak badania nad zrozumieniem struktury promotorów, mechanizmami aktywacji/wiązania receptorów powierzchniowych (np. GPCRs), monitorowaniem różnicowania się komórek macierzystych, analizą struktury czynników transkrypcyjnych, obserwacją infekcji wirusowych i mechanizmami aktywacji receptorów jądrowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Fan F, Wood K (2007) Bioluminescent assays for high-throughput screening. *ASSAY Drug Dev Techno* 5: 127–136
2. Wood K (2007) The bioluminescence advantage. *Promega Notes* 96: 3–5
3. Li X, Zhao X, Fang Y, Jiang X, Duong T, Fan C, Huang CC, Kain SR (1998) Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem* 273: 34970–34975
4. Almond B, Zdanovsky A, Zdanovskaia M, Ma D, Stecha P, Paguio A, Garvin D, Wood K (2004) Introducing the Rapid Response™ Reporter Vectors. *Promega Notes* 87: 18–22
5. Paguio A, Almond B, Fan F, Stecha P, Garvin D, Wood M, Wood K (2005) pGL4 Vectors: A new generation of luciferase reporter vectors. *Promega Notes* 89: 7–10
6. Promega Corporation (2007) Deciphering the pGL4 Vector code. *Promega Notes* 96: 6–7
7. Wood K (1995) Marker proteins for gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 6: 50–58
8. Allard STM, Kopish K (2008) Luciferase reporter assays: Powerful, adaptable tools for cell biology research. *Cell Notes* 21: 23–26



Rycina 4. Promega stworzyła systemy genów reporterowych do wielu kluczowych aplikacji, w tym do badań: transkrypcji i mechanizmów regulatorowych genów, funkcji receptorów i mechanizmów przekazu sygnałów wewnątrzkomórkowych, metabolizmu i struktury białek, interakcji patogenów z komórkami organizmu gospodarza oraz supresji funkcji genów przez RNAi. Przedrukowane za zgodą Promega Corporation.

Bioluminescent Reporter Genes

Simon T.M. Allard

Promega Corporation

ABSTRACT

Reporter genes typically are used to monitor changes in transcriptional rate, which can vary quickly in response to a specific cellular event. Here we give background on bioluminescent reporters and assays and their uses in research.

Błędy w odszyfrowywaniu informacji genetycznej – rola rybosomalnego miejsca E

Kamilla Bąkowska-Żywicka[✉]

Marta Sikora

Tomasz Twardowski

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

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

Artykuł otrzymano 27 lutego 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 22 maja 2008 r.

Słowa kluczowe: miejsce E, biosynteza białka, przesunięcie ramki odczytu

Wykaz skrótów: AA-tRNA – aminoacylo-tRNA; EF-Tu – czynnik elongacyjny; HPLC – wysokosprawną chromatografią cieczową; krio-EM – mikroskopia krioelektronowa; P-tRNA – peptydylo-tRNA; RF – czynnik uwalniający; SD – sekwencja Shine-Dalgarno

Podziękowania: Autorzy dziękują prof. Knudowi H. Nierhausowi i prof. Gulnarze Yusupovej oraz wydawnictwom Springer Science i Business Media za zgodę na wykorzystanie rycin. Praca została sfinansowana z grantów: MNiSW nr PZB-MNiSW-2/3/2006 oraz MNiSW nr N401 132 32/2670

STRESZCZENIE

W latach sześćdziesiątych ubiegłego stulecia James Watson postulował mechanizm biosyntezy polipeptydu oparty na istnieniu dwóch rybosomalnych miejsc wiązających tRNA: P, dla peptydylo-tRNA przed utworzeniem wiązania peptydowego, oraz A, dla aminoacylo-tRNA, gdzie zachodzi odszyfrowanie informacji genetycznej zakodowanej w mRNA. Dwadzieścia lat później odkryto miejsce E, które jest specyficzne dla deacylowanej cząsteczki tRNA. Jednakże pomimo istnienia trzech miejsc wiązania, w rybosomie jednocześnie znajdują się maksymalnie dwie cząsteczki tRNA: w miejscach A i P przed translokacją (stan PRE) lub w miejscach P i E po translokacji (stan POST). Występowanie dwóch cząsteczek tRNA w stanie POST było intensywnie badane w ciągu ostatnich 25 lat. Wykazano, że obecność cząsteczki tRNA w miejscu E chroni system przed przyłączeniem błędnych aminokwasów do tworzonych w rybosomie polipeptydów oraz przed utratą ramki odczytu. Innymi słowy, rybosomalne miejsce E jest istotnym czynnikiem kontrolnym poprawności biosyntezy białek w komórkach.

WPROWADZENIE

Rybosom jest kompleksem rybonukleoproteinowym o ciężarze cząsteczkowym 3-4 miliony daltonów, którego podstawową funkcją jest synteza łańcucha polipeptydowego. Badania nad tym makrokompleksem trwają już wiele lat i dotyczą różnych zagadnień, przede wszystkim zależności między strukturą i funkcją (patrz prace cytowane w: [1-3]). Proces biosyntezy polipeptydu charakteryzuje bardzo wysoka efektywność, którą najlepiej opisują dwa parametry: liczba błędów (10^{-4}) oraz szybkość syntezy polipeptydu (10^2 aminokwasów na minutę dla rybosomu prokariotycznego).

Proponowano wiele modeli przewidujących lokalizację cząsteczek tRNA w rybosomie. W latach sześćdziesiątych James Watson postulował mechanizm biosyntezy polipeptydu oparty na istnieniu dwóch miejsc wiązania tRNA: miejsca P, dla peptydylo-tRNA (ang. *P-site*), i miejsca A, dla aminoacylo-tRNA (ang. *A-site*). Ten klasyczny model dwumiejscowy przewidywał, że rybosom w stanie przed translokacją (stan PRE) zawiera dwie cząsteczki aminoacylo-tRNA (AA-tRNA) w miejscach A i P, a w stanie po translokacji (stan POST) – tylko jedną cząsteczkę peptydylo-tRNA (P-tRNA) w miejscu P [4,5]. Model rybosomu, który wiązałby jednocześnie trzy cząsteczki tRNA zaproponowali po raz pierwszy w 1968 roku Anne-Lise Haenni i Jean Lucas-Lenard [6], a następnie Stanislav Kirillov w 1978 roku [7], jednak bez wyjaśnienia lokalizacji tRNA w rybosomie. W latach osiemdziesiątych zaproponowano istnienie trzeciego, oprócz miejsc A i P, rybosomalnego miejsca E (ang. *exit site*) [8-10], jednakże te trzy miejsca są zdolne do jednoczesnego wiązania tylko dwóch cząsteczek tRNA.

Podczas cyklu elongacji w procesie biosyntezy białka, cząsteczki tRNA sukcesywnie zajmują poszczególne miejsca w rybosomie. Najpierw zajmują miejsce A, jako AA-tRNA, następnie, po utworzeniu wiązania peptydowego, ulegają translokacji do miejsca P, jako P-tRNA, aby w końcu zająć miejsce E, jako deacylowane tRNA przed opuszczeniem rybosomu. Rybosomalne miejsca A i P są dobrze scharakteryzowane, natomiast znacznie mniej wiadomo na temat lokalizacji, charakterystyki i funkcji miejsca E. Uważa się, że rybosomalne miejsce E może odgrywać niezwykle istotną rolę w procesie translacji. Wiązanie cząsteczki tRNA w miejscu E przed jej uwolnieniem z rybosomu może wpływać stymulująco na translokację [11,12] lub/i regulować dokładność biosyntezy białka [13].

Nieprawidłowości w procesie biosyntezy polipeptydów w rybosomach wynikają z błędnej selekcji AA-tRNA w miejscu A, a w konsekwencji z przyłączenia nieprawidłowej reszty aminokwasowej do tworzonego łańcucha polipeptydowego lub przesunięcia ramki odczytu (ang. *frameshifting*). Wierność przepisywania informacji genetycznej zawartej w mRNA na odpowiednią sekwencję aminokwasów jest niezwykle istotna dla prawidłowego funkcjonowania komórki.

Zmiana jednego nukleotydu w kodonie mRNA (lub błędne odczytanie) może skutkować przedwczesną terminacją translacji (gdy kodon sensowny jest odczytywany jako kodon STOP lub gdy ma miejsce przesunięcie ramki odczytu) lub utworzeniem zmodyfikowanego polipeptydu (gdy włączony zostanie nieprawidłowy aminokwas lub przesunięta zostanie ramka odczytu). Wiele badań wskazuje na zasadniczą rolę miejsca E w kontroli procesu powstającego w rybosomie polipeptydu.

Koncepcje zależności struktury i funkcji rybosomu (allosterii czy też bardziej aktualnego modelu alfa-epsilon, niezwykle zresztą zbieżnego z modelem hybrydowym wydłużania polipeptydu), jak i mechanizm regulatorowy miejsca E są nadal w trakcie badań, jak również są przedmiotem licznych dyskusji, a przez niektórych badaczy są nawet kwestionowane. Natomiast nie ulega wątpliwości jak podstawowe znaczenie ma proces wydłużania łańcucha peptydowego, zachodzący w rybosomie zarówno w zakresie badań podstawowych, jak i w potencjalnym wykorzystaniu do preparatywnej biosyntezy białka w układzie wolnokomórkowym. Naszą intencją jest prezentacja funkcji rybosomalnego miejsca E w kontekście wcześniejszych publikacji omawiających proces biosyntezy polipeptydu w rybosomie [1,3]. Przedstawione w tym tekście wyniki i analizy związane są wyłącznie z rolą miejsca E, które dla wielu ekspertów nadal są dyskusyjne; bardzo prawdopodobne, że w bliskiej przyszłości poznamy nowe dane, które po raz kolejny zmienią nasze poglądy. W tej dziedzinie już wielokrotnie wydawało nam się, że wiemy „wszystko”; tym bardziej konieczna jest popularyzacja i krytyczna analiza tych zagadnień.

BŁĘDY W ODSZYFROWYWANIU INFORMACJI GENETYCZNEJ

UWOLNIENIE NIEPEŁNEJ DŁUGOŚCI PEPTYDU

W rzadkich przypadkach kodon STOP może zostać pominięty przez kompleks aminoacylo-tRNA/EF-Tu/GTP, co prowadzi do utworzenia wydłużonego produktu. Jednakże w większości przypadków błędy procesywności (ang. *processivity errors*) prowadzą do przedwczesnego uwolnienia nieprawidłowego peptydylo-tRNA. Częstość z jaką to zachodzi została oszacowana na 4 uwolnienia zbyt krótkiego peptydu na 10 000 wprowadzonych aminokwasów. Uwolniony tRNA, niosący nieprawidłowy peptyd, może przeskadzać w komórce, gdyż wiązanie estrowe, które wiąże resztę peptydylową z cząsteczką tRNA jest bardziej stabilne niż wiązanie estrowe w aminoacylo-tRNA. W konsekwencji, rozpoznawane jako nieprawidłowe, P-tRNA będą kumulowane w komórce i odizolowywane od maszynierii translacyjnej, ograniczając biosyntezę białka. Aby temu zapobiec, enzym cytoplazmatyczny – hydrolaza peptydylo-tRNA – przecina wiązanie estrowe wolnego P-tRNA, tym samym uwalniając cząsteczkę tRNA [14]. W badaniach nad białkiem o długości ponad 1000 aminokwasów (β -galaktozydaza), frakcję rybosomów, które nie zakończyły syntezy, oszacowano na 20%. Efekt ten był spowodowany zarówno przedwczesnym uwolnieniem peptydu, jak i skróconym mRNA, powstałym w wyniku nieprawidłowej transkrypcji genu *lacZ* [15]. Stwierdzono, że prawdopodobieństwo przedwczesnego uwolnienia peptydu jest zróżnicowane w zależności od kodonu, zależy także od wpływu sąsiadują-

cych kodonów i zachodzi częściej w przypadku krótkich peptydylo-tRNA.

Wpływ tego rodzaju błędów na bilans energetyczny jest znacznie większy niż w przypadku błędów zmiany sensu – głównej przyczyny nieprawidłowości w procesie dekodowania mRNA. Strata energii spowodowana błędami procesywności jest szacowana na 3% całkowitego obrotu energii szybko dzielących się komórek [16].

W przypadku cząsteczek mRNA, które nie są prawidłową matrycą do biosyntezy białka (jeśli np. brak kodonu STOP wprowadzającego prawidłową terminację), syntetyzujący rybosom może zostać zatrzymany (ang. *stalled*) na cząsteczce mRNA. Aby temu zapobiec, bakterie posiadają stabilną cząsteczkę RNA o długości około 350 nukleotydów, nazwaną 10S RNA lub tmRNA (ang. *transfer-messenger RNA*). Funkcją tmRNA jest rozpoznanie transkryptu bez kodonu STOP w rybosomie, dokończenie syntezy wadliwego białka w procesie trans-translacji i przywrócenie rybosomom stanu aktywności translacyjnej. tmRNA naznacza jednocześnie wadliwe mRNA i niekompletny polipeptyd do degradacji [17]. Końce 5' i 3' tmRNA mogą utworzyć strukturę podobną do tRNA, zawierającą pętlę zamiast ramienia i pętli DHU cząsteczki tRNA oraz nie zawierającą antykodonu tRNA (wewnętrzne wypełnienie obserwowane w tmRNA *E. coli*, łączone przez niektórych badaczy z pętlą antykodonową tRNA nie jest zachowane w ewolucji). Cząsteczka tmRNA niesie na 3' końcu aminokwas alaninę i wiąże się za pomocą EF-Tu/GTP i białka SmpB do rybosomalnego miejsca A [18]. Powstający w uwięzionym rybosomie peptyd zostaje przeniesiony z P-tRNA na resztę alaninową tmRNA (funkcja tRNA), a następnie tmRNA przelacza swoją funkcję i działa jako matryca programująca dodanie kolejnych reszt aminokwasowych (10 w przypadku *E. coli*), jak i uporządkowaną terminację poprzez kodon STOP (funkcja mRNA). W związku z tym, funkcją tmRNA jest po pierwsze oznaczanie nieprawidłowych peptydów przez dołączanie dodatkowej sekwencji na końcu C, co sprawia, że takie peptydy są przeznaczone do degradacji, a po drugie – uwalnianie uwięzionych rybosomów [17,19]. Stwierdzono, że uwalnianie uwięzionych rybosomów nie zależy wyłącznie od obecności tmRNA; u bakterii *E. coli* mutanty bez tmRNA są nadal żywotne. Jednakże, u innych szczepów bakteryjnych, np. *Bacillus subtilis*, tmRNA jest niezbędny do życia komórki.

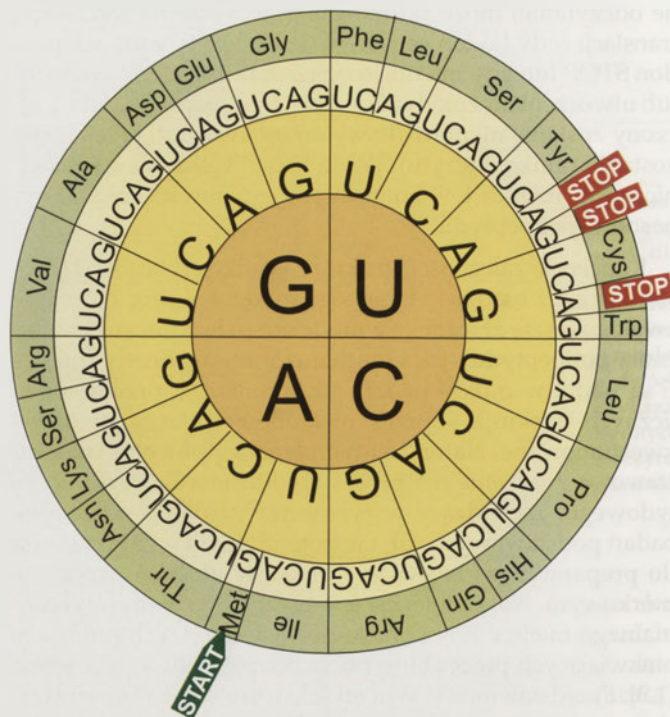
Istnieje kilka zjawisk mogących powodować błędy procesywności translacji. Główną przyczyną ich występowania jest prawdopodobnie zdarzenie zachodzące zaraz na początku syntezy białka, po zakotwiczeniu rosnącego łańcucha polipeptydowego w tunelu rybosomalnym. Tunel wyjścia polipeptydu z rybosomu może zakotwiczyć sekwencję o długości ok. 30 aminokwasów, zanim rosnący łańcuch peptydowy pojawi się w cytosolu otaczającym rybosom. Antybiotyk, erytromycyna, prowokuje akumulację oligopeptydylo-tRNA (zawierającego mniej niż osiem reszt aminoacylowych) w cytosolu, poprzez blokowanie wejścia do tunelu [20]. Innym mechanizmem jest błędne zatrzymanie, kiedy kodon sensowny jest nieprawidłowo rozpoznany przez czynnik uwalniający, prowadząc do terminacji syntezy białka. Jednak fałszywy kodon STOP występuje dość rzadko, z częstotliwością około 10^{-6} .

BŁĘDY POWODUJĄCE ZMIANĘ ODCZYTU INFORMACJI

Substytucje zmiany sensu – prowadzące do wstawienia nieprawidłowego aminokwasu – występują z częstością 3×10^{-4} [16]. Trzeci nukleotyd kodonu jest najczęściej błędnie odczytywanym nukleotydem, a środkowy – niezwykle rzadko. Według pobieżnych obliczeń, tylko jeden na 400 przypadków błędu zmiany sensu zakończy się utworzeniem nieaktywnego produktu [21]. Tak niewielkie znaczenie błędnego wstawienia aminokwasu może być związane z selektywnością rybosomalnego procesu dekodowania lub też z organizacją słownika kodonów. Rybosom popełnia błąd raz na około 3000 reakcji selekcji [22], a w przypadku błędu rybosom wybiera AA-tRNA z antykodonem najbardziej podobnym do właściwego. Można wyróżnić trzy klasy AA-tRNA: prawidłowy (ang. *cognate*), zbliżony do prawidłowego (ang. *near-cognate*) oraz nieprawidłowy (ang. *non-cognate*). Te klasy różnią się między sobą wyraźnie zużyciem GTP: prawidłowy AA-tRNA zużywa jedną do dwóch cząsteczek GTP na jedno włączenie odpowiedniego aminokwasu do łańcucha, zbliżony do prawidłowego – trzy do sześciu GTP, a nieprawidłowy nie zużywa GTP w ogóle, gdyż nie oddziałuje z miejscem A [23].

Słownik kodonowy jest zorganizowany według ważnej, logicznej reguły, która przypisuje podobne kodony do chemicznie podobnych aminokwasów. Ma to ważne konsekwencje w tym, że rybosom będzie akceptował tylko aminokwas, który jest chemicznie podobny do właściwego, pasującego aminokwasu. Błędy w selekcji prowadzące do przyłączenia podobnego aminokwasu mają miejsce w przypadku wszystkich aminokwasów z jednego „boku rodzinnego”, np. istnieją cztery kodony GCN dla aminokwasu alanyiny (Ala) (Ryc. 1) i są one odczytywane przez cztery różne izoakceptorowe cząsteczki tRNA.

Na zredukowanie częstości występowania błędów zmiany sensu pozwala podstawowy proces dekodowania informacji genetycznej zakodowanej w mRNA, tj. korekta kinetyczna (ang. *kinetic proofreading*) [24,25]. W procesie tym możemy wyodrębnić dwa zdarzenia narzucone przez EF-Tu [26]. Kompleks EF-Tu/GTP/AA-tRNA przyłącza się do rybosomalnego miejsca A, ale GTP nie jest hydrolizowane przez krótki czas. Prawidłowe i nieprawidłowe komple-

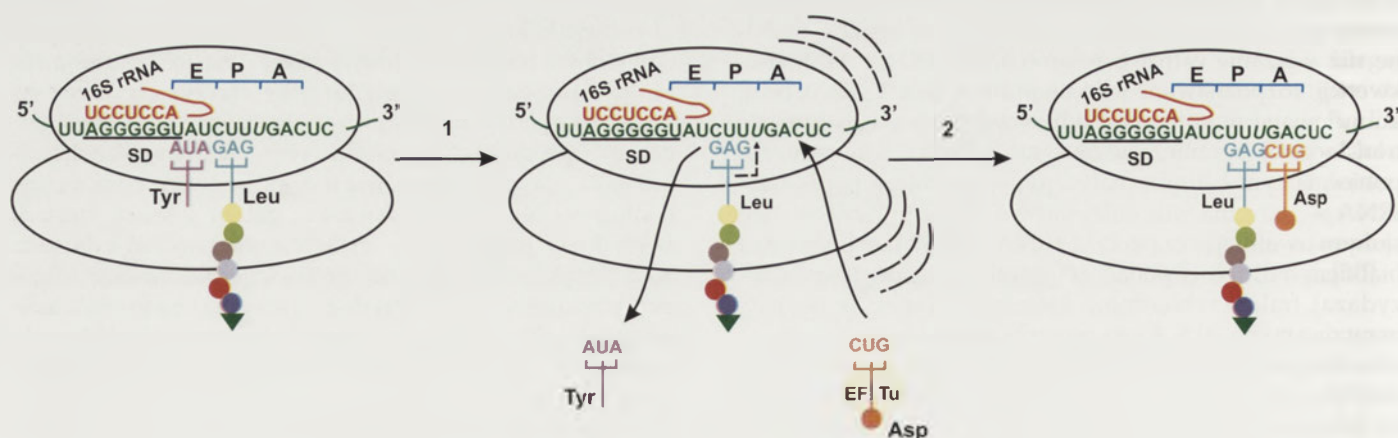


Rycina 1. Słownik kodonów w postaci tzw. „słońca kodonowego”.

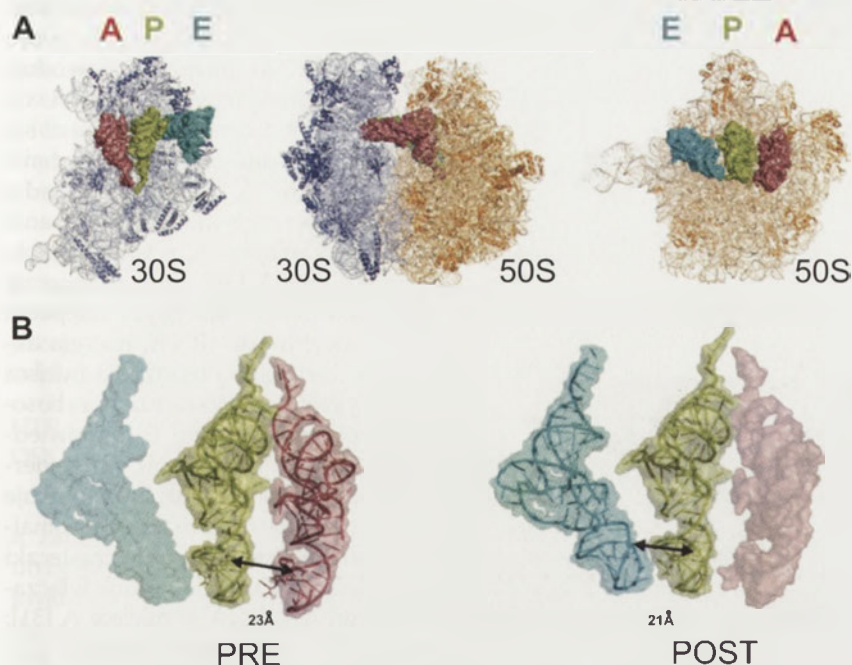
sy tRNA wiążą rybosom w procesie przebiegającym z taką samą kinetyką, ale prawidłowe kompleksy nie są usuwane z rybosomu, natomiast nieprawidłowe dysocjują szybciej niż EF-Tu hydrolizuje GTP. W związku z tym większość nieprawidłowych kompleksów jest odrzucana już na tym etapie. Po hydrolizie, EF-Tu/GDP nie oddysocjuje z rybosomu przez krótki czas i po raz kolejny w tym momencie nieprawidłowy kompleks, który nadal byłby związany z rybosomem, jest usuwany z rybosomu znacznie szybciej niż EF-Tu może oddysocjować od tRNA.

PRZESUNIĘCIE ORAZ UTRATA PRAWIDŁOWEJ RAMKI ODCZYTU

Przesunięcie ramki odczytu mRNA (ang. *frameshifting*) występuje dość rzadko, z częstością około 3×10^{-5} na kodon



Rycina 2. Przesunięcie ramki odczytu o +1 podczas translacji mRNA RF2 (objaśnienia mechanizmu w tekście) [41].



Rycina 3. Miejsca wiązania tRNA w rybosomie [54]. (A) Bakteryjny rybosom zbudowany jest z dwóch podjednostek: małej 30S (niebieski) i dużej 50S (pomarańczowy), na każdą składają się: rybosomalne RNA (kolor jasny) i białka (kolor ciemny). tRNA w rybosomalnych miejscach A, P i E oznaczono, odpowiednio kolorami: różowym, zielonym i turkusowym. (B) Stany: przed translokacją (PRE) i po translokacji (POST) konformacji rybosomu. Zaznaczono odległości między rybozą (przedstawiona jako pierścieni) reszty 37 A-, P- lub E-tRNA.

[16]. Przesunięcie ramki odczytu o jeden nukleotyd „do przodu” (3’) jest określane jako +1 i daje taki sam efekt jak delecja jednego nukleotydu bezpośrednio po ostatnim kodonie przed przesunięciem ramki odczytu (Ryc. 2). Natomiast przesunięcie ramki odczytu o jeden nukleotyd „do tyłu” (5’), określane jako -1, jest równoważne z insercją jednego nukleotydu. Po przesunięciu ramki odczytu, sekwencja kodowanego peptydu, który ma być syntetyzowany, różni się od oryginalnej. W zależności od pozycji najbliższego kodonu STOP w nowej ramce odczytu, powstający produkt może być dłuższy lub krótszy.

W warunkach zwiększonej częstości substytucji zmiany sensu, wzrasta częstość przesunięcia ramki odczytu. Jest prawdopodobne, że niewłaściwie wyselekcjonowany AA-tRNA w miejscu A ma większą tendencję do „wyslizgiwania” się z ramki odczytu w prawo lub lewo, jeśli może zostać utworzony lepszy kontakt z mRNA [16].

Przesunięcie ramki odczytu o -1 ma miejsce często w przypadku charakterystycznych heptanukleotydomowych sekwencji X XXY YYZ, kończących się tzw. „głodnym kodonem” (YYZ), gdzie stosunek poprawnych do niepoprawnych kompleksów potrójnych AA-tRNA/EF-Tu/GTP (kodowanych odpowiednio przez YYZ i YYY) jest mały, tym samym promując selekcję tych ostatnich.

CECHY RYBOSOMALNEGO MIEJSCA E

Rybosomalne miejsce E jest specyficzne wyłącznie dla deacylowanej cząsteczki tRNA [10]. Wykazano, że modyfikacje końca 3’ cząsteczki tRNA zmniejszają lub nawet całkowicie eliminują powinowactwo tRNA do miejsca E, przy

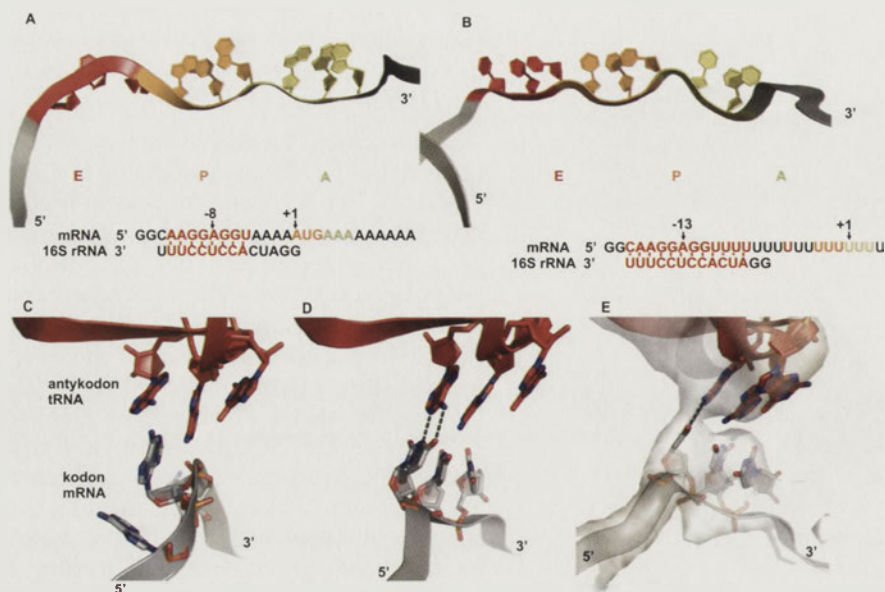
czym wiązanie do miejsc A lub P pozostaje na niezmiennym poziomie [27]. Co więcej, wykazano, że specyficzne oddziaływania między końcem 3’ deacylowanego tRNA a miejscem E są niezbędne dla efektywnej translokacji [12].

W literaturze wymienia się trzy cechy, które charakteryzują rybosomalne miejsce E: (1) cząsteczka deacylowanego tRNA obecna w miejscu E (E-tRNA) jest z nim związana w sposób stabilny; (2) E-tRNA jest połączone z cząsteczką mRNA poprzez specyficzne oddziaływania kodon-anty kodon [28]; (3) istnieje obustronna zależność funkcjonalna między miejscami E i A (allosteryczny model trójmiejskowy elongacji polipeptydu [29,30]). Te trzy atrybuty miejsca E nie są powiązane z reakcjami zachodzącymi w innych regionach rybosomu, aczkolwiek oczywista jest wzajemna zależność i powiązanie funkcjonalne z kompleksową architekturą tej makrocząsteczki.

Fakt, że cząsteczka E-tRNA jest związana w miejscu E w sposób stabilny został wykazany zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. W warunkach odpowiadających sytuacji *in vivo* (dla przykładu: 4.5 mM Mg²⁺; 100 mM K⁺ oraz 2 mM spermidyna [31]) zaobserwowano, że większość rybosomów znajduje się w stanie po translokacji (POST), tj. z przyłączonymi tRNA w miejscach P i E. Stabilne wiązanie E-tRNA obserwowano również w funkcjonalnych kompleksach *Escherichia coli* z pomocą mikroskopii krioelektronowej (krio-EM) [32] oraz stwierdzono wiązanie tRNA w miejscu E w kryształach rybosomów 70S *Thermus thermophilus* [33].

Przez wiele lat dyskutowano nad możliwością oddziaływań antykodonu tRNA w miejscu E z komplementarnym kodonem w mRNA. W strukturze krystalicznej rybosomu 70S obserwowana konformacja miejsca E wykluczała możliwość takich oddziaływań [33]. Jednakże w innych badaniach wykazano, że odległość między nukleotydami w pozycji 37 (3 pozycja antykodonu) tRNA^{Phe} w miejscach A i P wynosi 23Å, a w miejscach P i E jest nawet krótsza (21Å). Sugeruje to, że cząsteczki tRNA w miejscach P i E mogą oddziaływać z odpowiednimi kodonami w mRNA w bardzo podobny sposób jak cząsteczki w miejscach A i P (Ryc. 3). Oddziaływania kodon-anty kodon w rybosomalnym miejscu E zaobserwowano zarówno poprzez analizę krio-EM rybosomów w stanie POST [32], jak i w kryształach rybosomów [34,35] (Ryc. 4).

Trzecią ważną cechą rybosomalnego miejsca E jest jego allosteryczne oddziaływanie z miejscem A (Ryc. 5). Termin allostera definiowany jest jako dynamiczna zmiana struktury cząsteczki (w tym przypadku fragmentu rybosomu) powodująca zmianę powinowactwa do ligandu, czyli do tRNA. Zgodnie z tą definicją AA-tRNA przyłączone w miejscu A powoduje zmianę struktury rybosomu, obniżając powinowactwo



Rycina 4. Oddziaływanie kodon-antykonon w miejscu E [34]. (A, B) struktura kodonów w miejscach E, P, A w kompleksie inicjatorowym translacji (A) i po inicjacji (B). Przedstawiono sekwencję dupletu mRNA-SD (czerwony). (C, D) Oddziaływanie antykodonu E-tRNA z kodonem mRNA w kompleksie inicjatorowym translacji (C) i po inicjacji (D). (E) Mapa gęstości elektronowej Fouriera (Fo-Fc) obliczona z rozdzielczością 5.5 Å.

wactwo deacylowanego tRNA do miejsca E i odwrotnie, jeżeli miejsce E obsadzone jest przez deacylowany tRNA, to miejsce A posiada obniżone powinowactwo do AA-tRNA [29,30,36]. Niezwykle ważną konsekwencją allosterycznego połączenia miejsc A i E jest fakt, iż w trakcie cyklu elongacyjnego w procesie biosyntezy białka w rybosomie znajdują się zawsze tylko dwie, a nigdy trzy cząsteczki tRNA. Cząsteczki tRNA zajmują rybosomalne miejsca A i P przed translokacją oraz P i E po translokacji [37]. Ostatnio precyzyjnie opisano etap obsadzania miejsca A, powodujący uwalnianie tRNA z miejsca E [38]. Zajęcie miejsca A przez AA-tRNA zachodzi dwuetapowo: w pierwszym etapie ma miejsce odszyfrowanie informacji genetycznej, a kompleks potrójny AA-tRNA/EF-Tu/GTP oddziałuje z kodonem w mRNA. W kolejnym etapie następuje: hydroliza GTP przez czynnik elongacyjny EF-Tu, oddysocjowanie kompleksu EF-Tu/GDP z rybosomu oraz zajęcie miejsca A przez AA-tRNA (akomodacja). Uwolnienie E-tRNA następuje po etapie odszyfrowania informacji genetycznej, ale przed hydrolizą GTP zależną od EF-Tu i akomodacją AA-tRNA w miejsce A. Należy jednocześnie podkreślić, że w proces zaangażowany jest cały rybosom, aczkolwiek w przedstawianym opisie koncentrujemy się na „intelektualnie” wyizolowanym fragmencie tego organellum.

FUNKCJONOWANIE MIEJSCA E PODCZAS WŁĄCZANIA AMINOKWASU

Jak już wspomniano we wprowadzeniu, błędne przyłączenie aminokwasu do tworzonego polipeptydu ma miejsce raz na 3000 wbudowań [22], ale tylko jedna z 400 błędnych przyłączeń jest szkodliwa dla komórki [21]. Niezwykle ważnym mechanizmem chroniącym przed związaniem nieprawidłowego AA-tRNA (ang. *non-cognate*) jest, wspo-

mniana już, allosteryczna zależność między miejscami A i E [30], tj. zajęte przez deacylowany tRNA miejsce E powoduje obniżone powinowactwo AA-tRNA do miejsca A. Na podstawie wielu badań sądzi się, że istnieje allosteryczne połączenie między miejscami A i E. Dla przykładu: (1) powiązano energię aktywacji wiązania AA-tRNA do miejsca A z istnieniem w rybosomie E-tRNA [39]. Stwierdzono, że w rybosomach z obsadzonym miejscem E przez deacylowany tRNA, energia aktywacji niezbędna do obsadzenia miejsca A była trzykrotnie wyższa niż w rybosomach z wolnym miejscem E (odpowiednio, 120 kJ/mol i 40 kJ/mol); (2) stwierdzono, że antybiotyk edeina, który blokuje miejsce E małej podjednostki rybosomalnej, uniemożliwiając związanie cząsteczki deacylowanego tRNA, powoduje włączenie błędnego AA-tRNA w miejsce A [31]; (3) wykazano, iż mutacje w białkach S7 i S11, które osłabiają oddziaływania pętli antykodonowej E-tRNA z rybosomem, powodują poważne błędy w selekcji AA-tRNA do miejsca A, takie jak przyłączenie nieprawidłowego aminokwasu lub przesunięcie ramki odczytu [40]; (4) pokazano, że osłabienie lub utrata oddziaływań kodon-antykonon w rybosomalnym miejscu E prowadzi do przesunięcia ramki odczytu informacji [40,41]; oraz (5) stwierdzono, że modyfikacja końca CCA-3' tRNA powoduje znaczne obniżenie powinowactwa deacylowanej cząsteczki tRNA do miejsca E [27], co może tłumaczyć wzrost błędnego przyłączania AA-tRNA do miejsca A w przypadku obecności w miejscu E tRNA^{Val} ze zmutowanym końcem CCA [42]. Allosteryczne powiązania między miejscami A i E obserwowano również w strukturze krystalicznej rybosomu 70S *T. thermophilus* z rozdzielczością 5.5 Å [33].

Istnieją dowody na to, że E-tRNA, powodując obniżenie powinowactwa AA-tRNA do miejsca A, zwiększa istotność oddziaływań kodon-antykonon [13]. Wyniki tego eksperymentu przedstawione zostały w Tabeli 1. Do rybosomów zaprogramowanych poli(U) przyłączono AcPhe-tRNA w miejsce P. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano kompleks potrójny, zawierający EF-Tu, GTP oraz – w jednym przypadku Phe-tRNA (kodon UUU), a w drugim przypadku Asp-tRNA (kodon GAU/C), w celu obsadzenia miejsca A. Błędy w dekodowaniu ujawniono poprzez

Tabela 1. Dokładność wiązania AA-tRNA do miejsca A w zależności od obsadzenia miejsca E (szczegółowe objaśnienia w tekście; na podstawie [16]).

Stan rybosomu	Miejsce E	Błąd wiązania [%]
4x prawidłowy kodon	wolne	0.72
	zajęte	0.05
4x nieprawidłowy kodon	wolne	1.2
	zajęte	1.6

analizę utworzonych dipeptydów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Okazało się, że wysokie powinowactwo do miejsca A spowodowane brakiem obsadzenia miejsca E może prowadzić do przyłączenia nieprawidłowej cząsteczki AA-tRNA do miejsca A (obserwowano błąd w dekodowaniu wynoszący 0,72%). Natomiast przy obsadzonym miejscu E niemal nie obserwowano takich błędów (0,05%). Ponadto, stwierdzono, że obecność tRNA^{Leu} (kodon UUG/A) w miejscu E nie chroni przed błędami w przyłączeniu aminokwasów. Innymi słowy, oddziaływanie kodon-antykonon w miejscu E wydają się niezbędne dla przejścia rybosomu do stanu POST oraz dla prawidłowej selekcji kompleksu potrójnego.

UTRZYMYWANIE PRAWDŁOWEJ RAMKI ODCZYTU PRZEZ MIEJSCE E

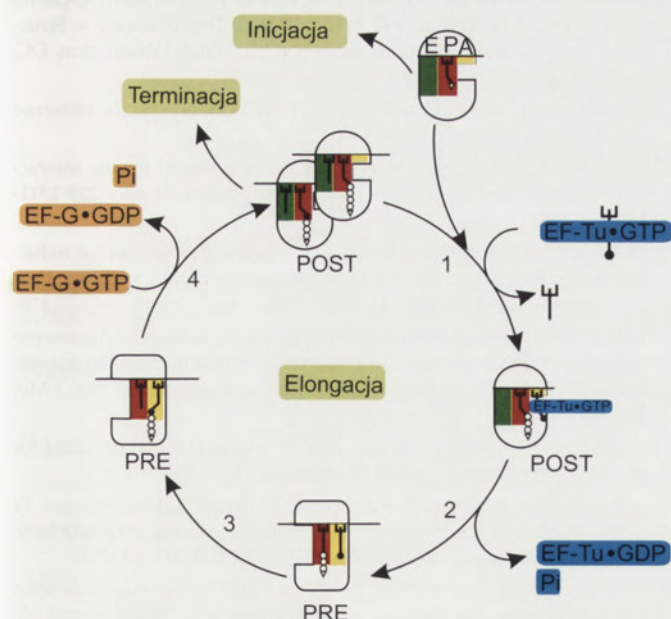
Najważniejszym elementem kontroli jakości translacji, a zarazem nadzwyczajną cechą rybosomu jest zdolność utrzymywania prawidłowej ramki odczytu, a w konsekwencji – zdolność do syntezy pełnej długości polipeptydu, prawidłowego pod względem sekwencji aminokwasowej. Spontaniczne przesunięcie ramki odczytu ma miejsce raz na 30000 wbudowanych aminokwasów [15].

Ostatnio, dzięki badaniom procesu translacji mRNA kodującego czynnik uwalniający RF2 (ang. *release factor*), odkryto zasadniczą rolę rybosomu w procesie utrzymywania prawidłowej ramki odczytu [41,43]. mRNA kodujące RF2 posiada kodon STOP UGA rozpoznawany przez RF2 w 26-tej pozycji. Mamy zatem do czynienia ze zjawiskiem regulacji translacji poprzez ujemne sprzężenie zwrotne. Kiedy w komórce występuje odpowiednio wysokie stężenie RF2, wówczas biosynteza tego białka ulega przedwczesnej terminacji z wykorzystaniem kodonu STOP w pozycji 26-tej

i uwalniany 25-mer jest poddawany szybkiej degradacji. Natomiast kiedy w komórce utrzymuje się niskie stężenie czynnika uwalniającego RF2, wówczas ma miejsce przesunięcie ramki odczytu o +1 z wydajnością do 100% [44,45]. Stwierdzono, że przesunięcie ramki odczytu o +1 występuje u 70% bakterii, dla których zsekwenjonowano gen kodujący RF2 [46]. Oznacza to, że istnieje mechanizm utrzymywania prawidłowej ramki odczytu, wyłączany podczas syntezy RF2. W wielu badaniach wykazano zasadniczą rolę sekwencji Shine-Dalgarno w mRNA RF2 w przesunięciu ramki odczytu o +1. Na podstawie danych pochodzących z mutagenetyzacji wnioskowano również o ważnej roli regionu znajdującego się pomiędzy SD a miejscem przesunięcia ramki odczytu [47]. Stwierdzono, że istnieje kompetycja pomiędzy oddziaływaniem [SD – anty-SD] [48] a oddziaływaniem kodon-antykonon w miejscu E [41]. Oddziaływanie SD – anty-SD stanowi zawadę przeszerzną dla oddziaływań kodon-antykonon w miejscu E, skutkiem czego dochodzi do przedwczesnego uwolnienia E-tRNA z rybosomu (oznaczone jako 1 na Ryc. 2). Obecność w rybosomie tylko jednej cząsteczki tRNA (peptydylo-tRNA^{Leu} w miejscu P) prowadzi do jego destabilizacji, która pobudza przesunięcie ramki odczytu o +1 (etap 2 na Ryc. 2), a zatem następuje przesunięcie oddziaływań kodon-antykonon w miejscu P o jedną pozycję. Skutkiem tego możliwe jest przyłączenie cząsteczki Asp-tRNA w nowej ramce odczytu.

W strukturze krystalicznej rybosomu 70S [33] widać, że P-tRNA oraz struktura formowana przez oddziaływanie SD w mRNA z anty-SD w 16S rRNA, tworzą upakowaną strukturę otaczającą cząsteczkę tRNA w miejscu E. W przypadku syntezy RF2, E-tRNA odgrywa istotną rolę w destabilizowaniu oddziaływań kodon-antykonon w miejscu P i jednocześnie w stabilizowaniu oddziaływań kodon-antykonon w ramce +1, która jest nową, prawidłową ramką odczytu genu RF2 i prowadzi do syntezy czynnika uwalniającego [43,47].

Analiza *in vivo* innego wysoce efektywnego procesu przesunięcia ramki odczytu potwierdziła zasadniczą rolę oddziaływań kodon-antykonon w miejscu E w utrzymywaniu odpowiedniej ramki odczytu informacji genetycznej [49]. Badano poślizg cząsteczki tRNA w bakteryjnym rybosomie *E. coli* z wykorzystaniem tmRNA. Cząsteczka tmRNA zawiera w swojej budowie kanoniczne dla tRNA ramie akceptorowe oraz ramie i pętlę TΨC, więc oddziałuje z dużą podjednostką rybosomalną w pozycjach charakterystycznych dla tRNA zajmującego miejsce E. Jednakże tmRNA nie posiada pętli antykononowej. Co więcej, odpowiednik ramienia antykononowego (P2 w tmRNA) tworzy dużo większy kąt z ramieniem akceptorowym tmRNA (~120°) w porównaniu z cząsteczką tRNA (~90°) [18,50]. Te uderzające różnice w kształcie cząsteczek nasuwają wniosek, iż tmRNA nie jest zdolny do prawidłowego obsadzenia miejsca E. Obserwowano, że obsadzenie rybosomu cząsteczką tmRNA powoduje przesunięcie ramki odczytu o jedną pozycję, co jest dalszym argumentem potwierdzającym, że prawidłowe obsadzenie miejsca E przez tRNA pozwala na uniknięcie poślizgu cząsteczki mRNA i utrzymuje odpowiednią ramkę odczytu [49].



Rycina 5. Cykl elongacyjny biosyntezy białka w kontekście modelu allosterycznego trójmiejscowego (zmodyfikowane na podstawie [54,55]). 1- odszyfrowanie; 2 – akomodacja miejsca A; 3 – synteza wiązania peptydowego; 4 – translokacja. PRE – stan przed translokacją; POST – stan po translokacji. Kolorami żółtym, czerwonym i zielonym w rybosomie oznaczono miejsca wiązania tRNA: A, P i E.

Inny, dobrze zdefiniowany proces przesunięcia ramki odczytu o +1 ma miejsce w przypadku translacji mRNA kodującego eukariotyczny antyzym, białko uczestniczące w regulacji poziomu poliamidów w komórce [51,52]. Miejsce przesunięcia ramki odczytu w mRNA antyzymu wykazuje pewną dywergencję między organizmami [51]. Jednakże dwa elementy w mRNA antyzymu są w 100% zachowane w ewolucji, to jest: kodon STOP (UGA), stymulujący przesunięcie ramki odczytu, oraz reszta urydyny w pierwszej pozycji kodonu znajdującego się w miejscu E. Co więcej, kodon ten może być rozpoznany jedynie przez trzy cząsteczki tRNA (Cys, Trp lub Tyr) z sześciu możliwych, które odczytują U w pierwszej pozycji kodonu (Cys, Leu, Ser, Phe, Trp i Tyr). Stwierdzono zatem, że oddziaływania pomiędzy cząsteczkami tRNA w miejscach P i E odgrywają istotną rolę w utrzymaniu prawidłowej ramki odczytu mRNA kodującego antyzym.

Na podstawie ostatnich analiz wykazano również, że rybosomalne miejsce E odgrywa bardzo ważną rolę podczas przesunięcia ramki odczytu o -1. Jeśli kodon XXY znajduje się w miejscu P, przesunięcie ramki odczytu o -1 ma miejsce tylko wtedy, gdy E-tRNA zawiera resztę pseudouracydu (ψ) w pozycji 39 (od strony 3' antykodonu) [53]. Reszta ψ w pozycji 39 może osłabiać oddziaływanie kodon-antykodon w miejscu E, tym samym powodując przedwczesne uwolnienie tRNA podczas etapu dekodowania. Inną, aczkolwiek mniej prawdopodobną możliwością, jest destabilizacja oddziaływania kodon-antykodon w miejscu P przez ψ 39 w miejscu E, co promuje przesunięcie ramki odczytu.

UWAGI KOŃCOWE

Rybosomalne miejsce E zostało odkryte znacznie później niż miejsca A i P. Pomimo zaawansowanych badań, do dziś szczegóły mechanizmu funkcjonowania tej specyficznej części rybosomu pozostają dla nas w dużym stopniu tajemnicą i w konsekwencji są źródłem wielu wątpliwości i sceptycznego stosunku do proponowanych mechanizmów i funkcji regulatorowej. Jednak już odkryte fakty, świadczące o znaczącej roli miejsca E nie tylko dla rybosomu i translacji, ale dla całego cyklu życiowego komórki, stają się bodźcem do dalszego zgłębiania złożonej i jednocześnie niezwykle precyzyjnej maszynerii biosyntezy białka.

PIŚMIENNICTWO

1. Bąkowska-Żywicka K, Twardowski T (2008) Struktura i funkcjonowanie rybosomu eukariotycznego. *Postepy Biochem* 54: 251-263
2. Dudzińska B, Twardowski T (2001) Struktura rybosomu prokariotycznego. *Postepy Biochem* 47: 19-29
3. Piotrowska I, Dudzińska B, Twardowski T (2002) Struktura i funkcja rybosomu prokariotycznego. *Postepy Biochem* 48: 2-19
4. Watson JD (1963) Involvement of RNA in the synthesis of proteins. *Science* 140: 17-26
5. Watson JD (1964) The Synthesis of Proteins Upon Ribosomes. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* 46: 1399-1425
6. Haenni AL, Lucas-Lenard J (1968) Stepwise synthesis of a tripeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 61: 1363-1369
7. Kirillov SV, Makhno VI, Semenov YP (1978) The mechanism of codon-anticodon interaction in ribosomes. Quantitative study of codon-dependent binding of tRNA to the 30-S ribosomal subunits of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 89: 297-304

8. Grajevskaja RA, Ivanov YV, Saminsky EM (1982) 70-S ribosomes of *Escherichia coli* have an additional site for deacylated tRNA binding. *Eur J Biochem* 128: 47-52
9. Kirillov SV, Makarov EM, Semenov Yu P (1983) Quantitative study of interaction of deacylated tRNA with *Escherichia coli* ribosomes. Role of 50 S subunits in formation of the E site. *FEBS Lett* 157: 91-94
10. Rheinberger HJ, Sternbach H, Nierhaus KH (1981) Three tRNA binding sites on *Escherichia coli* ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 5310-5314
11. Lill R, Robertson JM, Wintermeyer W (1986) Affinities of tRNA binding sites of ribosomes from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 25: 3245-3255
12. Lill R, Robertson JM, Wintermeyer W (1989) Binding of the 3' terminus of tRNA to 23S rRNA in the ribosomal exit site actively promotes translocation. *EMBO J* 8: 3933-3938
13. Geigenmuller U, Nierhaus KH (1990) Significance of the third tRNA binding site, the E site, on *E. coli* ribosomes for the accuracy of translation: an occupied E site prevents the binding of non-cognate aminoacyl-tRNA to the A site. *EMBO J* 9: 4527-4533
14. Schmitt E, Mechulam Y, Fromant M, Plateau P, Blanquet S (1997) Crystal structure at 1.2 Å resolution and active site mapping of *Escherichia coli* peptidyl-tRNA hydrolase. *EMBO J* 16: 4760-4769
15. Jorgensen F, Kurland CG (1990) Processivity errors of gene expression in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 215: 511-521
16. Nierhaus KH (2006) Decoding errors and the involvement of the E-site. *Biochimie* 88: 1013-1019
17. Raczynska KD, Augustyniak H (2007) Degradacja nieprawidłowych transkryptów w komórkach eukariotycznych i prokariotycznych. *Postepy Biol Kom* 34: 299-315
18. Gutmann S, Haebel PW, Metzinger L, Sutter M, Felden B, Ban N (2003) Crystal structure of the transfer-RNA domain of transfer-messenger RNA in complex with SmpB. *Nature* 424: 699-703
19. Keiler KC, Waller PR, Sauer RT (1996) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* 271: 990-993
20. Hansen JL, Ippolito JA, Ban N, Nissen P, Moore PB, Steitz TA (2002) The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol Cell* 10: 117-128
21. Kurland CG, Jorgensen F, Richter A, Ehrenberg M, Bilgin N, Rojas A-M (1990) Through the accuracy window. W: Hill WE, Dahlberg A, Garret RA, Moore PB, Schlessinger D, Wrner JR (red) *The Ribosome – Structure, Function and Evolution*. Amer Soc Microbiol, Washington, DC, str 513-526
22. Boudloun F, Donner D, Kurland CG (1983) Codon-specific missense errors *in vivo*. *EMBO J* 2: 1351-1356
23. Weijland A, Parmeggiani A (1993) Toward a model for the interaction between elongation factor Tu and the ribosome. *Science* 259: 1311-1314
24. Hopfield JJ (1974) Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 4135-4139
25. Ninio J (1974) A semi-quantitative treatment of missense and nonsense suppression in the *strA* and *ram* ribosomal mutants of *Escherichia coli*. Evaluation of some molecular parameters of translation *in vivo*. *J Mol Biol* 84: 297-313
26. Thompson RC (1988) EFTu provides an internal kinetic standard for translational accuracy. *Trends Biochem Sci* 13: 91-93
27. Lill R, Lepier A, Schwagele F, Sprinzl M, Vogt H, Wintermeyer W (1988) Specific recognition of the 3'-terminal adenosine of tRNA^{Phe} in the exit site of *Escherichia coli* ribosomes. *J Mol Biol* 203: 699-705
28. Rheinberger HJ, Sternbach H, Nierhaus KH (1986) Codon-anticodon interaction at the ribosomal E site. *J Biol Chem* 261: 9140-9143
29. Rheinberger HJ, Nierhaus KH (1983) Testing an alternative model for the ribosomal peptide elongation cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4213-4217
30. Rheinberger HJ, Nierhaus KH (1986) Allosteric interactions between the ribosomal transfer RNA-binding sites A and E. *J Biol Chem* 261: 9133-9139

31. Dinos G, Wilson DN, Teraoka Y, Szaflarski W, Fucini P, Kalpaxis D, Nierhaus KH (2004) Dissecting the ribosomal inhibition mechanisms of edeine and pactamycin: the universally conserved residues G693 and C795 regulate P-site RNA binding. *Mol Cell* 13: 113-124
32. Agrawal RK, Spahn CM, Penczek P, Grassucci RA, Nierhaus KH, Frank J (2000) Visualization of tRNA movements on the *Escherichia coli* 70S ribosome during the elongation cycle. *J Cell Biol* 150: 447-460
33. 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
34. Jenner L, Rees B, Yusupov M, Yusupova G (2007) Messenger RNA conformations in the ribosomal E site revealed by X-ray crystallography. *EMBO Rep* 8: 846-850
35. Selmer M, Dunham CM, Murphy FVt, Weixlbaumer A, Petry S, Kelley AC, Weir JR, Ramakrishnan V (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* 313: 1935-1942
36. Triana-Alonso FJ, Chakraborty K, Nierhaus KH (1995) The elongation factor 3 unique in higher fungi and essential for protein biosynthesis is an E site factor. *J Biol Chem* 270: 20473-20478
37. Remme J, Margus T, Vilems R, Nierhaus KH (1989) The third ribosomal tRNA-binding site, the E site, is occupied in native polysomes. *Eur J Biochem* 183: 281-284
38. Dinos G, Kalpaxis DL, Wilson DN, Nierhaus KH (2005) Deacylated tRNA is released from the E site upon A site occupation but before GTP is hydrolyzed by EF-Tu. *Nucleic Acids Res* 33: 5291-5296
39. Schilling-Bartetzko S, Bartetzko A, Nierhaus KH (1992) Kinetic and thermodynamic parameters for tRNA binding to the ribosome and for the translocation reaction. *J Biol Chem* 267: 4703-4712
40. Robert F, Brakier-Gingras L (2003) A functional interaction between ribosomal proteins S7 and S11 within the bacterial ribosome. *J Biol Chem* 278: 44913-44920
41. Marquez V, Wilson DN, Tate WP, Triana-Alonso F, Nierhaus KH (2004) Maintaining the ribosomal reading frame: the influence of the E site during translational regulation of release factor 2. *Cell* 118: 45-55
42. O'Connor M, Willis NM, Bossi L, Gesteland RF, Atkins JF (1993) Functional tRNAs with altered 3' ends. *EMBO J* 12: 2559-2566
43. Sanders CL, Curran JF (2007) Genetic analysis of the E site during RF2 programmed frameshifting. *RNA* 13: 1483-1491
44. Major LL, Poole ES, Dalphin ME, Mannering SA, Tate WP (1996) Is the in-frame termination signal of the *Escherichia coli* release factor-2 frameshift site weakened by a particularly poor context? *Nucleic Acids Res* 24: 2673-2678
45. Poole ES, Brown CM, Tate WP (1995) The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of in vivo translational termination in *Escherichia coli*. *EMBO J* 14: 151-158
46. Baranov PV, Gesteland RF, Atkins JF (2002) Recoding: translational bifurcations in gene expression. *Gene* 286: 187-201
47. Baranov PV, Gesteland RF, Atkins JF (2002) Release factor 2 frameshifting sites in different bacteria. *EMBO Rep* 3: 373-377
48. Weiss RB, Dunn DM, Dahlberg AE, Atkins JF, Gesteland RF (1988) Reading frame switch caused by base-pair formation between the 3' end of 16S rRNA and the mRNA during elongation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *EMBO J* 7: 1503-1507
49. Trimble MJ, Minnicus A, Williams KP (2004) tRNA slippage at the tmRNA resume codon. *RNA* 10: 805-812
50. Stagg SM, Frazer-Abel AA, Hagerman PJ, Harvey SC (2001) Structural studies of the tRNA domain of tmRNA. *J Mol Biol* 309: 727-735
51. Ivanov IP, Gesteland RF, Atkins JF (2000) Antizyme expression: a subversion of triplet decoding, which is remarkably conserved by evolution, is a sensor for an autoregulatory circuit. *Nucleic Acids Res* 28: 3185-3196
52. Matsufuji S, Matsufuji T, Miyazaki Y, Murakami Y, Atkins JF, Gesteland RF, Hayashi S (1995) Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme. *Cell* 80: 51-60
53. Bekaert M, Rousset JP (2005) An extended signal involved in eukaryotic -1 frameshifting operates through modification of the E site tRNA. *Mol Cell* 17: 61-68
54. Wilson DN, Nierhaus KH (2006) The E-site story: the importance of maintaining two tRNAs on the ribosome during protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* 63: 2725-2737
55. Nierhaus KH (1996) Protein synthesis. An elongation factor turn-on. *Nature* 379: 491-492

Decoding errors – function of the ribosomal E site

Kamilla Bąkowska-Żywicka[✉], Marta Sikora, Tomasz Twardowski

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

[✉]e-mail: bakowska@ibch.poznan.pl

Key words: E site, protein biosynthesis, frameshifting

ABSTRACT

In the sixties of the last (20th) century James Watson presented a two-sites model for the ribosome comprising the P site for the peptidyl transfer RNA (tRNA) before peptide-bond formation and the A site, where decoding takes place according to the codon exposed there. Twenty years later the E site, which was specific for deacylated tRNA was detected. However, despite having three tRNA binding sites, only two tRNAs occupy the ribosome simultaneously during protein synthesis: at the A and P sites before translocation (PRE state) and at the P and E sites after translocation (POST state). The importance of having two tRNAs in the POST state has been revealed during the last 25 years. It has been shown, that the E-tRNA prevents misincorporation of aminoacids and loss of reading frame. In other words, the ribosomal E site is a guard for accuracy of the polypeptide synthesized in the ribosomes.

Dariusz Pytel^{1,2}

Artur Słupianek²

Dominika Książek²

Tomasz Skórski¹

Janusz Błasiak^{2,✉}

¹Katedra Mikrobiologii i Immunologii Temple University School of Medicine, Philadelphia, USA

²Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź

✉Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; tel.: (042) 635 43 34, faks: (042) 635 44 84, e-mail: janusz.b@biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 11 marca 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 16 września 2008 r.

Słowa kluczowe: uracyl, glikozylazy DNA, UDG, uszkodzenia DNA, naprawa DNA

Wykaz skrótów: AID – deaminaza cytozynowa; APE1 – endonukleaza AP; APOBEC – edytaza katalizująca deaminację C→U w mRNA apolipoproteiny-B; CSR – przełączanie klasy przeciwciał; IgM, IgG, IgA, IgE – immunoglobuliny klasy M, G, A i E; RAR (ang. *retinoid acid receptor*) – receptor kwasu retinoidowego; RXR (ang. *retinoid X receptor*) – retinoidowy receptor; SHM – hipermutacje somatyczne; UDG, UNG, TDG, UNG1/2, SMUG1, MBD4, NEIL1 – glikozylazy DNA uracylu

Podziękowania: Praca wykonana w ramach grantu 505/376 finansowanego przez Uniwersytet Łódzki

STRESZCZENIE

Uracyl jest jedną z czterech zasad azotowych, które najczęściej występują w prawidłowym RNA. Uracyl może znaleźć się także w DNA wskutek enzymatycznej lub nieenzymatycznej deaminacji cytozyny oraz wprowadzenia dUMP zamiast dTMP do DNA przez polimerazę DNA podczas replikacji. Uracyl z DNA może być usuwany przez enzymy naprawy DNA, w procesie dającym jako produkt pośredni miejsce apirymidynowe, natomiast gdy nie zostanie usunięty, to w kolejnej rundzie replikacji para C:G w rodzicielskim DNA może się zamienić w parę T:A w potomnym DNA, co wskazuje, że obecność uracylu w DNA może prowadzić do mutacji. Uracyl, podobnie jak tymina, tworzy najbardziej stabilne wiązania wodorowe z adeniną, nie zmienia więc właściwości kodujących DNA. Uracyl w DNA jest rozpoznawany przez glikozylazy DNA uracylu (UDGs), zapoczątkowujące proces naprawy DNA przez wycinanie zasad azotowych, w którym uracyl jest usuwany z DNA i zastąpiony tyminą lub cytozyną, w przypadku, kiedy był wynikiem deaminacji cytozyny. U eukariontów znajdują się co najmniej cztery jądrowe UDGs: UNG2, SMUG1, TDG i MBD4, natomiast w mitochondrium działa UNG1. UNG2 bierze udział w naprawie związanej z replikacją, oddziałując z białkami PCNA i RPA. Uracyl może być także produktem pośrednim w tworzeniu repertuaru przeciwciał limfocytów B. Enzymatyczna deaminacja wirusowego DNA przez komórki gospodarza może być mechanizmem obronnym przed zakażeniem wirusowym, w tym zakażeniem HIV-1. Glikozylazy UNG2, MBD4 i TDG mogą współdziałać z białkami naprawy błędnego parowania zasad, a TDG może ponadto uczestniczyć w szlaku naprawy przez wycinanie nukleotydów.

WPROWADZENIE URACYLU W DNA

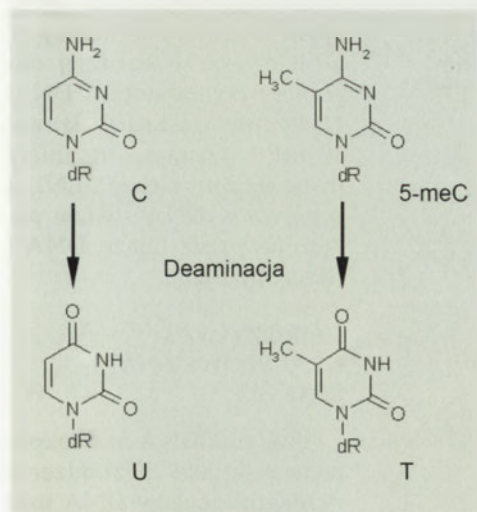
Uracyl jest zasadą azotową występującą w prawidłowym RNA i tworzy z adeniną prawidłową parę komplementarnych zasad, analogiczną do pary tymina-adenina i prawdopodobnie występował również we wczesnych formach DNA, zanim został zastąpiony przez swoją pochodną – tyminę (5-metylouracyl). W genomach niektórych wirusów DNA nadal znajduje się uracyl, a nie tymina. Zatem czy uracyl w DNA to uszkodzenie? Jest to przecież prawidłowa zasada azotowa nie zmieniająca właściwości kodujących DNA. Nie wdając się w rozważania nad definicją uszkodzenia DNA, można stwierdzić, że uracyl w DNA uszkodzeniem jest, gdyż jest rozpoznawany przez wyspecjalizowane białka, których działania na ogół prowadzą do usunięcia uracylu z DNA i zastąpienie go tyminą lub cytozyną. Z drugiej strony, wyniki niedawnych badań sugerują, że ssaki mogą wykorzystywać uracyl występujący w DNA jako główny produkt pośredni w tworzeniu repertuaru dojrzałych przeciwciał [1]. Uracyl w DNA limfocytów B jest produktem pośrednim w procesie tworzenia dojrzałych przeciwciał w odporności nabytej, jak również bierze udział w obronie przeciwko zakażeniom retrowirusowym w odporności wrodzonej [2-4].

Uracyl jest obecny w DNA w niewielkich ilościach i powstaje poprzez deaminację cytozyny lub włączenie dUMP zamiast dTMP do łańcucha polinukleotydowego podczas replikacji DNA. Polimerazy DNA, z wyjątkiem Vent i Pfu, nie różnicują pomiędzy dUTP i dTTP, w efekcie czego częstość wstawiania dUMP do DNA zależy od stosunku dUTP/dTTP w komórkowej puli nukleotydów i w konsekwencji do genomu człowieka zostaje wstawionych około 10⁴ reszt dUMP podczas jednej rundy replikacji [5]. Polimerazy Vent i Pfu należą do termostabilnych polimeraz DNA, syntetyzowanych przez mikroorganizmy należące do Archaea – Pfu pochodzi ze szczepu *Pyrococcus furiosus*, a Vent ze szczepu *Thermococcus litoralis*. Wykazują one aktywność 3'→5' egzonukleazy, co daje im możliwość korekty (ang. *proofreading*) prekursorów nukleotydów w replikacji DNA. Enzymy te cechuje znacznie niższa częstość wprowadzania błędów do nowo syntetyzowanej nici DNA, niż inne polimerazy DNA [6,7]. Polimerazy DNA hipertermofilnych bakterii (szczepów *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woisei*, *Pyrococcus horikishii*, *Sulfolobus solfataricus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus gorgonarius*, *Sulfurispha-*

era ohwakuensis, *Aeropyrum pernix* i *Pyrodictium occultum*) oraz mezofilnych (szczepu *Methanosarcina acetivorans*) należące do grupy polimeraz B rozpoznają uracyl w DNA, w wyniku czego powodują zatrzymanie replikacji. Natomiast takie polimerazy DNA, jak bakteryjna polimeraza III, eukariotyczne polimerazy jądrowe δ i ϵ oraz polimeraza mitochondrialna μ nie rozpoznają uracylu. Z kolei eukariotyczna polimeraza ζ , która wykazuje homologię do polimeraz DNA Archaea grupy B, może rozpoznawać uracyl, ale nie powoduje zatrzymania replikacji [8]. Enzymem kontrolującym wewnątrzkomórkowy poziom dUTP jest UTPaza. Enzym ten przeprowadza reakcję hydrolizy dUTP do dUMP i pirofosforanu (PPi). Redukując poziom dUTP, dostarcza dUMP, który jest następnie wykorzystywany do biosyntezy dTTP. UTPaza jest ważnym elementem dokładności replikacji oraz naprawy DNA [9]. Wstawienie uracylu może powodować powstanie kolejnej pary U:A w następnej replikacji, jednakże większość uracylu jest usuwana przez glikozylazy uracylowe DNA, a powstające miejsca apurynowe/apirimidynowe (AP) są potencjalnie mutagenne, jeśli nie zostaną naprawione przed kolejną rundą replikacyjną. Miejsca AP mogą być również cytotoksyczne, gdy występują w obszarach przyłączania białek regulatorowych [10].

Źródłem uracylu w DNA może być deaminacja cytozyny, mogąca prowadzić do mutagennego sparowania U:G. Deaminacja cytozyny zachodzi z szybkością 7-8 większą w cyklubotanowych dimerach pirymidynowych (CPD), będących najczęstszymi uszkodzeniami DNA indukowanymi przez promieniowanie UV, niż w innych obszarach DNA [11-13]. Rycina 1 przedstawia wzory strukturalne cytozyny, 5-metylocytozyny, uracylu oraz tyminy.

Niesparowania U:G powstające podczas deaminacji cytozyny są kluczowym produktem pośrednim zmieniającym geny immunoglobulin podczas somatycznej hipermutacji (SHM) i procesu przełączania klasy przeciwciał (CSR) [2,4]. Procesy te mają udział w rozwoju specyficznych przeciwciał o zróżnicowanych funkcjach efektorowych [1]. Deaminacja cytozyny w DNA może być skutkiem działania białek z rodziny APOBEC (ang. *apolipoprotein B editing catalytic polypeptide*), z których jedno, deaminaza cytozynowa AID (ang. *activation-induced cytosine deaminase*), deaminuje C w loci immunoglobulin w limfocytach B [14]. Białko AID powoduje deaminację cytozyny w jednoniciowym DNA w



Rycina 1. Deaminacja cytozyny (C) do uracylu (U) i 5-metylocytozyny (5-meC) do tyminy (T).

obszarze zmiennym (V) i w obszarze przełączania (S), ułatwiające SHM i CSR [2]. Powstały w tym procesie U jest usuwany w procesie naprawy DNA przez wycinanie zasad azotowych (BER), który zostaje zainicjowany przez glikozylazę DNA uracylu (UDG) UNG2 [15]. Uszkodzenia wywołane przez deaminazę AID usuwane są także przez system naprawy DNA przez niehomologiczne łączenie końców (NHEJ) przy udziale endonukleazy MRE11/RAD50 i polimerazy DNA η [16]. Osoby z defektami glikozylazy UNG2 mogą być narażone na nawracające zakażenia, chłoniaki oraz charakteryzują się niesprawnymi mechanizmami rekombinacji, powodującymi podwyższenie poziomu immunoglobulin IgM i obniżenie poziomu immunoglobulin IgG, IgA i IgE [2]. Mutacje genu *AID* mogą się przyczyniać do rozwoju chłoniaków, gdyż białko AID bierze udział w deaminacji wielu protoonkogenów [17]. Zmiana poziomu deaminacji, także wskutek mutacji *AID*, może przyczyniać się do translokacji genu immunoglobiny, które z kolei mogą zaburzać ekspresję genów cyklin D, MYC i RAS [18].

Pokswirusy, herpeswirusy i retrowirusy kodują dUT-Pazę i/lub UDG, co może być świadectwem, że nawet te prymitywne formy życia są wrażliwe na uracyl w DNA [19]. Geneza uracylu w wirusowym DNA jest zresztą taka sama jak w DNA człowieka – wstawienie podczas replikacji i deaminacja cytozyny. Oprócz tego, cytozyny genomów wielu wirusów człowieka są celem białek APOBEC gospodarza, odgrywających ważną rolę w obronie organizmu przed zakażeniami wirusowymi. Dotyczy to także zakażeń HIV-1 – białko APOBEC3G wykazuje wysoką aktywność przeciw temu wirusowi, blokując jego replikację w limfocytach i makrofagach. Mechanizm tego efektu może być oparty na deaminacji cytozyny do uracylu w wirusowym DNA przez APOBEC3G, usunięciu uracylu przez UNG2 człowieka, trawieniu powstałego miejsca AP przez endonukleazę AP (APE1), prowadzącego do ostatecznej degradacji wirusowego DNA [20]. Wysoka sprawność enzymatycznej deaminacji cytozyny do uracylu może należeć do mechanizmów obronnych, skierowanych przeciwko zakażeniom retrowirusowym [17]. Uracyl z DNA jest usuwany przede wszystkim w szlaku naprawy DNA przez wycinanie zasad azotowych (BER).

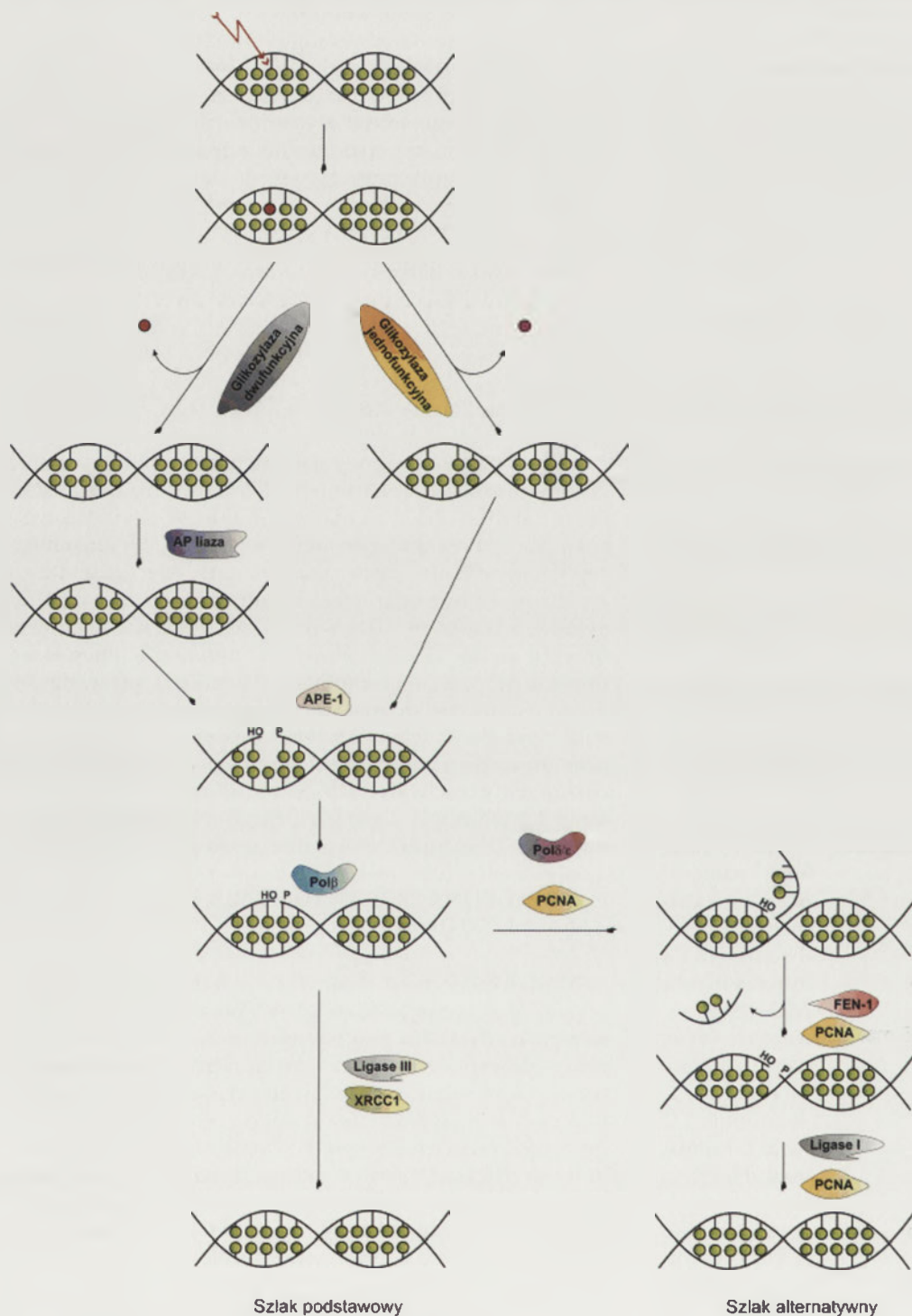
NAPRAWA DNA PRZEZ WYCINANIE ZASAD AZOTOWYCH

Modyfikacje zasad azotowych są jednymi z najczęściej występujących uszkodzeń DNA. Powstają one najczęściej w wyniku działania reaktywnych form tlenu (ROS), które mogą powstawać podczas metabolizmu komórkowego lub wskutek wielu czynników fizycznych, przede wszystkim promieniowania jonizującego i promieniowania UV, oraz związków chemicznych. Do oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad należą 8-oksoguanina (8-oksoG) i glikol tyminy, uznawane czasem za wyznaczniki (markery) stresu oksydacyjnego. 8-oksoG może być mutagenna, gdyż, jeżeli nie zostanie naprawiona, może tworzyć parę z adeniną podczas replikacji, co może prowadzić do transwersji G:C→T:A. Inną grupę zmodyfikowanych zasad DNA stanowią zasady alkilowane, w tym 7-metyloguanina, 3-metyloadenina i 3-metyloguanina. N-alkilowane puryny

są podatne na spontaniczną hydrolizę wiązania N-glikozydowego, prowadzącą do powstania miejsca apurynowego lub apirymidynowego (miejsca AP) [21].

Zmodyfikowane zasady DNA są substratami dla systemu naprawy DNA przez wycinanie zasad azotowych BER (ang. *base excision repair*), której pierwszy etap obejmuje rozpoznanie uszkodzonej zasady przez glikozylazę DNA. Glikozylaza hydrolizuje wiązanie glikozydowe pomiędzy zasadą azotową a dezoksyrybozą, co prowadzi do usunięcia nieprawidłowej zasady z DNA i powstania

miejsca AP. Glikozylazy DNA komórek eukariotycznych można podzielić na 2 klasy: glikozylazy typu I, które usuwają zasadę, a nie DNA jest przecinana przez endonukleazę AP (APE1) oraz glikozylazy typu II, która ma aktywność 3'-endonukleazy (liazy AP) i trawi wiązanie fosfodiesterowe, w wyniku czego powstaje wolny koniec 3'-OH oraz koniec 5'-fosforanu (5'-P) oraz via β -eliminację powstaje 3'-fosfo- α,β -nienasycony aldehyd (3'-PUA), który dopiero w dalszym etapie zostaje usunięty przez AP-endonukleazę i powstaje wtedy koniec 3'-OH; 5'-deoksyrybozo-5-fosforan (5'-dRP) i 3'-OH powstają przy działaniu AP-endonukleazy na miejsce AP, będące wynikiem działania glikozylazy typu I lub hydrolizy spontanicznej [22]. Drugi etap BER obejmuje odsunięcie na zewnątrz nici DNA od końca 5' i syntezę pierwszego nukleotydu na końcu 3' przy udziale polimerazy DNA β . Kolejny etap może zachodzić na drodze dwóch szlaków: podstawowego, w którym następuje usunięcie końca 5'-dRP przez polimerazę β , mającą aktywność liazy AP, oraz połączenie końców 3'-OH i 5'-P dzięki kompleksowi ligazy DNA III z białkiem XRCC1. Końce 5' DNA w formie aldehydowej nie mogą być wydłużane przez polimerazę β i wtedy następuje odłączenie polimerazy i przyłączenie w jej miejsce kompleksu białkowego, składającego się z polimerazy δ/ϵ i jądrowego antygenu komórek proliferujących (PCNA). Kompleks ten wydłuża nie DNA od miejsca AP, przy czym fragment końcowy 5' zostaje jeszcze bardziej odsunięty od cząsteczki DNA. Następnie odstający koniec 5'-dRP zostaje usunięty przez endonukleazę FEN1, a przerwa w DNA zostaje połączona przez ligazę DNA I (Ryc. 2) [23-25].



Rycina 2. Naprawa DNA przez wycinanie zasad azotowych BER.

GLIKOZYLAZY URACYLOWE DNA SSAKÓW

Uracyl w DNA jest rozpoznawany jako uszkodzenie przez glikozylazy DNA uracylu (UDG, ang. *uracil-DNA glycosylase*). Istnieje więcej

Tabela 1. Glikozylazy uracylowe DNA człowieka.

Enzym	Lokalizacja chromosomalna	Lokalizacja w komórce	Substrat
UNG1/2	12q23-24.1	jądro komórkowe oraz mitochondrium	U w ssDNA i dsDNA
SMUG1	12q13.13	jądro komórkowe	U, 5-hmeU
TDG	12q24.1	jądro komórkowe	U:G, T:G εC:G, T:O6-meG
MBD4	3q21.22	jądro komórkowe	U:G, T:G

niż jedna klasa UDG, albowiem myszy pozbawione UDG kodowanej przez gen *ung* i nazwanej UNG rozwijały się prawidłowo [26]. W komórkach ssaków zidentyfikowano do tej pory cztery glikozylazy uracylowe DNA. Należą do nich: UNG1/UNG2, SMUG1 (ang. *single strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase*), TDG (ang. *thymine/uracil mismatch DNA glycosylase*) oraz MBD4 (ang. *methyl binding domain 4 protein*) [15,27]. U myszy wykryto także glikozylazę NEIL1, która może usuwać uracyl oraz tyminę z błędnie sparowanych par zasad DNA, a jej efekt biologiczny nie został do końca poznany [28]. Spośród glikozylaz uracylowych DNA UNG, SMUG1 oraz TDG należą do tej samej rodziny białek UDG, natomiast glikozylaza MBD4 należy do rodziny białek HhH-GPD (ang. *helix-hairpin-helix and Gly/Pro rich loop (GP) followed by a conserved aspartate (D)*). UDG charakteryzują się podobną budową oraz, przypuszczalnie, w trakcie ewolucji wydzieliły się z jednego genu [29]. Enzymy te pełnią różne funkcje w komórce, ale prawdopodobnie mogą również dodatkowo współdziałać z innymi UDG. Charakterystyka glikozylaz uracylowych człowieka przedstawiona została w Tabeli 1.

UNG

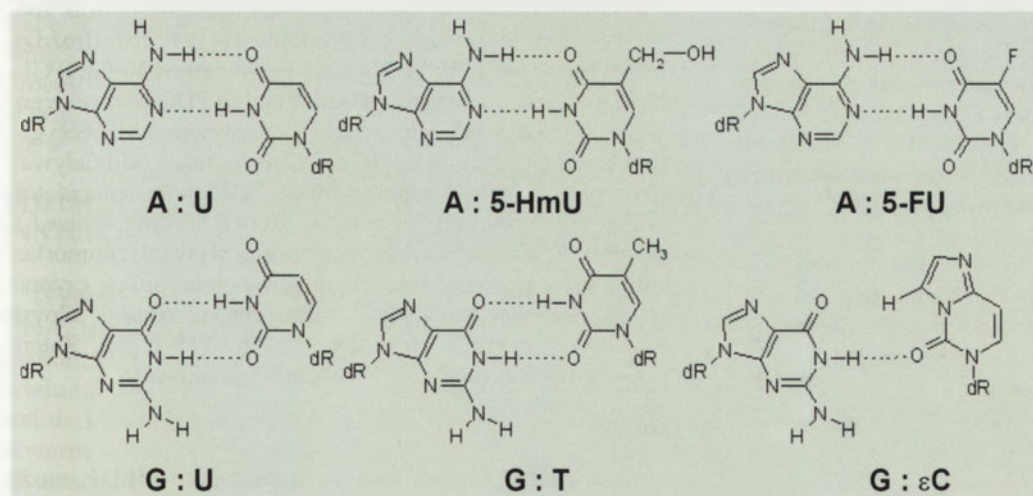
Gen *ung* koduje dwie formy uracylowej glikozylazy DNA: formę mitochondrialną UNG1 zbudowaną z 304 reszt aminokwasowych oraz jądrową UNG2, składającą się z 313 reszt aminokwasowych. Jest to możliwe dzie-

ki alternatywnemu składaniu eksonów oraz wykorzystaniu dwóch sekwencji promotorowych genu *ung* [30]. UNG1 jest jedyną glikozylazą uracylu występującą w mitochondrium, reszta glikozylaz zlokalizowana jest w jądrze komórkowym. Gen *ung*, o wielkości 14 kb, położony jest na dłuższym ramieniu chromosomu 12 (12q24.1) i zawiera 7 eksonów. Synteza mRNA dla białek UNG2 regulowana jest przez promotor P_A, położony powyżej eksonu 1A. Ekson ten koduje polipeptyd o 44 aa unikatowy dla UNG2 [30,31]. Polipeptyd ten bierze udział w transporcie oraz oddziaływaniu z białkami PCNA i RPA (ang. *Replication Protein A*) [32,33]. Druga sekwencja promotorowa zapewniająca ekspresję mRNA białka UNG1 jest położona powyżej eksonu 1B. Dzięki wykorzystaniu dwóch sekwencji promotorowych obydwa białka mają unikatową domenę N-kończową. Białko UNG1 ulega następnie w mitochondriach modyfikacji potranslacyjnej, w której, wskutek trawienia proteolitycznego, zostaje odcięty fragment zawierający 29 aa. Powstaje w ten sposób aktywna forma białka UNG1, zawierająca tylko część rdzeniową, która jest charakterystyczna dla białek UNG [34]. Sekwencje promotorowe P_A i P_B stanowią niezależne jednostki transkrypcyjne, pomimo tego że zawierają pewne wspólne elementy [35].

Glikozylaza UNG1 występuje w największej ilości w tkankach bogatych w mitochondria, w tym w mięśniach i sercu [35]. Gen kodujący UNG1 znajduje się pod kontrolą promotora P_B, mającego strukturę typową dla promotorów genów kodujących białka podstawowego metabolizmu komórkowego (ang. *housekeeping*). Białko UNG1 jest syntetyzowane jako białko prekursorowe, a jego aktywacja następuje podczas transportu do mitochondriów w wyniku degradacji proteolitycznej, polegającej na odcięciu sekwencji złożonej z 29 reszt aminokwasowych z fragmentu N-końcowego, najprawdopodobniej przez mitochondrialną peptydazę MPP, przez co powstaje funkcjonalne białko UNG1 o masie 31 kDa. Analiza ekstraktów uzyskanych z mitochondriów człowieka pozwoliła

na identyfikację kolejnej izoformy glikozylazy UNG1 o masie 26 kDa, ale nie można wykluczyć, iż białko to powstaje w wyniku niespecyficznego degradacji białka UNG1 w mitochondriach [34]. Według innej hipotezy w mitochondriach znajdują się dwie aktywne formy glikozylazy UNG1, różniące się zarówno masą cząsteczkową, jak i wrażliwością na miejsca AP [34].

W przeciwieństwie do UNG1, UNG2 występuje w największej ilości w



Rycina 3. Parowanie uracylu z adeniną oraz paralogów uracylu z zasadami azotowymi.

tkankach intensywnie namnażających się (jelito i genitalia) [35]. Białko to jest transkrybowane z sekwencji promotora P_{A} , położonej powyżej eksonu 1A. Ekspresja genu tego białka jest najwyższa w fazach G1 i S cyklu komórkowego [35]. Gen *ung2* koduje białko jądrowe zbudowane z 313 reszt aminokwasowych. Białko to występuje w komórce w kompleksach replikacyjnych razem z PCNA i RPA. Obecność UNG2 w takich kompleksach sugeruje rolę tego białka – usuwanie uracylu z DNA podczas replikacji DNA [30,33,36]. UNG2 usuwa również uracyl powstający w wyniku deaminacji cytozyny. UNG2 jest białkiem, które uczestniczy również w procesach różnicowania limfocytów. Ponadto, wydaje się, że białko to uczestniczy w składaniu kompleksu CENP-A, który uczestniczy w prawidłowym rozdziale chromosomów komórek potomnych podczas procesów podziałów komórkowych [36].

SMUG1

Kolejnym białkiem, które usuwa uracyl występujący w DNA w parach U:G, powstających wskutek deaminacji cytozyny, jest SMUG1. Glikozylaza SMUG1 po raz pierwszy została zidentyfikowana u żaby *Xenopus laevis*, podczas badań nad proteomem tego płaza. Odpowiednik tego enzymu u człowieka został odkryty podczas analizy porównawczej sekwencji genomów *X. laevis* oraz sekwencji genomów człowieka [37]. SMUG1 wykazuje większe preferencje do usuwania uracylu z dwuniciowego niż jednoniciowego DNA [38,39]. Gen kodujący białko SMUG1, podobnie jak geny kodujące białka UNG oraz TDG, znajduje się w pobliżu centromeru chromosomu 12 w obszarze 12q13.13. *Smug1* ma 6.3 kb, zawiera 4 eksonów, a jego ekspresja nie zależy od fazy cyklu komórkowego [15]. SMUG1, w odróżnieniu od białka UNG2, nie jest akumulowane w skupiskach replikacyjnych w fazie S. Ponadto, białko SMUG1 występuje w większej ilości w jąderku niż białko UNG2. Może to świadczyć o odmiennych funkcjach tych białek, jakie pełnią w komórce. SMUG1 usuwa uracyl oraz 5-hydroksymetylouracyl (5-hmeU) z jedno- i dwuniciowego DNA. 5-hmeU może powstawać podczas utleniania grupy metylowej tyminy w pozycji 5 wskutek działania promieniowania jonizującego w komórkach [40]. 5-hmeU może powstawać również podczas dwuetapowej reakcji: utleniania grupy metylowej 5-meC w wyspach CpG, w wyniku której powstaje 5-hmeC, a następnie deaminacji do 5-hmeU [41]. SMUG1 usuwa uracyl z par U:G, U:A [37,39]. Rycina 3 przedstawia substraty dla poszczególnych glikozylaz uracylowych (parowanie uracylu z adeniną oraz błędne parowanie paralogów uracylu z poszczególnymi zasadami azotowymi). Glikozylaza SMUG1 może również usuwać z mniejszą efektywnością 3,N⁴-etenocytozynę (εC) [39].

Białko SMUG1 człowieka ma masę 30 kDa i zbudowane jest z 270 reszt aminokwasowych. Białko to jest w 60% identyczne z SMUG1 *Xenopus laevis*. U myszy z nieaktywnym genem *ung*, SMUG1 pełni funkcję głównej glikozylazy usuwającej uracyl z DNA [37,42].

TDG

Glikozylaza TDG została po raz pierwszy zidentyfikowana u małpy jako białko o masie cząsteczkowej 55 kDa,

mające aktywność korekcyjną w stosunku do błędnych sparowań T:G [43]. Dopiero badania z klonowaniem cDNA pozwoliły ocenić jego masę cząsteczkową na 46 kDa, wartość przyjmowana obecnie. Gen *tdg* znajduje się w 12q24.1 [44]. Białko TDG wykazuje aktywność glikozylazową w stosunku do dwuniciowego DNA, usuwa uracyl oraz tyminę z błędnie sparowanych par zasad U:G i T:G [45]. Glikozylaza ta z mniejszą efektywnością może usuwać uszkodzenia εC oraz 5-hmeU. TDG usuwa również błędne sparowanie G:T, będące skutkiem deaminacji 5-meC w wyspach CpG. Deaminacja cytozyny w komórkach człowieka jest główną przyczyną mutacji typu tranzycji G→A [43,45]. Glikozylaza TDG może pełnić również funkcję czynnika transkrypcyjnego [45]. Białko to może również usuwać z mniejszą efektywnością T z par C:T oraz T:T w stosunku do par G:T, zatem hierarchię preferencji usuwania błędnych sparowań można opisać relacją: G:T >> C:T > T. U *Escherichia coli* zidentyfikowano homolog TDG, białko MUG. Białko TDG człowieka oraz bakteryjny homolog MUG mogą usuwać uszkodzenia będące produktem alkilacji, w tym εC. Wycinanie tego typu uszkodzenia może być jedną z głównych funkcji tych glikozylaz [45-47]. εC powstaje w komórce w wyniku działania rakotwórczego chlorku winylu oraz podczas peroksydacji lipidów [48]. TDG jest glikozylazą specyficzną dla dwuniciowego DNA, jednakże wyniki niektórych badań przeprowadzonych ostatnio sugerują, że białko to wykazuje również aktywność w stosunku do jednoniciowego DNA, usuwając z niego 5-fluorouracyl (5-FU) [46]. TDG usuwa również 5-meC z wysp CpG i T z par T:O⁶meG [45,49]. Demetylacja O⁶meG przez O⁶metyloG-transferazę DNA powoduje powstanie błędnego sparowania G:T, które, oprócz TDG, może być naprawiane przez białka naprawy błędnie sparowanych zasad (MMR). TDG jest stymulowana przez endonukleazę BER, APE, może brać udział w usuwaniu guaniny znajdującej się naprzeciw miejsca AP (G:AP) i może podlegać kowalentnej modyfikacji przez ubikwitynopodobne białka SUMO-1 oraz SUMO-2/3 [50,51]. TDG wykazuje mniej niż 10% podobieństwa do UNG, ale sekwencja bakteryjnego homologu MUG pokrywa się w 37% z sekwencją glikozylazy TDG człowieka [46,52,53]. Badania krystalograficzne białek MUG i UNG wykazały ścisłą homologię obu glikozylaz. Zawierają one podobnie ułożone α-helisy oraz centralnie zlokalizowaną strukturę harmonijki β. Oba białka mają dwa aktywne, ewolucyjnie zachowane motywy – w UNG1 występuje sekwencja 143-GQDPY-147 oraz 268-HPSPLS-273, identyczna do występującej u *E. coli*, drożdży oraz wirusa *Herpes*. W MUG znajduje się motyw 16-GINPGL-20, identyczny do występującego w białku TDG oraz sekwencja 140-NPSGLS-145, odpowiadająca motywowi MPSSSS glikozylazy TDG człowieka [46]. TDG może także oddziaływać z receptorem kwasu retinoidowego RAR (ang. *retinoid acid receptor*) oraz retinoidowym receptorem RXR (ang. *retinoid X receptor*). RAR oraz RXR są receptorami wewnątrzkomórkowymi, które po związaniu z ligandem pełnią funkcję czynników transkrypcyjnych [54]. Ponadto, TDG okazała się silnym inhibitorem czynnika transkrypcyjnego TTF-1 [55]. Zatem TDG może odgrywać rolę w regulacji transkrypcji.

MBD4

Glikozylaza MBD4, znana również jako MED1, może się wiązać z błędnie sparowanymi zasadami T:G i U:G w wyspach CpG oraz może z mniejszą efektywnością usu-

wać zmodyfikowane zasady pirymidynowe. MBD4 wykazuje podobne preferencje substratowe jak TDG, może usuwać 5-FU oraz mniej efektywnie wycina εC [56]. MBD4 ma specyficzną domenę wiążącą grupy metylowe, przez co może oddziaływać z metylowanymi wyspami CpG. MBD4 bierze także udział w naprawie błędnie sparowanych zasad, poprzez bezpośrednie oddziaływanie z białkiem MLH1. Mechanizm ten po raz pierwszy został zaobserwowany w drożdżach.

Gen *mbd4* człowieka znajduje się na dłuższym ramieniu chromosomu 3 w 3q21.22 i jest jedynym genem spośród wszystkich genów kodujących glikozylazy uracylowe DNA zlokalizowanym poza chromosomem 12 [56]. Uszkodzenia w genie *mbd4*, podobnie jak zaburzenia funkcji genu *tdg*, mogą odgrywać rolę w procesie transformacji nowotworowej [45]. Białko MBD4 zalicza się do rodziny glikozylaz HhH-GPD (ang. *helix – hairpin – helix (HhH) and Gly/Pro rich loop (GP) followed by a conserved aspartate (D)*). Nazwa tej rodziny białek pochodzi od charakterystycznego motywu strukturalnego helisa-spinka do włosów-helisa i pętli bogatej w glicyny oraz proliny położonej za ewolucyjnie zachowaną resztą kwasu asparaginowego. Domena HhH-GPD jest również charakterystyczna dla innych białek biorących udział w szlakach naprawy DNA, w tym dla glikozylazy EndoIII usuwającej glikol tyminy oraz glikozylazy MutY, która wycina adeninę sparowaną w DNA z 8-oksoguaniną [57].

Glikozylaza MBD4 została odkryta jako pierwsza z rodziny białek wiążących się specyficznie z metylowanym DNA *in vitro* [58]. Zawiera domenę homologiczną do domen glikozylaz/liaz oraz wykazuje aktywność endonukleazową [59]. Wyniki późniejszych badań pozwoliły na identyfikację MBD4 jako monofunkcyjnej glikozylazy biorącej udział w wycinaniu błędnie sparowanych par zasad G:T oraz U:G [57]. MBD4 jest zbudowana z 580 aa, a na swym N-końcu, pomiędzy aminokwasami 82 i 147, ma domenę MBD (ang. *methyl-binding domain*), biorącą udział w wiązaniu grup metylowych, natomiast na C-końcu, pomiędzy aminokwasami 401 i 580, ma domenę glikozylazową. MBD4 wykazuje silne preferencje wiązania do błędnych sparowań 5mCpG:TpG, natomiast nie wykazuje takich właściwości lub wykazuje bardzo słabe w stosunku do nie zmetylowanych CpG:TpG oraz 5mCpG:mCpG. MBD4 przeciwdziała mutagennemu procesowi deaminacji 5-mC, w wyniku którego powstaje tymina [60]. Białko rozpoznaje także 5-mC, szczególnie w hemimetylowanym DNA [61].

UDZIAŁ GLIKOZYLAZ DNA URACYLU W INNYCH SZLAKACH NAPRAWY DNA

Wyniki rosnącej liczby badań sugerują, że glikozylazy DNA, włączając w to glikozylazy uracylu, oddziałują z białkami innych szlaków naprawy DNA. Pomimo że w wielu takich przypadkach mechanizm oddziaływania nie jest do końca znany, to nie ulega wątpliwości, że oddziaływanie to, określane mianem *crossstalk*, może mieć istotne znaczenie dla reakcji komórki na uszkodzenia DNA. Oddziaływanie to wskazuje również, że szlaki naprawy DNA nie są autonomicznymi przejawami działania nie-

zależnych systemów, a ich wspólna regulacja może mieć miejsce na wielu poziomach, nie tylko w czasie początkowej integracji sygnałów o uszkodzeniu DNA.

Białka systemu MMR, przede wszystkim MutSα, mogą bezpośrednio rozpoznawać metylowane zasady, przyczyniając się do wiązania z uszkodzonym DNA kompleksu ATR-ATRIP i przesłania informacji o zaburzeniu cyklu komórkowego [62]. MutSα, może rozpoznawać i wiązać O6-metyloguaninę (O6-meG), która może prowadzić do błędnego wstawienia tyminy naprzeciw niej podczas replikacji. Tymina ta jest wycinana przez MutSα [63]. Podczas wiązania fragmentu DNA zawierającego O6-meG, aktywność MMR może być blokowana przez białka systemu BER, gdyż w usuwaniu O6-meG może brać udział TDG. Ponieważ białka MMR mogą wiązać O6-meG/T, a wycinanie O6-meG przez TDG nie jest indukowane związkami alkilującymi, to TDG może usuwać O6-meG jedynie w parze O6-meG/C, która nie jest substratem dla MMR [64]. Przy takim założeniu MMR i TDG operowałyby niezależnie, jednakże nie można wykluczyć ich wspólnego działania w naprawie O6-meG, albowiem można założyć, że wybór odpowiedniego szlaku naprawy, MMR czy BER, przynajmniej w początkowej fazie naprawy O6-meG, musi być koordynowany i określany współdziałaniem MMR i TDG, na przykład w rozpoznawaniu konformacji uszkodzonego fragmentu DNA.

Glikozylaza MBD4 może również oddziaływać z białkami systemu MMR. MBD4 ma podobną aktywność biochemiczną do TDG w stosunku do źle wstawionych reszt G *in vitro* i wiąże zmetylowane zasady w regionach bogatych w dinukleotydy CpG [57]. W przeciwieństwie do TDG, MBD4 może rozpoznawać uszkodzenia DNA spowodowane przez leki alkilujące [65]. MBD4 oddziałuje bezpośrednio z białkiem MLH1, będącym kluczowym elementem MMR. Oddziaływanie to może mieć znaczenie w sygnalizacji alkilacji/deaminacji DNA w punktach kontrolnych cyklu komórkowego.

Wspominany już proces różnicowania przeciwciał może zawierać oddziaływanie pomiędzy białkami szlaku MMR i UNG2 [66]. Dimer MSH2/MSH6 bierze udział w hipermutacji somatycznej (SHM) prowadzącej do zróżnicowania przeciwciał, kierując białko AID i prawdopodobnie inne białka regulatorowe do miejsca rekombinacji (faza I). Wskutek działania deaminazy AID może powstać U, rozpoznawany przez UNG2, której działanie prowadzi do powstania miejsca AP (faza II). Uszkodzenie zainicjowane przez działanie deaminazy AID jest naprawiane poprzez niehomologiczne łączenie końców (NHEJ) przy udziale endonukleazy MRE11/RAD50 i polimerazy η. Zdarzenia te prowadzą do mutacji typu tranzycji C:G→T:A [16].

Glikozylaza TDG może również współdziałać z białkami systemu naprawy przez wycinanie nukleotydów. TDG oddziałuje bezpośrednio z kompleksem XPC-HR23B, podstawowym składnikiem systemu NER człowieka w naprawie ogólnogenomowej (GGR, ang. *global genome repair*) [67,68]. Współdziałanie to dotyczy naprawy błędnego sparowania T:G, w której kompleks XPC-HR23B wiąże

się z TDG związaną z DNA, stymulując jej aktywność i ułatwiając uwolnienie TDG z miejsca AP po usunięciu T z miejsca błędnego sparowania [69].

Błędne sparowania G/T i G/U, występujące często w wyspach CpG, są usuwane przez glikozylazy MBD4 i TDG. Ponieważ pierwotną przyczyną błędnego sparowania jest proces metylacji, a w wyspach CpG metylacja jest związana z wyciszaniem genów, obydwie glikozylazy uracylowe współdziałają z aktywatorami i represorami transkrypcji. TDG może być wiązana i acetylowana przez białko wiążące CREB (CBP), scalające różnorodne szlaki regulacyjne w chromatynie. CBP połączone z TDG nie jest aktywatorem transkrypcji i nie zmienia funkcji TDG. Acetylacja TDG przez CBP prowadzi do jej uwolnienia z kompleksu TDG/CBP i hamuje wiązanie endonukleazy APE1 do miejsca pozbawionego zasady. Możliwe zatem, że poziom acetylacji TDG decyduje o zmianie jej funkcji w transkrypcji na funkcję w naprawie [70].

Nie można wykluczyć, że to co wiemy o oddziaływaniu glikozylaz uracylowych DNA z białkami innych systemów naprawy to jedynie „wierzchołek góry lodowej” i być może nasz podział na w miarę autonomiczne systemy naprawy DNA jest arbitralny i nie oddaje złożonych powiązań pomiędzy białkami i szlakami przesyłania sygnałów, będących wyrazem jedności Natury. Konieczne są zatem dalsze badania w tym kierunku, a rozwijanie problematyki glikozylaz uracylowych DNA oddziałujących z białkami/szlakami MMR wydaje się szczególnie uzasadnione ze względu na istnienie szeregu wyników wnoszących wkład w poznanie mechanizmów tego oddziaływania.

UDZIAŁ GLIKOZYLAZ W REGULACJI TRANSKRYPCJI

Glikozylazy TDG oraz MBD4 mogą brać udział w regulacji transkrypcji niektórych genów. TDG może oddziaływać bezpośrednio z wieloma czynnikami transkrypcyjnymi oraz ich aktywatorami, w tym receptora estrogenowego (ER) i koaktywatora receptora steroidowego 1 (SRC1). W oddziaływaniu tym TDG pełni funkcję aktywatora ER regulującego transkrypcję, aktywacja ta jest niezależna od domeny glikozylazowej TDG. TDG może pełnić również funkcję modulatora steroidowych receptorów jądrowych poprzez bezpośrednie łączenie się z tymi receptorami. Receptory te są aktywowane przez androgeny, glukokortykoidy oraz progesteron [62].

Ostatnie doniesienia sugerują, że TDG może pełnić również funkcję w hamowaniu transkrypcji, jednak funkcja ta jest jeszcze słabo poznana. TDG, oddziałując z innymi glikozylazami, w tym glikozylazą MPG, która usuwa 3-metyloadeninę i 7-metyloguaninę, powoduje hamowanie transkrypcji genów zależną od receptora ER. Ponadto, TDG może tworzyć kompleks z białkiem MBD1, wiążący sekwencje zmetylowane DNA w rejonie wysp CpG. Kompleks MPG/MBD1 może brać udział w represji transkrypcji poprzez oddziaływanie z metylowanymi promotorami *in vitro* oraz *in vivo*, nie zaobserwowano takiego oddziaływania w przypadku braku metylacji. Mechanizmy związane z naprawą uszkodzeń DNA połączone z regulacją

genów są jak do tej pory słabo poznane. Wiadomo jednak, że gdy dochodzi do uszkodzenia DNA, białko MBD1 zostaje uwolnione z kompleksu z białkiem MPG, wówczas glikozylaza MPG jest zdolna do rozpoznawania uszkodzeń alkilacyjnych i zapoczątkowuje proces naprawy. Podobnie jak glikozylaza MPG, represorem transkrypcji może być również glikozylaza MBD4 poprzez wiązanie z hipermetylowanymi promotorami. W procesie tym niezbędne jest oddziaływanie glikozylazy MBD4 z deacetylazą histonową. Udział glikozylaz w szlaku naprawy DNA związanego z transkrypcją TCR (ang. *transcription coupled repair*) jest obecnie przedmiotem intensywnych badań [62,71].

PIŚMIENNICTWO

1. Durandy A, Honjo T (2001) Human genetic defects in class-switch recombination (hyper-IgM syndromes). *Curr Opin Immunol* 13: 543-548
2. Imai K, Slupphaug G, Lee WI, Revy P, Nonoyama S, Catalan N, Yel L, Forveille M, Kavli B, Krokan HE, Ochs HD, Fischer A, Durandy A (2003) Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol* 4: 1023-1028
3. Priet S, Sire J, Querat G (2006) Uracils as a cellular weapon against viruses and mechanisms of viral escape. *Curr HIV Res* 4: 31-42
4. Rada C, Williams GT, Nilsen H, Barnes DE, Lindahl T, Neuberger MS (2002) Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr Biol* 12: 1748-1755
5. Mosbaugh DW, Bennett SE (1994) Uracil-excision DNA repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 48: 315-370
6. Cline J, Braman JC, Hogrefe HH (1996) PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 24: 3546-3551
7. Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108: 1-6
8. Wardle J, Burgers PM, Cann IK, Darley K, Heslop P, Johansson E, Lin LJ, McGlynn P, Sanvoisin J, Stith CM, Connolly BA (2008) Uracil recognition by replicative DNA polymerases is limited to the archaea, not occurring with bacteria and eukarya. *Nucleic Acids Res* 36: 705-711
9. Mol CD, Harris JM, McIntosh EM, Tainer JA (1996) Human dUTP pyrophosphatase: uracil recognition by a beta hairpin and active sites formed by three separate subunits. *Structure* 4: 1077-1092
10. Verri A, Mazarrello P, Biamonti G, Spadari S, Focher F (1990) The specific binding of nuclear protein(s) to the cAMP responsive element (CRE) sequence (TGACGTCA) is reduced by the misincorporation of U and increased by the deamination of C. *Nucleic Acids Res* 18: 5775-5780
11. Barak Y, Cohen-Fix O, Livneh Z (1995) Deamination of cytosine-containing pyrimidine photodimers in UV-irradiated DNA. Significance for UV light mutagenesis. *J Biol Chem* 270: 24174-24179
12. Krokan HE, Standal R, Slupphaug G (1997) DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J* 325(Pt 1): 1-16
13. Tessman J, Kennedy MA, Liu SK (1994) Unusual kinetics of uracil formation in single and double-stranded DNA by deamination of cytosine in cyclobutane pyrimidine dimers. *J Mol Biol* 235: 807-812
14. Kavli B, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE (2007) Uracil in DNA - general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. *DNA Repair (Amst)* 6: 505-516
15. Krokan HE, Drablos F, Slupphaug G (2002) Uracil in DNA - occurrence, consequences and repair. *Oncogene* 21: 8935-8948
16. Larson ED, Cummings WJ, Bednarski DW, Maizels N (2005) MRE11/RAD50 cleaves DNA in the AID/UNG-dependent pathway of immunoglobulin gene diversification. *Mol Cell* 20: 367-375

17. Pham P, Bransteitter R, Goodman MF (2005) Reward versus risk: DNA cytidine deaminases triggering immunity and disease. *Biochemistry* 44: 2703-2715
18. Kuehl WM, Bergsagel PL (2005) Early genetic events provide the basis for a clinical classification of multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 346-352
19. Goff SP (2003) Death by deamination: a novel host restriction system for HIV-1. *Cell* 114: 281-283
20. Yang B, Chen K, Zhang C, Huang S, Zhang H (2007) Virion-associated uracil DNA glycosylase-2 and apurinic/aprimidinic endonuclease are involved in the degradation of APOBEC3G-edited nascent HIV-1 DNA. *J Biol Chem* 282: 11667-11675
21. Lindahl T (1990) Repair of intrinsic DNA lesions. *Mutat Res* 238: 305-311
22. Krwawicz J, Arczewska KD, Speina E, Maciejewska A, Grzesiuk E (2007) Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. *Acta Biochim Polon* 54: 413-434
23. Matsumoto Y, Kim K, Bogenhagen DF (1994) Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. *Mol Cell Biol* 14: 6187-6197
24. Matsumoto Y, Kim K, Hurwitz J, Gary R, Levin DS, Tomkinson AE, Park MS (1999) Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/aprimidinic sites with purified human proteins. *J Biol Chem* 274: 33703-33708
25. Pascucci B, Stucki M, Jonsson ZO, Dogliotti E, Hubscher U (1999) Long patch base excision repair with purified human proteins. DNA ligase I as patch size mediator for DNA polymerases delta and epsilon. *J Biol Chem* 274: 33696-33702
26. Nilsen H, Rosewell I, Robins P, Skjelbred CF, Andersen S, Slupphaug G, Daly G, Krokan HE, Lindahl T, Barnes DE (2000) Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication. *Mol Cell* 5: 1059-1065
27. Krokan HE, Nilsen H, Skorpen F, Otterlei M, Slupphaug G (2000) Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett* 476: 73-77
28. Takao M, Kanno S, Kobayashi K, Zhang QM, Yonei S, van der Horst GT, Yasui A (2002) A back-up glycosylase in Nth1 knock-out mice is a functional Nei (endonuclease VIII) homologue. *J Biol Chem* 277: 42205-42213
29. Aravind L, Koonin EV (2000) The alpha/beta fold uracil DNA glycosylases: a common origin with diverse fates. *Genome Biol* 1: RESEARCH0007
30. Nilsen H, Otterlei M, Haug T, Solum K, Nagelhus TA, Skorpen F, Krokan HE (1997) Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene. *Nucleic Acids Res* 25: 750-755
31. Haug T, Skorpen F, Kvaloy K, Eftedal I, Lund H, Krokan HE (1996) Human uracil-DNA glycosylase gene: sequence organization, methylation pattern, and mapping to chromosome 12q23-q24.1. *Genomics* 36: 408-416
32. Otterlei M, Haug T, Nagelhus TA, Slupphaug G, Lindmo T, Krokan HE (1998) Nuclear and mitochondrial splice forms of human uracil-DNA glycosylase contain a complex nuclear localisation signal and a strong classical mitochondrial localisation signal, respectively. *Nucleic Acids Res* 26: 4611-4617
33. Otterlei M, Warbrick E, Nagelhus TA, Haug T, Slupphaug G, Akbari M, Aas PA, Steinsbekk K, Bakke O, Krokan HE (1999) Post-replicative base excision repair in replication foci. *EMBO J* 18: 3834-3844
34. Bharati S, Krokan HE, Kristiansen L, Otterlei M, Slupphaug G (1998) Human mitochondrial uracil-DNA glycosylase preform (UNG1) is processed to two forms one of which is resistant to inhibition by AP sites. *Nucleic Acids Res* 26: 4953-4959
35. Haug T, Skorpen F, Aas PA, Malm V, Skjelbred C, Krokan HE (1998) Regulation of expression of nuclear and mitochondrial forms of human uracil-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* 26: 1449-1457
36. Hagen L, Pena-Diaz J, Kavli B, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE (2006) Genomic uracil and human disease. *Exp Cell Res* 312: 2666-2672
37. Haushalter KA, Todd Stukenberg MW, Kirschner MW, Verdine GL (1999) Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors. *Curr Biol* 9: 174-185
38. Kavli B, Andersen S, Otterlei M, Liabakk NB, Imai K, Fischer A, Durandy A, Krokan HE, Slupphaug G (2005) B cells from hyper-IgM patients carrying UNG mutations lack ability to remove uracil from ssDNA and have elevated genomic uracil. *J Exp Med* 201: 2011-2021
39. Kavli B, Sundheim O, Akbari M, Otterlei M, Nilsen H, Skorpen F, Aas PA, Hagen L, Krokan HE, Slupphaug G (2002) hUNG2 is the major repair enzyme for removal of uracil from U:A matches, U:G mismatches, and U in single-stranded DNA, with hSMUG1 as a broad specificity backup. *J Biol Chem* 277: 39926-39936
40. Faure H, Mousseau M, Cadet J, Guimier C, Tripier M, Hida H, Favier A (1998) Urine 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine vs. 5-(hydroxymethyl) uracil as DNA oxidation marker in adriamycin-treated patients. *Free Radic Res* 28: 377-382
41. Cannon-Carlson SV, Gokhale H, Teebor GW (1989) Purification and characterization of 5-hydroxymethyluracil-DNA glycosylase from calf thymus. Its possible role in the maintenance of methylated cytosine residues. *J Biol Chem* 264: 13306-13312
42. Nilsen H, Haushalter KA, Robins P, Barnes DE, Verdine GL, Lindahl T (2001) Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome: role of the SMUG1 uracil-DNA glycosylase. *EMBO J* 20: 4278-4286
43. Brown TC, Jiricny J (1987) A specific mismatch repair event protects mammalian cells from loss of 5-methylcytosine. *Cell* 50: 945-950
44. Barnes DE, Lindahl T (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 38: 445-476
45. Hardeland U, Bentele M, Lettieri T, Steinacher R, Jiricny J, Schar P (2001) Thymine DNA glycosylase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68: 235-253
46. Barrett TE, Scharer OD, Savva R, Brown T, Jiricny J, Verdine GL, Pearl LH (1999) Crystal structure of a thwarted mismatch glycosylase DNA repair complex. *EMBO J* 18: 6599-6609
47. Saparbaev M, Laval J (1998) 3,N4-ethenocytosine, a highly mutagenic adduct, is a primary substrate for *Escherichia coli* double-stranded uracil-DNA glycosylase and human mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8508-8513
48. Bartsch H, Nair J (2000) Ultrasensitive and specific detection methods for exocyclic DNA adducts: markers for lipid peroxidation and oxidative stress. *Toxicology* 153: 105-114
49. Zhu B, Zheng Y, Hess D, Anglikler H, Schwarz S, Siegmund M, Thiry S, Jost JP (2000) 5-methylcytosine-DNA glycosylase activity is present in a cloned G/T mismatch DNA glycosylase associated with the chicken embryo DNA demethylation complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5135-5139
50. Waters TR, Gallinari P, Jiricny J, Swann PF (1999) Human thymine DNA glycosylase binds to apurinic sites in DNA but is displaced by human apurinic endonuclease 1. *J Biol Chem* 274: 67-74
51. Hardeland U, Steinacher R, Jiricny J, Schar P (2002) Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *EMBO J* 21: 1456-1464
52. Barrett TE, Savva R, Panayotou G, Barlow T, Brown T, Jiricny J, Pearl LH (1998) Crystal structure of a G:T/U mismatch-specific DNA glycosylase: mismatch recognition by complementary-strand interactions. *Cell* 92: 117-129
53. Pearl LH (2000) Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. *Mutat Res* 460: 165-181
54. Um S, Harbers M, Benecke A, Pierrat B, Losson R, Chambon P (1998) Retinoic acid receptors interact physically and functionally with the T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* 273: 20728-20736
55. Missero C, Pirro MT, Simeone S, Pischetola M, Di Lauro R (2001) The DNA glycosylase T:G mismatch-specific thymine DNA glycosylase

- represses thyroid transcription factor-1-activated transcription. *J Biol Chem* 276: 33569-33575
56. Bellacosa A (2001) Role of MED1 (MBD4) Gene in DNA repair and human cancer. *J Cell Physiol* 187: 137-144
 57. Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 401: 301-304
 58. Hendrich B, Bird A (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18: 6538-6547
 59. Bellacosa A, Cicchillitti L, Schepis F, Riccio A, Yeung AT, Matsumoto Y, Golemis EA, Genuardi M, Neri G (1999) MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3969-3974
 60. Hendrich B, Bird A (2000) Mammalian methyltransferases and methyl-CpG-binding domains: proteins involved in DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 249: 55-74
 61. Zhu B, Zheng Y, Angliker H, Schwarz S, Thiry S, Siegmund M, Jost JP (2000) 5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence. *Nucleic Acids Res* 28: 4157-4165
 62. Kovtun IV, McMurray CT (2007) Crosstalk of DNA glycosylases with pathways other than base excision repair. *DNA Repair (Amst)* 6: 517-529
 63. Duckett DR, Drummond JT, Murchie AI, Reardon JT, Sancar A, Lilley DM, Modrich P (1996) Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpC) adduct. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6443-6447
 64. Neddermann P, Gallinari P, Lettieri T, Schmid D, Truong O, Hsuan JJ, Wiebauer K, Jiricny J (1996) Cloning and expression of human G/T mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* 271: 12767-12774
 65. Cortellino S, Turner D, Masciullo V, Schepis F, Albino D, Daniel R, Skalka AM, Meropol NJ, Alberti C, Larue L, Bellacosa A (2003) The base excision repair enzyme MED1 mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15071-15076
 66. Rada C, Di Noia JM, Neuberger MS (2004) Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol Cell* 16: 163-171
 67. Batty D, Ropic-Otrin V, Levine AS, Wood RD (2000) Stable binding of human XPC complex to irradiated DNA confers strong discrimination for damaged sites. *J Mol Biol* 300: 275-290
 68. Sugawara K, Shimizu Y, Iwai S, Hanaoka F (2002) A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair (Amst)* 1: 95-107
 69. Shimizu Y, Iwai S, Hanaoka F, Sugawara K (2003) Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase. *EMBO J* 22: 164-173
 70. Tini M, Benecke A, Um SJ, Torchia J, Evans RM, Chambon P (2002) Association of CBP/p300 acetylase and thymine DNA glycosylase links DNA repair and transcription. *Mol Cell* 9: 265-277
 71. Metivier R, Gallais R, Tiffocche C, Le Peron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, Ibberson D, Barath P, Demay F, Reid G, Benes V, Jeltsch A, Gannon F, Salbert G (2008) Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452: 45-50

Uracil-DNA glycosylases

Dariusz Pytel^{1,2}, Artur Słupianek², Dominika Książek², Tomasz Skórski¹, Janusz Błasiak^{2,✉}

¹Department of Microbiology and Immunology Temple University School of Medicine, 3400 North Broad St., Philadelphia, PA 19140, USA

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

✉e-mail: januszbl@biol.uni.lodz.pl

Key words: uracil, DNA glycosylases, UDG, DNA damage, DNA repair

ABSTRACT

Uracil is one of four nitrogen bases, most frequently found in normal RNA. Uracil can be found also in DNA as a result of enzymatic or non-enzymatic deamination of cytosine as well as misincorporation of dUMP instead of dTMP during DNA replication. Uracil from DNA can be removed by DNA repair enzymes with apyrimidine site as an intermediate. However, if uracil is not removed from DNA a pair C:G in parental DNA can be changed into a T:A pair in the daughter DNA molecule. Therefore, uracil in DNA may lead to a mutation. Uracil in DNA, similarly to thymine, forms energetically most favorable hydrogen bonds with adenine, therefore uracil does not change the coding properties of DNA. Uracil in DNA is recognized by uracil DNA glycosylase (UDGs), which initiates DNA base excision repair, leading to removing of uracil from DNA and replacing it by thymine or cytosine, when arose as a result of cytosine deamination. Eukaryotes have at least four nuclear UDGs: UNG2, SMUG1, TDG i MBD4, while UNG1 operates in the mitochondrium. UNG2 is involved in DNA repair associated with DNA replication and interacts with PCNA and RPA proteins. Uracil can also be an intermediate product in the process of antigen-dependent antibody diversification in B lymphocytes. Enzymatic deamination of viral DNA by host cells can be a defense mechanism against viral infection, including HIV-1. UNG2, MBD4 and TDG glycosylases may cooperate with mismatch repair proteins and TDG can be involved in nucleotide excision repair system.

Plazmocytoidalne komórki dendrytyczne w patofizjologii procesów odpornościowych

STRESZCZENIE

Plazmocytoidalne komórki dendrytyczne (pDC) to unikalna populacja komórek dendrytycznych, morfologicznie przypominających komórki produkujące przeciwciała. Choć pDC stanowią bardzo niewielki odsetek wśród komórek krążących, są uważane za komórki o kluczowym znaczeniu w odpowiedzi przeciwwirusowej. Charakteryzują się wysokim poziomem ekspresji genów kodujących wewnątrzkomórkowe receptory Toll-podobne, TLR7 i TLR9. Receptory te rozpoznają jednoniciowy RNA wirusów oraz niemetylowane sekwencje wirusowego i bakteryjnego DNA, czego konsekwencją jest produkcja interferonu typu I, sztandarowej cytokiny tych komórek. W procesie dojrzewania, pDC nabywają charakteru typowych komórek dendrytycznych o dobrze wykształconym systemie wypustek i zdolności do prezentacji antygenów charakterystycznych dla limfocytów. Ich zdolność do efektywnej syntezy interferonu typu I oraz umiejętność prezentacji antygenów sprawia, że komórki te stanowią jedno z najważniejszych ogniw w systemie regulacji odpowiedzi odpornościowej organizmu. Jest to również przyczyna, dla której pDC stopniowo zajmują jedno z głównych miejsc w badaniach immunologicznych.

WPROWADZENIE

Komórki dendrytyczne (DC), jako komórki koordynujące procesy odpornościowe, znajdują się w centrum zainteresowania wielu dziedzin biologii. Wśród komórek dendrytycznych występujących u człowieka wyróżnia się dwa podstawowe typy, mieloidalne i plazmocytoidalne komórki dendrytyczne (odpowiednio mDC i pDC) [1]. Podczas gdy mieloidalne komórki dendrytyczne są stosunkowo dobrze opisane, znacznie mniej wiadomo na temat funkcji pDC. Najnowsze doniesienia wskazują na pDC jako komórki o bardzo dużym znaczeniu w regulacji odpowiedzi obronnej organizmu.

KOMÓRKI DENDRYTYCZNE JAKO DYRYGENCI PROCESÓW ODPORNOŚCIOWYCH

W odpowiedzi na zakażenie bakteryjne lub wirusowe dochodzi do aktywacji limfocytów. Limfocyty pierwotnie dojrzewają w szpiku kostnym i grasicy (odpowiednio limfocyty B i T). Wymienione populacje limfocytów przechodzą następnie końcowy etap dojrzewania pod wpływem swoistych antygenów. Proces ten zachodzi w śledzionie i węzłach chłonnych (wtórnych organach limfatycznych). Warunkiem tego etapu dojrzewania limfocytów jest otrzymanie „odpowiednich sygnałów” od komórek prezentujących antygen, wśród których centralne miejsce zajmują komórki dendrytyczne [1]. W trakcie zapalenia DC są ściągane do miejsc zakażenia przez „prozapalne” chemoatraktanty. Napływające komórki dendrytyczne potrafią rozpoznać komórki mikroorganizmów lub własne zmienione komórki jako „obce”, które następnie fagocytują a w dalszej kolejności przetwarzają rozpoznany materiał. W obwodowych narządach limfatycznych, do których przemieszczają się komórki dendrytyczne, pochłonięty materiał zostaje zaprezentowany limfocytom naiwnym (dziewiczym), które ulegają przekształceniu w komórki efektorowe. W odróżnieniu od limfocytów naiwnych, limfocyty efektorowe są wyposażone w cechy, które pozwalają na szybką reakcję na rozpoznawany antygen [1]. Jeśli w procesie prezentacji uczestniczą w pełni zaktywowane (dojrzałe) DC, to dojdzie do powstania swoistej odpowiedzi odpornościowej. Z kolei prezentacja antygenów przez „niedojrzałe” DC może doprowadzić do powstania tolerancji na prezentowany antygen. Proces napływania komórek dendrytycznych do wtórnych tkanek limfatycznych warunkuje powstanie odpowiedzi swoistej. Zasiadlanie węzłów chłonnych przez komórki dendrytyczne jest kontrolowane przez czynniki chemotaktyczne w większości wydzielane bezpośrednio przez komórki węzłów chłonnych; proces ten wymaga obecności na DC swoistych receptorów, takich jak CCR7 [2]. Zarysowany scenariusz udziału DC w wytworzeniu odpowiedzi swoistej dotyczy głównie mieloidalnych komórek dendrytycznych. Odkrycie pDC stawia nowe pytania dotyczące miejsca tych komórek w systemie obrony organizmu.

Paulina Kulig

Karolina Wawro

Joanna Cichy

Zakład Immunologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Zakład Immunologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; tel.: (012) 664 61 35, e-mail: Cichy@mol.uj.edu.pl

Artykuł otrzymano 17 marca 2008 r.
Artykuł zaakceptowano 17 lipca 2008 r.

Słowa kluczowe: immunologia, komórki dendrytyczne, alergia, toczeń, łuszczyca

Wykaz skrótów: DC – komórki dendrytyczne; mDC – mieloidalne komórki dendrytyczne; HEV – żyłka z wysokim śródbłonkiem; MHCII – główny kompleks zgodności tkankowej typu drugiego; pDC – plazmocytoidalne komórki dendrytyczne; PBMC – jednojądrzaste komórki krwi; SLE – układowy toczeń rumieniowaty

Podziękowania: Autorzy dziękują prof. dr hab. Juliuszowi Pryjmie z Zakładu Immunologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ za cenne wskazówki dotyczące niniejszej pracy. Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki 2P04A07629 i 9/FIR-CA/(2006)/0

CHARAKTERYSTYKA pDC

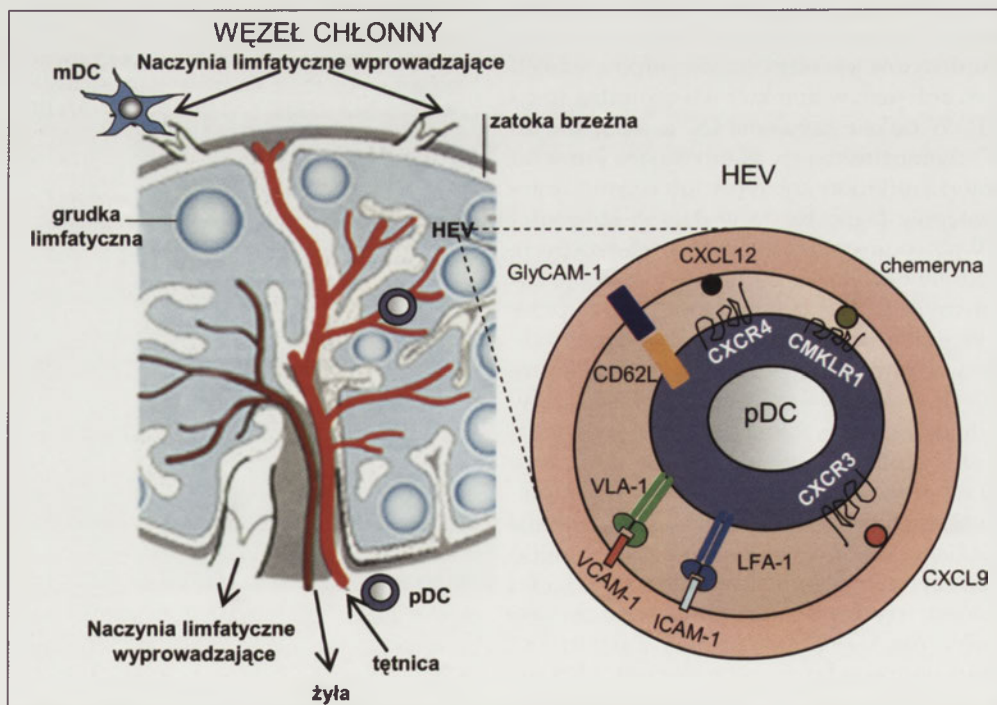
Plazmocytoidalne komórki dendrytyczne zawdzięczają swoją nazwę morfologicznemu podobieństwu do komórek produkujących przeciwciała, tzw. komórek plazmatycznych. Niedojrzałe pDC posiadają zaokrąglony regularny kształt, nerkowate jądro, zasadochłonna cytoplazmę oraz dobrze rozwiniętą szorstką siateczkę śródplazmatyczną, umożliwiającą komórkom pDC szybką i efektywną syntezę białek, głównie interferonu typu I [3]. Pod wpływem stymulacji, pDC przekształcają się w „profesjonalne” komórki dendrytyczne, co objawia się między innymi „nabyciem” charakterystycznej „dendrytycznej” morfologii, zwiększeniem poziomu cząsteczek MHC typu II na powierzchni oraz zdolnością do stymulacji naiwnych limfocytów [4].

Komórki pDC można wykryć głównie w narządach limfatycznych, a także we krwi. U człowieka stanowią one mniej niż 0,5% populacji jednojądrzastych komórek krążących w krwiobiegu [3]. pDC człowieka nie posiadają żadnych typowych znaczników charakteryzujących limfocyty B (CD19, CD20), limfocyty T (CD3), monocyty (CD14, CD16), komórki NK (CD56, CD16) lub mieloidalne komórki dendrytyczne (CD11c). Komórki pDC wyróżnia natomiast wysoki poziom syntezy L-selektyny, CD45RA, CD4 oraz CD123 [5]. Ten ostatni znacznik jest często wykorzystywany w połączeniu ze znacznikiem BDCA-2 do identyfikacji pDC człowieka. Ze względu na fakt, że synteza BDCA-2, lektyny, zaangażowanej w proces wiązania i internalizacji antygenów, jest zależna od stopnia zróżnicowania pDC, do identyfikacji pDC stosuje się również białko z rodziny semaforyn, BDCA-4 [6]. U myszy, które są często wykorzystywane w badaniach immunologicznych, pDC definiuje się w oparciu o syntezę kilku znaczników powierzchniowych, takich jak CD11c, Ly6C lub zamiennie Gr-1, B220 i PDCA-1 (ang. *plasmacytoid dendritic cells antigen-1*). pDC myszy, w

odróżnieniu od pDC człowieka, posiadają na swojej powierzchni antygen charakterystyczny dla mieloidalnych komórek dendrytycznych, CD11c. Jednakże poziom syntezy tego antygeny jest znacznie niższy w porównaniu z mDC. Coraz częściej do identyfikacji pDC u myszy stosuje się przede wszystkim PDCA-1, który jest uważany za jeden z najbardziej swoistych znaczników tych komórek [7]. Dokładne pochodzenie pDC jest przedmiotem kontrowersji. Początkowo zakładano, że pDC są pochodzenia limfoidalnego. Jednak wyniki najnowszych badań wskazują, że pDC mogą różnicować zarówno z mieloidalnych, jak i limfoidalnych komórek progenitorowych [8].

MIGRACJA pDC

Średni okres życia mysich plazmocytoidalnych komórek dendrytycznych wynosi 2 tygodnie [9]. W warunkach prawidłowych pDC, w odróżnieniu od mieloidalnych komórek dendrytycznych, raczej nie spotyka się w tkankach „pozalimfatycznych”. Warto jednak podkreślić, że dotyczy to przede wszystkim skóry, która jest częstym obiektem badań w kontekście roli pDC w regulacji odpowiedzi obronnej. Jednakże w stanach zapalnych, towarzyszących takim chorobom, jak toczeń rumieniowaty, łuszczyca, a także nowotwory, często obserwuje się nacieki plazmocytoidalnych komórek dendrytycznych w tkankach obwodowych [10-12]. Napływ mDC oraz limfocytów do wtórnych narządów limfatycznych inicjuje kaskadę procesów, których konsekwencją jest powstanie odporności lub tolerancji na dany antygen. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy droga migracji pDC do węzłów chłonnych jest podobna do drogi migracji dziewiczych limfocytów T, ale zupełnie odmienna od wędrówki klasycznych mieloidalnych komórek dendrytycznych. Te ostatnie dostają się do drenujących tkanki obwodowe węzłów chłonnych przez wprowadzające naczynia limfatyczne [2]. Tą samą drogą z tkanek obwodowych objętych zapaleniem, mogą napływać do węzłów patogeny. Tymczasem pDC do obwodowych tkanek limfatycznych migrują bezpośrednio z krwi przez naczynia wyścielone tzw. wysokim śródbłonkiem HEV (ang. *high endothelial cell venule*) i sytuują się w obszarach zasiedlanych przez limfocyty T, które jak wspomniano, są „rekrutowane” do węzłów chłonnych tą samą drogą, tj. przez HEV [13] (Ryc. 1). Niedojrzałe pDC posiadają na swojej powierzchni nie tylko dużą ilość L-selektyny, która wzorem limfocytów dziewiczych najprawdopodobniej uczestniczy również we wczesnych etapach adhezji pDC do HEV, ale także szeroki repertuar receptorów dla chemokin, które mogą pośredniczyć w migracji pDC do węzłów chłonnych w stanie homeostazy lub w stanach



Rycina 1. Najważniejsze cząsteczki uczestniczące w migracji pDC do węzłów chłonnych.

zapaleniem, mogą napływać do węzłów patogeny. Tymczasem pDC do obwodowych tkanek limfatycznych migrują bezpośrednio z krwi przez naczynia wyścielone tzw. wysokim śródbłonkiem HEV (ang. *high endothelial cell venule*) i sytuują się w obszarach zasiedlanych przez limfocyty T, które jak wspomniano, są „rekrutowane” do węzłów chłonnych tą samą drogą, tj. przez HEV [13] (Ryc. 1). Niedojrzałe pDC posiadają na swojej powierzchni nie tylko dużą ilość L-selektyny, która wzorem limfocytów dziewiczych najprawdopodobniej uczestniczy również we wczesnych etapach adhezji pDC do HEV, ale także szeroki repertuar receptorów dla chemokin, które mogą pośredniczyć w migracji pDC do węzłów chłonnych w stanie homeostazy lub w stanach

zapalnych. Oprócz CCR7, swego rodzaju „kierunkowskazu” wskazującego drogę limfocytom, a także mieloidalnym komórkom dendrytycznym do węzłów chłonnych, pDC syntetyzują CXCR4, a także CXCR3 i CCR5, które stanowią receptory dla chemokin pojawiających się na HEV podczas zapalenia [14]. Ponadto, cechą charakterystyczną niedojrzałych pDC jest synteza receptora CMKLR1, który oddziałuje z chemoatraktantem chemeryną [15,16]. Zarówno GlyCAM-1 i CD34 (ligandy dla L-selektyny), jak i CXCL12 (ligand dla CXCR4) oraz chemeryna (ligand dla receptora CMKLR1), są prezentowane na powierzchni HEV. Ponadto, pojawiający się we krwi w wyniku systemowego zakażenia TNF- α wpływa na wzrost syntezy CXCL9, ligandu dla receptora CXCR3 na powierzchni HEV [13]. Badania *in vitro* pokazały, że równoległa aktywacja receptorów CXCR3 i CXCR4 na pDC zwiększa właściwości chemotaktyczne tych komórek [17]. Ponieważ ligandy dla CXCR4 ulegają konstytutywnej syntezie na powierzchni HEV, natomiast stan zapalny indukuje produkcję chemokin rozpoznawanych przez CXCR3, wydaje się prawdopodobne, że pDC migrują z krwi do węzła przy udziale obu tych komponentów. Uważa się, że stymulacja komórek pDC ligandami dla receptora CXCR3 uwrażliwia komórkę na niższe stężenia ligandów dla receptora CXCR4 i w ten sposób zwiększa właściwości chemotaktyczne pDC. Wyniki najnowszych badań wskazują, że integryny LFA-1 oraz VLA-1, które są eksponowane na powierzchni pDC, są zaangażowane w migrację pDC do zapalnych węzłów chłonnych (Ryc. 1). Ligandy dla integryny LFA-1, takie jak ICAM-1 oraz ICAM-2, ulegają konstytutywnej syntezie na powierzchni HEV, natomiast ligandy dla integryny VLA-1, takie jak VCAM-1, są indukowane na powierzchni HEV pod wpływem zapalenia [18].

KOMÓRKI pDC JAKO „ŹRÓDŁO” CYTOKIN REGULUJĄCYCH ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNĄ

Jedną z najbardziej charakterystycznych cech pDC jest zdolność do szybkiej produkcji interferonu α oraz β (IFN α/β), które są zaliczane do rodziny interferonów typu I. Interferony typu I są syntetyzowane przez szereg komórek pod wpływem zakażenia wirusowego. Ich główną funkcją jest wprowadzenie komórek gospodarza w „stan oporności” przeciwko wirusowi. Pod wpływem IFN typu pierwszego komórki syntetyzują szereg czynników, które zapobiegają replikacji wirusa [19]. Pomimo tego, że większość zakażonych komórek może produkować IFN α/β , pDC są uważane za głównych producentów IFN α/β w organizmie, a zarazem kluczowe komórki zaangażowane w inicjację reakcji przeciwvirusowej. Komórka pDC może wyprodukować od 3 do 10 pg IFN α w 24 godziny po stymulacji wirusem, co wskazuje, że pDC jest od 100 do 1000 razy bardziej efektywna niż inne komórki syntetyzujące interferon typu I [3]. Komórki pDC dzięki temu, że posiadają receptory Toll-podobne, TLR7 i TLR9, rozpoznają wirusowy jednoniciowy RNA (ssRNA) oraz sekwencje oligonukleotydowe bogate w pary CpG, występujące w wirusowym oraz bakteryjnym DNA. Zarówno TLR7, jak i TLR9 są zlokalizowane w endosomach [20]. Aktywacja tych receptorów uruchamia program produkcji IFN α/β . Poprzez wydzielanie IFN α/β , pDC regulują, między innymi, dojrzewanie mieloidalnych komórek dendrytycznych. Pod wpływem IFN α/β mDC syntetyzują cytokinę IL12,

która jest zaangażowana w rozwój limfocytów Th1 wspierających tzw. odpowiedź komórkową [21].

Obok IFN typu I, kolejną charakterystyczną cytokiną produkowaną przez pDC jest IL-6. IL6 obok IFN α/β jest zaangażowana w różnicowanie limfocytów B do komórek plazmatycznych produkujących przeciwciała [22]. Jednak w odróżnieniu od IFN α/β uwalnianego przez pDC natychmiast po zakażeniu wirusowym, IL6 jest wydzielana przez dojrzałe komórki dendrytyczne. Działanie pDC jako induktorów produkcji przeciwciał nie wymaga bezpośredniego kontaktu pDC z limfocytami B, ale odbywa się poprzez produkcję cytokin, odpowiednio IFN α/β i IL-6 [23].

KOMÓRKI pDC JAKO KOMÓRKI PREZENTUJĄCE ANTYPGEN

Przypuszcza się, że w ciągu pierwszych 24 godzin od momentu zakażenia wirusowego, pDC są głównie zaangażowane w syntezę IFN typu I. Jednakże, w kolejnych etapach zakażenia, pDC zazwyczaj dojrzewają w kierunku profesjonalnych komórek prezentujących antypgen. Niedojrzałe pDC charakteryzują się niską zawartością cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej typu drugiego (MHCII) na powierzchni oraz cząsteczek pomocniczych, takich jak CD80 czy CD86 [24]. Jednakże zaktywowane, dojrzałe pDC przekształcają się w profesjonalne komórki prezentujące antypgen, które są w stanie różnicować limfocyty T CD4 zarówno w kierunku limfocytów efektorowych typu Th1, jak i Th2 [3]. W odróżnieniu od limfocytów Th1, wspomagających np. zabójcze funkcje makrofagów lub cytotoksycznych limfocytów T CD8, limfocyty Th2 wpierają tzw. odpowiedź humoralną, opartą na produkcji przeciwciał przez limfocyty B.

Wpływ pDC na polaryzację limfocytów T CD4 w kierunku Th1 lub Th2 jest najprawdopodobniej pochodną działania różnych czynników aktywujących pDC. Czynniki te mogą stymulować odmienne „programy dojrzewania” plazmocytoidalnych komórek dendrytycznych. Dla przykładu, INF α oraz TNF α wpływają na różnicowanie pDC w taki sposób, który prowadzi do polaryzacji limfocytów T CD4 w kierunku Th1 [25]. Z kolei stymulacja plazmocytoidalnych komórek dendrytycznych ligandem dla CD40 oraz IL3, cytokiną produkowaną przez takie komórki, jak bazofile czy eozynofile podczas zakażeń pasożytami, sprawia, że pDC dojrzewają i stymulują limfocyty T do różnicowania w kierunku limfocytów typu Th2 [26]. Ten ostatni przykład wskazuje, że komórki pDC mogą mieć udział nie tylko w rozwoju swoistej odpowiedzi skierowanej przeciwko wirusom, ale także przeciwko pasożytom.

UDZIAŁ pDC W STYMULACJI ODPORNOŚCI I W TOLERANCJI IMMUNOLOGICZNEJ

W odpowiedzi przeciwvirusowej, w której pDC bez wątpienia pełnią funkcję stymulującą powstanie odporności, na pierwszy plan wysuwa się wpływ pDC na mieloidalne komórki dendrytyczne. Wykorzystując myszy model skórny zakażenia wirusem opryszczki (HSV-1) pokazano, że w ciągu dwóch dni od momentu podania wirusa, pDC migrują z krwi do objętego zapaleniem węzła chłonnego, gdzie sytu-

ują się w bliskim sąsiedztwie mDC. Co ważniejsze, obecność pDC w węzle chłonny jest niezbędna do rozwoju przeciwwirusowych cytotoksycznych limfocytów T. Komórki pDC poprzez bezpośredni kontakt z mieloidalnymi komórkami dendrytycznymi węzła, jak również syntezę IFN α , dostarczają komórkom mDC „sygnałów” niezbędnych do rozwoju odpowiedzi cytotoksycznej. Zablokowanie oddziaływania pomiędzy pDC a mDC prowadzi do zahamowania rozwoju limfocytów T cytotoksycznych. Wyniki badań *in vitro* wykazały ponadto, że integryna LFA-2 oraz cząsteczka pomocnicza CD40L, które są ekspozowane na powierzchni dojrziałych komórek pDC, są zaangażowane w proces adhezji komórek pDC do mDC [27]. W opisanym przykładzie, pDC aktywują odpowiedź odpornościową. Jednakże, pojawiają się również doniesienia wskazujące na udział niedojrzałych plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych w różnicowaniu dziewiczych limfocytów T w kierunku komórek regulatorowych, czyli hamujących odpowiedź immunologiczną [28,29]. Jednym z przykładów hamującego działania pDC na układ obronny jest, opisane poniżej, zaangażowanie tych komórek w utrzymanie tolerancji immunologicznej w stosunku do wdychanych alergenów.

Wyniki najnowszych badań wskazują ponadto, że pDC odgrywają ważną rolę w „akceptacji” alogenicznych przeszczepów sercowo-naczyniowych przez organizm biorcy. Komórki pDC pobierają alloantygeny z przeszczepionej tkanki, a następnie migrują do lokalnych węzłów chłonnych, gdzie stymulują powstanie regulatorowych limfocytów T. Usunięcie komórek pDC bądź zablokowanie ich migracji do węzłów chłonnych prowadzi do utraty tolerancji w stosunku do przeszczepionej tkanki [30].

Pośród znanych mechanizmów wykorzystywanych przez komórki pDC do hamowania reakcji odpornościowej można zaliczyć i) mechanizm oparty na metabolizmie tryptofanu oraz, ii) polaryzację limfocytów T w kierunku komórek regulatorowych przy udziale cząsteczki ICOS-L (ang. *inducible costimulator ligand*).

W pierwszym przypadku syntetyzowany między innymi bezpośrednio przez pDC enzymIDO (ang. *indoleamine 2,3-dioxygenase*), przyczynia się do degradacji tryptofanu, który jako niezbędny aminokwas musi być stale obecny w środowisku komórek. Drugi z mechanizmów hamowania odpowiedzi obronnej przez pDC oparty jest na zależnym od cząsteczki ICOS-L powstawaniu limfocytów T o właściwościach regulatorowych. Świeżo izolowane z krwi komórki pDC charakteryzuje niski poziom ICOS-L na powierzchni. Jednakże, synteza ICOS-L wzrasta pod wpływem aktywacji pDC. ICOS (ang. *inducible costimulator*), cząsteczka pomocnicza należąca do tej samej rodziny co CD28, a zarazem receptor dla ICOS-L, ulega ekspozycji na powierzchni zaktwowanych limfocytów T. Stymulacja limfocytów T za pomocą ICOS-L polaryzuje limfocyty T w kierunku komórek wykazujących cechy charakterystyczne dla komórek regulatorowych. Takie limfocyty słabo proliferują w odpowiedzi na stymulację swoistym antygenem, natomiast hamują proliferację autologicznych dziewiczych limfocytów T [31].

Podsumowując, istnieje wiele danych pokazujących, że komórki pDC w znaczącym stopniu przyczyniają się do

rozwoju odpowiedzi przeciwwirusowej. Syntetyzując prozapalne cytokiny, takie jak IFN typu pierwszego lub IL6, pDC aktywują komórki układu immunologicznego, takie jak mieloidalne komórki dendrytyczne czy limfocyty B. Jednak w sytuacji, gdy dojrzała komórka pDC funkcjonuje jako komórka prezentująca antygen, jest wysoce prawdopodobne, że reakcja odpornościowa zostanie wygaszona między innymi poprzez indukowane przez pDC limfocyty T regulatorowe. Obserwacja, że dojrzałe komórki pDC stymulują powstanie regulatorowych limfocytów T, odróżnia je od komórek mDC, które tylko w formie niedojrzałej mogą polaryzować limfocyty T w kierunku komórek regulatorowych [32]. Ta różnica może wskazywać na immunoregulacyjną rolę komórek pDC w trakcie zapalenia.

KOMÓRKI pDC A ALERGIA

Zaburzenie równowagi pomiędzy pDC i mDC najprawdopodobniej odgrywa ważną rolę w powstawaniu stanu zapalnego obserwowanego w astmie [33]. W porównaniu do usytuowanych w płucach pDC, płucne mDC wydają się być bardziej dojrzałe, gdyż wykazują syntezę, między innymi, CD80, CD86 czy MHCII na wyższym poziomie niż pDC. Te różnice w produkcji markerów powierzchniowych zaangażowanych w prezentację antygeny i kostymulację limfocytów T są interesujące ze względu na to, że mogą odzwierciedlać różne funkcje pełnione przez poszczególne typy komórek dendrytycznych. Postuluje się, że niedojrzałe pDC w płucach są odpowiedzialne raczej za tolerogenną odpowiedź immunologiczną, natomiast bardziej dojrzałe mDC miałyby głównie uczestniczyć w zapoczątkowaniu swoistej odpowiedzi immunologicznej w płucach [34].

Istnieją również dowody na to, że immunoregulacyjne działanie pDC w płucach chroni przed rozwojem procesu zapalnego dróg oddechowych w odpowiedzi na nieszkodliwe antygeny. Wykazano obecność pDC w płucach myszy, które produkują znaczne ilości IFN α pod wpływem stymulacji oligodeoksynukleotydami CpG. Te komórki zdolne są do pobierania całego antygeny, podanej drogą wziewną owoalbuminy sprzężonej z FITC, który następnie transportują do drenujących płuca śródpiersiowych węzłów chłonnych. Inhalacja nieszkodliwym antygenem myszy, które zostały wcześniej pozbawione pDC, prowadzi do rozwoju objawów charakterystycznych dla astmy. Podanie komórek pDC do organizmu, z którego zostały usunięte, zapobiega powstaniu choroby. Wspomniane wyniki sugerują, że w obecności pDC dochodzi do indukcji tolerancji na wdychany alergen. Tolerogenne działanie pDC prawdopodobnie polega na hamowaniu powstawania funkcji efektorowych w dziewiczych limfocytach T, które ulegają namnażaniu w odpowiedzi na antygen prezentowany przez mDC. Wskazuje na to fakt, że w przypadku braku pDC obserwuje się znaczny wzrost produkowanych przez limfocyty T cytokin efektorowych (IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ), natomiast nie ma wyraźnych różnic w namnażaniu się limfocytów T pomiędzy osobnikami posiadającymi pDC i osobnikami, z których usunięto te komórki [35]. Dokładny mechanizm tego zjawiska nie jest znany, ale dane pochodzące zarówno z badań *in vitro*, jak i *in vivo* sugerują, że pDC bezpośrednio oddziałują z mDC, znosząc ich potencjał do tworzenia limfocytów T efektorowych. Komórki pDC mogą także stymulować po-

wstawanie limfocytów regulatorowych T, prawdopodobnie na drodze zależnej od ICOS-L [33].

Pomimo dowodów pochodzących z badań prowadzonych na zwierzętach, wskazujących na antyalergiczne właściwości pDC, rola tych komórek w przebiegu astmy u ludzi wciąż pozostaje niejasna. Wykazano, że stymulacja alergenem powoduje wyraźny napływ zarówno pDC, jak i mDC z krwi obwodowej do płuc pacjentów z astmą. Sugeruje to, że nie tylko mDC, ale także pDC mogą być odpowiedzialne za patogenezę astmy u ludzi [36].

KOMÓRKI pDC W CHOROBACH AUTOIMMUNIZACYJNYCH

O znaczeniu regulacji odpowiedzi odpornościowej przez pDC mogą świadczyć choroby autoimmunizacyjne, takie jak toczeń rumieniowaty lub łuszczyca, u podłoża których leży brak prawidłowego działania tych komórek. Toczeń rumieniowaty układowy (SLE, ang. *systemic lupus erythematosus*), to systemowa choroba, polegająca na skierowaniu odpowiedzi immunologicznej przeciwko własnym tkanom, takim jak nerki, centralny układ nerwowy czy skóra. Choroba rozwija się wskutek złożonych zaburzeń układu immunologicznego, prowadzących do przewlekłego stanu zapalnego w wielu narządach, który często kończy się śmiercią. Jednym z symptomów choroby jest podwyższone w surowicy miano IFN typu pierwszego oraz auto-przeciwciał skierowanych przeciwko własnemu DNA [37]. Etiologia tocznia nie jest jeszcze w pełni poznana. W jego powstaniu mogą uczestniczyć różne czynniki, w tym zakażenia wirusowe, które być może stanowią czynnik wyzwalający nadmierną produkcję IFN α/β . Postuluje się także, że kompleksy immunologiczne złożone z DNA pochodzącego prawdopodobnie z własnych komórek apoptotycznych i z DNA-reaktywnych auto-przeciwciał, mogą stymulować pDC do produkcji IFN α/β [37]. Leukocyty pacjentów cierpiących na SLE wykazują podwyższoną ekspresję genów indukowanych przez IFN typu pierwszego. Taki „interferonowy odcisk palca” dobrze zależy od stopnia nasilenia choroby. Komórki pDC są uważane za głównych producentów IFN α/β w układowym toczniu rumieniowatym. Ich nagromadzenie obserwuje się w skórze objętej zmianami chorobowymi osób cierpiących na SLE.

W stanie homeostazy niedojrzałe mDC wychwytyują ciała apoptotyczne i prezentują ich autoantygeny autoreaktywnym limfocytom bez udziału cząsteczek pomocniczych co powoduje, że limfocyty te ulegają apoptozie. U ludzi posiadających predyspozycję do SLE często dochodzi do nadprodukcji IFN α/β utrzymującej się przez dłuższy czas, która prowadzi do aktywacji niedojrzałych mDC. Konsekwencją stymulacji mDC przez IFN α/β jest aktywacja autoreaktywnych limfocytów T, co sprzyja rozwojowi autoreaktywnych limfocytów B. IFN α/β działa nie tylko na mDC, ale także bezpośrednio na limfocyty, umożliwiając m.in. różnicowanie limfocytów B w komórki plazmatyczne produkujące auto-przeciwciała, które tworzą zawierające kwasy nukleinowe kompleksy immunologiczne [37].

Drugim przykładem choroby o podłożu autoimmunologicznym, w której kluczową funkcję pełnią pDC, jest łuszczyca. Ta choroba skóry, również charakteryzuje się przewlekłym stanem zapalnym, za który odpowiedzialne są przede wszystkim efektorowe limfocyty CD8 oraz limfocyty CD4 o profilu Th1, jak również wydzielane przez nie cytokiny, takie jak TNF α czy IFN γ . Pod względem klinicznym łuszczycę charakteryzuje wzmożona proliferacja i różnicowanie keratynocytów w naskórku, co objawia się zaróżowionymi, płaskimi, grudkami, pokrytymi srebrzystą nawarstwiającą się łuską. Komórki pDC, a zwłaszcza produkowany przez nie IFN α , wydaje się mieć strategiczne znaczenie dla rozwoju łuszczycy [38]. Tak jak w przypadku tocznia, u pacjentów cierpiących na łuszczycę pokazano masywne nacieki pDC w skórze zmienionej chorobowo. Jednakże, jeśli w toczniu głównym czynnikiem uruchamiającym lub nasilającym produkcję IFN α są kompleksy immunologiczne zawierające DNA gospodarza, w przypadku łuszczycy rolę taką wydają się odgrywać kompleksy własnego DNA z peptydem antybakteryjnym LL37 [38]. Jak uprzednio wspomniano, pDC dzięki temu, że posiadają receptory TLR7 i TLR9, są zdolne do rozpoznawania wirusowych bądź bakteryjnych kwasów nukleinowych. Komórki pDC normalnie nie odpowiadają na genomowe DNA człowieka, jednakże w skórze objętej łuszczycą dochodzi do lokalnej aktywacji pDC pod wpływem własnego DNA. Skórę zdrową od skóry objętej zmianami łuszczycowymi od-

Tabela 1. Najważniejsze różnice pomiędzy komórkami dendrytycznymi człowieka [3,32].

	pDC	mDC (forma niedojrzała)
Fenotyp		
Morfologia	komórki przypominające komórki plazmatyczne	komórki o typowej dendrytycznej morfologii
Markery powierzchniowe służące do identyfikacji komórek we frakcji PBMC	CD123, BDCA-2	CD11c
Obecność receptorów Toll-podobnych	TLR7, TLR9	TLR1-6, TLR8, TLR10
Funkcje		
Obecność cytokin	IFN α/β	IL12
Stymulacja regulatorowych limfocytów T	w formie dojrzałej	w formie niedojrzałej
Zdolność do fagocytozy	słaba	silna

różnia obecność w tej ostatniej antybakteryjnego peptydu LL37, jedyne występującego u ludzi przedstawiciela rodziny katelicydyn – kationowych antybakteryjnych peptydów ulegających ekspresji w uszkodzonej skórze i działających jako naturalne antybiotyki. LL37, który strukturalnie przypomina kationowe, amfipatyczne peptydy stosowane do transfekcji komórek, gdy jest podany wraz z genomowym DNA człowieka, indukuje pDC do produkcji IFN α . Zatem peptyd LL37 sprawia, że własne DNA, normalnie niezdolne do stymulacji pDC, staje się silnym aktywatorem tych komórek. LL37 tworzy z DNA kompleks, w którego utrzymaniu istotną rolę odgrywają oddziaływania jonowe, zachodzące pomiędzy anionowymi grupami fosforanowymi DNA, a kationowymi aminokwasami w obrębie LL37. Związanie DNA przez LL37 indukuje także agregację cząsteczek DNA. Kompleks LL37-DNA aktywuje pDC poprzez receptor TLR9. Uważa się, że wewnątrzkomórkowe umiejscowienie TLR9 w endosomach stanowi formę zabezpieczenia przed stymulacją własnym DNA, a jednocześnie ułatwia rozpoznanie DNA wirusowego bądź bakteryjnego, które jest uwalniane do endosomów, w trakcie zakażenia. Do przełamania wrodzonej tolerancji dochodzi, ponieważ LL37 umożliwia własnemu DNA przedostanie się do przedziałów endosomalnych. Stymulacja TLR9 może prowadzić albo do produkcji IFN α , jeśli zachodzi we wczesnych endosomach, albo do produkcji TNF α i IL6 oraz dojrzewania pDC, jeśli zachodzi w późnych endosomach. Kompleks LL37 z DNA selektywnie indukuje „transmisję” sygnału przez TLR9 we wczesnych endosomach i stymuluje pDC do produkcji znacznych ilości IFN α . Podsumowując, zdolność LL37 do przekształcenia własnego DNA w czynnik silnie stymulujący produkcję IFN α , zależy od jego zdolności do agregacji i zatrzymania DNA wewnątrz wczesnych przedziałów endosomalnych, umożliwiając w ten sposób selektywną i długotrwałą aktywację TLR9 we wczesnych endosomach [38].

PODSUMOWANIE

Przedstawiony opis komórek pDC wskazuje na wyraźne różnice pomiędzy tą populacją komórek a mieloidalnymi komórkami dendrytycznymi. Najlepiej udokumentowane różnice pomiędzy pDC i mDC człowieka zamieszczono w Tabeli 1. Pomimo tego że istniejące doniesienia wskazują na pDC, jako na komórki o istotnym znaczeniu w odpowiedzi przeciwvirusowej i ważnym przyczynku do rozwoju niektórych chorób autoimmunizacyjnych, informacje na temat pDC są ciągle fragmentaryczne. Jednakże, unikalne cechy pDC, takie jak „reaktywność” na niektóre sekwencje DNA, sprawia, że gruntowna wiedza na temat tej populacji komórek może zaowocować nowym spojrzeniem na regulację funkcji układu obronnego organizmu.

PIŚMIENNICTWO

- Steinman RM, Banchereau J (2007) Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449: 419-426
- Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, Blankenstein T, Henning G, Forster R (2004) CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 21: 279-288
- Liu YJ (2005) IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23: 275-306
- Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ (1997) The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185: 1101-1111
- Barchet W, Cella M, Colonna M (2005) Plasmacytoid dendritic cells—virus experts of innate immunity. *Semin Immunol* 17: 253-261
- Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J (2000) BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165: 6037-6046
- Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionek A, Pingel JT, Orihuela MM, Akira S, Yokoyama WM, Colonna M (2004) TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21: 107-119
- Wang YH, Liu YJ (2004) Mysterious origin of plasmacytoid dendritic cell precursors. *Immunity* 21: 1-2
- Kamath AT, Henri S, Battye F, Tough DF, Shortman K (2002) Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 100: 1734-1741
- Vermi W, Bonecchi R, Facchetti F, Bianchi D, Sozzani S, Festi S, Berenzi A, Cella M, Colonna M (2003) Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol* 200: 255-268
- Vermi W, Riboldi E, Wittamer V, Gentili F, Luini W, Marrelli S, Vecchi A, Franssen JD, Communi D, Massardi L (2005) Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *J Exp Med* 201: 509-515
- Wollenberg A, Wagner M, Gunther S, Towarowski A, Tuma E, Morderer M, Rothenfusser S, Wetzel S, Endres S, Hartmann G (2002) Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 119: 1096-1102
- Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Nishiwaki T, Kitabatake M, Ueha S, Narumi S, Morikawa S, Ezaki T, Lu B (2004) Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* 16: 915-928
- Barchet W, Blasius A, Cella M, Colonna M (2005) Plasmacytoid dendritic cells: in search of their niche in immune responses. *Immunol Res* 32: 75-83
- Kulig P, Zabel BA, Dubin G, Allen SJ, Ohshima T, Potempa J, Handel TM, Butcher EC, Cichy J (2007) Staphylococcus aureus-derived staphopain B, a potent cysteine protease activator of plasma chemerin. *J Immunol* 178: 3713-3720
- Zabel BA, Silverio AM, Butcher EC (2005) Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. *J Immunol* 174: 244-251
- Vanbervliet B, Bendriss-Vermare N, Massacrier C, Homey B, de Bouteiller O, Briere F, Trinchieri G, Caux C (2003) The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J Exp Med* 198: 823-830
- Diacovo TG, Blasius AL, Mak TW, Cella M, Colonna M (2005) Adhesive mechanisms governing interferon-producing cell recruitment into lymph nodes. *J Exp Med* 202: 687-696
- Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH (2005) Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 23: 307-336
- Takeuchi O, Akira S (2007) Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol Rev* 220: 214-224
- Ito T, Amakawa R, Inaba M, Ikehara S, Inaba K, Fukuhara S (2001) Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *J Immunol* 166: 2961-2969

22. Poeck H, Wagner M, Battiany J, Rothenfusser S, Wellisch D, Hornung V, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G (2004) Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* 103: 3058-3064
23. Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J (2003) Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19: 225-234
24. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ (2004) Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5: 1219-1226
25. Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ (2000) Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 192: 219-226
26. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ (1999) Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283: 1183-1186
27. Yoneyama H, Matsuno K, Toda E, Nishiwaki T, Matsuo N, Nakano A, Narumi S, Lu B, Gerard C, Ishikawa S (2005) Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *J Exp Med* 202: 425-435
28. Kadowaki, Liu YJ (2002) Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 63: 1126-1132
29. Martin P, Del Hoyo GM, Anjuere F, Arias CF, Vargas HH, Fernandez LA, Parrillas V, Ardavin C (2002) Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type I interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* 100: 383-390
30. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, Angeli V, Li Y, Boros P, Ding Y (2006) Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 7: 652-662
31. Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA, Qin XF, Liu YJ, Gilliet M (2007) Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* 204: 105-115.
32. Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarolo MG (2005) Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 105: 1162-1169
33. Kool M, Lambrecht BN (2007) Dendritic cells in asthma and COPD: opportunities for drug development. *Curr Opin Immunol* 19: 701-710
34. Demedts IK, Brusselle GG, Vermaelen KY, Pauwels RA (2005) Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 177-184
35. de Heer HJ, Hammad H, Soullie T, Hijdra D, Vos N, Willart MA, Hogsteden HC, Lambrecht BN (2004) Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* 200: 89-98
36. Bratke K, Lommatzsch M, Julius P, Kuepper M, Kleine HD, Luttmann W, Christian Virchow J (2007) Dendritic cell subsets in human bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge. *Thorax* 62: 168-175
37. Banchereau J, Pascual V (2006) Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 25: 383-392
38. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, Cao W, Wang YH, Su B, Nestle F (2007) Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449: 564-569

Plasmacytoid dendritic cells in pathophysiology of immune responses

Paulina Kulig, Karolina Wawro, Joanna Cichy 

Department of Immunology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, 7 Gronostajowa St., Krakow, Poland

e-mail: Cichy@mol.uj.edu.pl

Key words: immunology, dendritic cells, allergy, lupus, psoriasis

ABSTRACT

Plasmacytoid dendritic cells (pDC), so named because of histological similarities to antibody-producing plasma cells, comprise a unique dendritic cell population. Despite their low numbers in blood they play a key role in anti-viral immunity, mainly through secreting massive amounts of type I interferon following an engagement of their Toll-like receptors, such as TLR7 and TLR9, by viral nucleic acids. In a mature state, pDC display a propensity to present antigens to naive lymphocytes. Through their unique potential to rapidly and efficiently secrete type I interferon and serve as antigen presenting cells, pDC are currently considered as one of the major regulators of immune responses.

Kinazy Src w procesie dojrzewania progenitorów megakariocytów

Joanna Kamińska[✉]

Edyta Klimczak-Jajor

Urszula Bany-Łaszewicz

Zakład Biochemii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

[✉] Zakład Biochemii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa; tel.: (022) 849 36 51 wew. 153, e-mail: jokam@ihit.waw.pl

Artykuł otrzymano 23 lipca 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 17 października 2008 r.

Słowa kluczowe: kinazy Src, megakariocytopoeza, megakariocyt, inhibitor kinaz Src

Wykaz skrótów: CFU-Mk (ang. *colony forming unit-megakaryocyte*) – komórki tworzące kolonie megakariocytowe; Mk – megakariocyt(y); TPO – trombopoetyna; c-Mpl – receptor TPO; SCF (ang. *stem cell factor*) – czynnik komórek macierzystych; PBS – przewleka białaczka szpikowa

Podziękowanie: Autorki dziękują Panu Robertowi Ziętkowi za opracowanie graficzne rycin

STRESZCZENIE

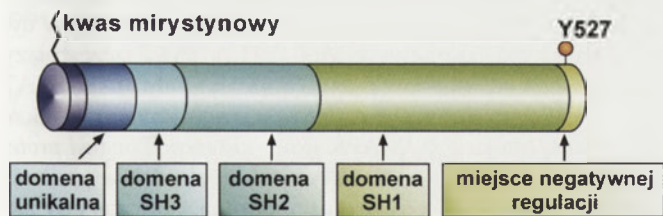
Białka z rodziny kinaz tyrozynowych Src pełnią kluczową rolę w morfologii, proliferacji, ruchliwości i przeżyciu komórek w procesie megakariocytopoezy. W megakariocytach (Mk) wykazano obecność sześciu kinaz Src – Fyn, Lyn, Fgr, Hck, Src i Yes. Kinazy Src uczestniczą w regulacji megakariocytopoezy indukowanej trombopoetyną. Inhibitory kinaz Src mogą być użyteczne jako czynniki indukujące dojrzewanie megakariocytów. Doświadczenia z wykorzystaniem inhibitorów kinaz Src, prowadzone w hodowli progenitorów megakariocytów oraz linii komórkowych o potencjale megakariocytów umożliwiły poszerzenie wiedzy na temat udziału enzymów w rozwoju megakariocytów. Stosowane inhibitory kinaz Src to m.in. rodzina związków pirolo-pyrimidynowych, czy inhibitor o szczególnie wysokiej selektywności, SU6656. W hodowli *ex vivo* progenitorów megakariocytów obecność inhibitora hamuje proliferację przy równoczesnej indukcji zmian w morfologii, fenotypie i poziomie ploiddii świadczących o dojrzewaniu komórek. Inhibitory kinaz Src mogą również odgrywać rolę terapeutyczną. Dasatinib, inhibitor kinaz Bcr-Abl/Src, charakteryzuje się wysoką aktywnością i indukuje hematologiczną oraz cytogenetyczną odpowiedź u pacjentów w kryzysie blastycznej przewlekłej białaczki szpikowej.

WPROWADZENIE – BIAŁKA RODZINY KINAZ TYROZYNOWYCH Src

Kinaza Src oraz pozostałe enzymy rodziny kinaz tyrozynowych Src pełnią rolę w cyklu komórkowym, w proliferacji i przeżyciu komórki, w morfologii i ruchliwości komórki, oraz w procesie onkogenezy [1-8]. Kinazy Src nie posiadają specyficznych receptorów i są kontrolowane przez receptory integryny, cytokin, hormonów steroidowych, a także przez receptory związane z białkiem G, antygenem czy też Fc. A zatem kinazy Src pośredniczą w przenoszeniu sygnału inicjowanego przez niektóre cytokiny (głównie przez interleukiny i interferony), antygeny i integryny. Substratami kinaz Src są liczne białka zlokalizowane w pobliżu błony komórkowej (np. białka cytoszkieletu, białka Ras, kinaza 3-fosfoinozytolu (PI3K)) i produkty onkogenów komórkowych (np. c-Myc). Rodzina kinaz tyrozynowych Src człowieka składa się z 8 białek o masie cząsteczkowej 55-62 kDa: Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Src i Yes, które posiadają podobną aranżację domen enzymatycznych (Ryc. 1). N-końcowy fragment białek Src (50-70 AA) charakteryzuje się obecnością kwasu mirystynowego (związanego w pozycji G2), który jest odpowiedzialny za przyłączenie enzymu do wewnętrznego listka błony komórkowej. Dalej w kierunku końca C występują dwie regulacyjne domeny: SH3 i SH2 oraz domena katalityczna, SH1. Regulacyjna domena SH2 (~100AA) wiąże się w swoisty sposób z krótkimi sekwencjami aminokwasowymi, zawierającymi resztę fosfotyrozyny zarówno w białkach Src, jak również w innych białkach w komórce. Natomiast domena SH3 jest złożona z 50 do 60 reszt aminokwasowych i rozpoznaje sekwencje aminokwasowe bogate w reszty proliny. W C-końcowym fragmencie białka Src, w pozycji 527 w kinazie ptaków i 508 w kinazie człowieka, znajduje się reszta tyrozyny, która może ulegać odwracalnej fosforylacji. Fosforylacja reszty tyrozyny w tej pozycji utrzymuje aktywność kinazy na niskim poziomie, a jej defosforylacja zwiększa aktywność kinazową. v-Src, białko wirusa, jest kodowane przez onkogen wirusa mięsaka Rousa ptaków, natomiast komórkowy homolog Src jest kodowany przez fizjologiczny gen, pierwszy z poznanych protoonkogenów. Geny kinaz Src ulegają ekspresji prawie we wszystkich komórkach, jednak w mózgu, osteoklastach i płytkach krwi ulegają ekspresji na 5-200 razy wyższym poziomie niż w innych komórkach. Białka z rodziny kinaz Src pełnią kluczową rolę w morfologii, proliferacji, ruchliwości oraz przeżyciu komórek w procesie megakariocytopoezy, a także w procesie trombopoezy oraz w aktywacji płytek krwi.

MEGAKARIOCYTOPOEZA

Megakariocytopoeza jest wieloetapowym procesem (Ryc. 2), w którym z wielopotencjalnej komórki pnia powstają dojrzałe megakariocyty, które w procesie trombopoezy uwalniają płytki [9]. Zidentyfikowano szereg komórek prekursor-

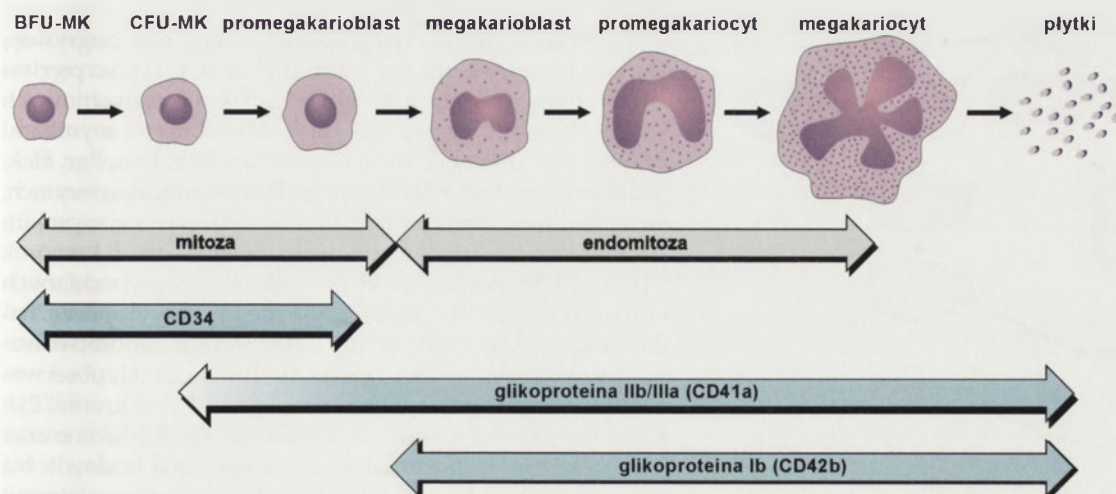


Rycina 1. Schemat budowy białka rodzyńki kinaz tyrozynowych Src.

rowych układu megakariocytowego. Najbardziej pierwotną komórką tego szeregu jest komórka o dużym potencjale proliferacyjnym, tworząca kolonie megakariocytowe *in vitro* (HPP-CFU-Mk). Następnie pojawiają się dwie klasy prekursorów megakariocytów: młodsze BFU-Mk (ang. *burst forming unit-megakaryocyte*) oraz bardziej dojrzałe CFU-Mk (ang. *colony forming unit-megakaryocyte*). Na komórkach prekursorowych jest obecny antygen CD34 charakterystyczny dla komórek macierzystych. W trakcie dalszego rozwoju i proliferacji komórek prekursorowych pojawiają się następujące formy megakariocytów: megakarioblasty, promegakariocyty, megakariocyty ziarniste oraz megakariocyty dojrzałe, które wykazują obecność specyficznych glikoprotein płytkowych. Glikoproteina IIb/IIIa (CD41a), receptor dla fibrynogenu, czynnika von Willebranda, fibronektyny i vitronektyny, jest obecna na powierzchni megakariocytów i płytek krwi. Antygen CD41a jest wczesnym markerem progenitorów megakariocytów, który pojawia się w procesie megakariocytopoezy na etapie CFU-Mk [10]. Antygen CD42b, integralna podjednostka α glikoproteiny Ib (Gplb), jest późniejszym markerem, który pojawia się na bardziej dojrzałych komórkach megakariocytów [11]. Kompleks Gplb-GpIX jest płytkowym receptorem dla czynnika von Willebranda i bierze udział w adhezji płytek do naczyniowego śródbłonka. Glikoproteina Gplb jest również receptorem wiążącym trombinę. Megakarioblast posiada duże jedno- lub dwupłatowe jądro z widocznymi jąderkami, a jego cytoplazma wykazuje znaczny stopień zróżnicowania. W cytoplazmie obecne są dwa typy ziarenek oraz struktu-

ry błonowe mające związek z błoną komórkową, tworzące zespół błona rozdzielających cytoplazmę (DMS, ang. *demarcation membrane system*). DMS jest ultrastrukturą charakterystyczną tylko dla megakariocytów. Promegakariocyt (14 – 30 μm) posiada jądro w kształcie podkowy, a system DMS ulega znacznemu rozwinięciu i powstają „pola płytkowe”, wyznaczające wielkość i kształt przyszłych płytek. Dojrzały megakariocyt, o średnicy powyżej 40 μm , posiada wielopłatowe jądro, liczne ziarnistości i organelle komórkowe. Na obrzeżach komórki widoczne są odsznurowujące się płytki krwi. Fragmentacja megakariocytów prowadzi do oddzielenia dużych fragmentów zwanych propłytkami, które ulegają podziałom na pojedyncze płytki. Pojedynczy dojrzały megakariocyt człowieka tworzy od 2000 do 5000 płytek krwi [9,10,12]. Megakariocyty są unikalnymi komórkami hematopoetycznymi nie tylko ze względu na ich wielkość, średnica komórki może osiągać nawet 100 μm oraz na obecność zespołu błon rozdzielających cytoplazmę (DMS) ale również na obecność dużego, poliploidalnego jądra (nawet o 128N), powstającego w wyniku endomitozy. Komórki prekursorowe Mk rozwijają się i podlegają podziałom mitotycznym do stadium promegakarioblastu a następnie po przejściu do przedziału megakariocytów, różnicują się i dojrzewają. Na tym właśnie etapie ukierunkowane komórki megakariocytopoezy zatrzymują podziały mitotyczne i kontynuują replikację DNA. W endomitozie kolejnym cyklem replikacyjnym DNA nie towarzyszy rozchodzenie się chromosomów, nie zachodzi podział jądra, ani cytokineza. Endomitoza prowadzi do zwielokrotnienia liczby chromosomów w komórce. W wyniku podziałów endomitotycznych powstają jądra o ploiddii 4N, 8N, 16N, 32N, 64N a nawet 128N. Dojrzewanie cytoplazmy w progenitorach megakariocytów poprzedza uzyskanie przez komórki określonego stopnia ploidalności. Kluczową cytokiną regulującą endomitozę jest trombopoetyna. Innym cytokiną, jak np. interleukinie 6 (IL-6) czy chemokinie SDF-1, przypisuje się wpływ na wzrost ploiddii megakariocytów [9,10,12].

W ostatnich latach zidentyfikowano szereg cytokin i krwiotwórczych czynników wzrostowych, stymulujących proliferację i dojrzewanie prekursorów megakariocytów,



Rycina 2. Schemat megakariocytopoezy z uwzględnieniem syntezy antygenów powierzchniowych: CD34, CD41a oraz CD42b.

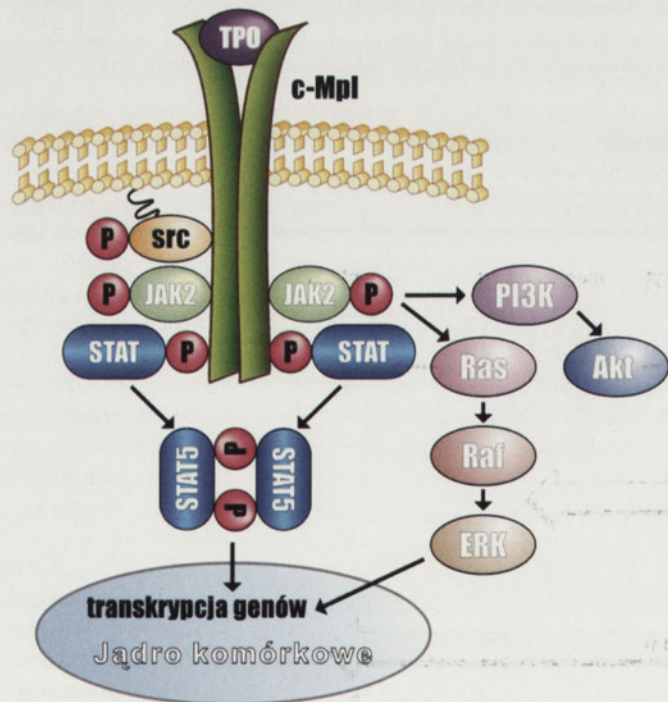
endomitozę i w konsekwencji powstawanie płytek na drodze fragmentacji cytoplazmy megakariocytów [9,13,14]. Aktywność czynnika stymulującego megakariocyty posiada interleukina-3 (IL-3), interleukina-6 (IL-6), czynnik stymulujący kolonie granulocytarno-makrofagowe (GM-CSF), interleukina-11 (IL-11), czynnik komórek macierzystych (SCF), erytropoetyna (EPO) i trombopoetyna

(TPO). Inne cytokiny, jak interleukina-1 (IL-1) czy hamujący czynnik białaczkowy (LIF), modulują uwalnianie płytek w skojarzeniu z innymi cytokinami płytkotwórczymi. Jednak tylko trombopoetyna posiada aktywność specyficzną dla megakariocytów [15].

AKTYWACJA KINAZ Src NA SZLAKU SYGNAŁOWYM TROMBOPOETYNY

Trombopoetyna jest syntetyzowana w wątrobie jako białko prekursorowe, zbudowane z 353 reszt aminokwasowych, o masie cząsteczkowej 36 kDa [16]. Po odłączeniu peptydu sygnałowego, składającego się z 21 reszt aminokwasowych, białko ulega glikozylacji i ostatecznie powstaje glikoproteina o masie cząsteczkowej 80-90 kDa, która jest uwalniana do krwiobiegu. Glikozylacja jest niezbędną posttranslacyjną modyfikacją trombopoetyny warunkującą stabilizację białka oraz przedłużenie okresu półtrwania. Gen kodujący trombopoetynę ulega ekspresji głównie w parenchymalnych komórkach wątroby oraz w małych ilościach w nerkach, mięśniach szkieletowych, sercu, mózgu, śledzionie, jądrach i w szpiku kostnym. Trombopoetyna jest najważniejszym czynnikiem wpływającym na dojrzewanie megakariocytów, pomnażając ich liczbę, zwiększa endoreduplikację i ploidalność jądra oraz ułatwia fragmentację megakariocytów i tworzenie proplatek [16]. Trombopoetyna jest niezbędną hematopoetyczną cytokiną, która reguluje megakariocytopoezę poprzez receptor c-Mpl, który jest produkowany przez hematopoetyczne komórki macierzyste i megakariocyty [17]. c-Mpl należy do rodziny receptorów cytokin typu I, które nie posiadają wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej. Receptor c-Mpl, po związaniu trombopoetyny, ulega dimeryzacji tworząc homodimer i aktywuje towarzyszące mu białka z rodziny kinaz Janus

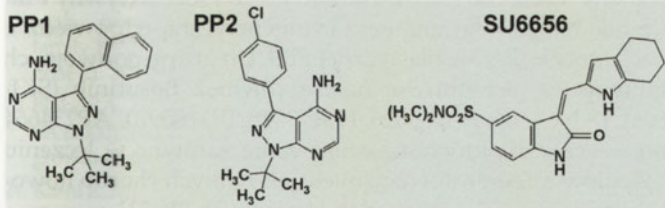
(JAK) [18]. Kinaza JAK2 jest krytyczna dla rozwoju megakariocytów, fosforyluje ona czwartą resztę tyrozyny w cytoplazmatycznej domenie c-Mpl (Y112). JAK2 uczestniczy w aktywacji szlaku przekazywania sygnału JAK/STAT (ang. *signal transducer and activator of transcription*), a także białka Ras/białka Raf/MAPK (ang. *mitogen activated protein kinases*) [19]. Droga JAK/STAT jest niezbędna w procesie proliferacji stymulowanej trombopoetyną, podczas gdy aktywacja MAPK pobudza różnicowanie komórek, szczególnie podczas długotrwałej aktywacji. Aktywacja obu dróg JAK/STAT i MAPK przez trombopoetynę została dobrze udokumentowana, zarówno w liniach komórkowych, jak i w pierwotnych komórkach. Rodzina kinaz Src jest aktywowana na skutek oddziaływania trombopoetyna/c-Mpl [4] (Ryc. 3). Do substratów, które są fosforylowane przez kinazy Src należą receptory oraz białka STAT. Uważa się, że za aktywację STAT3 i STAT5 są odpowiedzialne raczej kinazy Src niż kinazy JAK. Kinazy Src regulują indukowaną przez trombopoetynę proliferację i megakariocytopoezę, prawdopodobnie poprzez ograniczenie czasu trwania i intensywności aktywacji MAPK. Kinazy Src modyfikują proliferację indukowaną przez trombopoetynę, regulując cykl komórkowy podczas megakariocytopoezy. SCF jest jedną z najważniejszych cytokin podczas hematopoezy, regulujących proliferację i przeżycie komórek macierzystych i progenitorowych. Pomimo że sam SCF nie warunkuje tworzenia kolonii megakariocytowych, to jednak ujawnia on silne działanie synergistyczne w procesie megakariocytopoezy, prowadzonej w obecności trombopoetyny [20]. Stymulacja komórek linii MO7-e trombopoetyną powoduje aktywację STAT5, która wzrasta 1,6-krotnie w wyniku równoczesnej stymulacji trombopoetyny i SCF, podczas gdy sam SCF nie indukuje transkrypcyjnej aktywności STAT5. JAK2 oraz kinazy Src pośredniczą w fosforylacji reszty tyrozyny STAT5. Równoczesna aktywacja JAK2 i kinaz Src może uczestniczyć we wzmacnieniu sygnału STAT5 w obecności trombopoetyny i SCF. Receptor dla SCF, c-kit, należy do rodziny receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych i ulega autofosforylacji podczas wiązania SCF, w rezultacie aktywuje wiele białek sygnałowych, takich jak PI3K, kinazy Src, Shc, Grb2, Grb7 oraz Ras [20].



Rycina 3. Schemat szlaku sygnalizacyjnego trombopoetyny (TPO). Przedstawiono trzy główne drogi przekazywania sygnału: JAK2-Ras-Raf-MAPK(ERK), JAK2-STAT3/STAT5 oraz PI3K-Akt, które są aktywowane w wyniku przyłączenia TPO do receptora c-Mpl.

KINAZY Src W MEGAKARIOCYTACH

W procesie megakariocytopoezy ważną rolę odgrywają białka z rodziny kinaz Src. Lannutti i wsp. [21] jako pierwsi zidentyfikowali, które z białek rodziny kinaz tyrozynowych Src są obecne w megakariocytach. Uzyskanymi wynikami potwierdzili obecność sześciu kinaz Src: Fyn, Lyn, Fgr, Hck, Src i Yes (Fyn, Lyn > Src, Yes, Fgr, Hck) w megakariocytach, ale tylko dwie z nich, Fyn i Lyn, wyróżniały się wysokim poziomem syntezy. W wybranych dniach hodowli komórek CD34⁺/CD38^{lo}, izolowanych ze szpiku kostnego, poddanych ekspansji w medium promującym megakariocytopoezę, badano ekspresję genów rodziny kinaz Src. Nie zaobserwowano ekspresji genów Blk i Lck. W 10 dniu hodowli obserwowano zmiany w poziomie ekspresji genu *Fyn* 6-krotne, *Lyn* 1,2-krotne, *Yes* 1,7-krotne, *Src* 1,5-krotne, *Fgr* 0,4-krotne oraz *Hck* 0,3-krotne w stosunku do zerowego dnia hodowli. Na uwagę zasługuje fakt, że tylko *Fyn* ulega znaczącej ekspresji podczas różnicowania megakariocytów. W hodowli izolowanych ze szpiku megakariocytów, po stymulacji trombo-



Rycina 4. Struktura chemiczna wybranych inhibitorów kinaz tyrozynowych Src: PP1, PP2 i SU6656.

poetyną, aktywność Fyn wzrosła w komórkach 6-krotnie a Lyn 5-krotnie, co dodatkowo potwierdziło istotną rolę Fyn i Lyn w procesie megakariocytopoezy. Obecność trombopoetyny w hodowli *in vitro* nie miała wpływu na aktywność pozostałych czterech kinaz Src. A zatem trombopoetyna selektywnie aktywuje Fyn i Lyn w pierwotnych komórkach megakariocytów [21].

INHIBITORY KINAZ Src W PROCESIE DOJRZEWANIA PROGENITORÓW MEGAKARIOCYTÓW

Kinazy Src są regulatorami megakariocytopoezy indukowanej trombopoetyną. Kinazy Src hamują proliferację, różnicowanie i dojrzewanie progenitorów megakariocytów. A zatem inhibitory kinaz Src mogą być użyteczne jako czynniki indukujące różnicowanie megakariocytów. Znane i stosowane pirolo-pyrimidynowe inhibitory kinaz Src, takie jak PP1, PP2 (Ryc. 4) lub A-419259, hamują aktywność nie tylko kinaz Src, ale również wykazują specyficzność do receptora płytkowego czynnika wzrostu (PDGF, ang. *platelet-derived growth factor*) [22]. Natomiast inhibitor nowszej generacji, SU6656 (Ryc. 4), związek o niskiej masie cząsteczkowej, wykazuje wysoką efektywność oraz selektywność w stosunku do Src oraz innych przedstawicieli rodziny Src, takich jak Fyn, Yes, Lyn, natomiast znacznie słabiej hamuje Lck [23]. Zarówno PP1, PP2, jak i SU6656 współzawodniczą z substratem, ATP, o miejsce wiązania w domenie katalitycznej kinazy [24]. Lannutti i wsp. [25] wykazali efekt działania inhibitora kinaz Src, SU6656, na dojrzewanie megakariocytów. W obecności SU6656 obserwowano zahamowanie podziałów komórek linii megakariocytowej UT-7/TPO, przy jednoczesnej kontynuacji akumulacji DNA w procesie endomitozy. Inhibitor stymulował także wzrost ekspresji antygenu CD41(GpIIb) oraz CD61(GpIIIa). Podobny efekt na proliferację, poliploidyzację i różnicowanie komórek był obserwowany w hodowlach linii komórkowych posiadających potencjał megakariocytów innych niż UT-7/TPO oraz w czasie ekspansji *ex vivo* megakariocytów ze szpiku kostnego pacjentów z zespołem mielodysplastycznym (MDS) [25]. A zatem SU6656 jest użyteczny, nie tylko jako czynnik indukujący różnicowanie megakariocytów, ale również może być stosowany w badaniach prowadzących do zrozumienia molekularnych podstaw endomitozy megakariocytów. Wilson i wsp. [22] wykazali, że obecność inhibitorów PP2 i A-419259 w hodowli komórek linii przewlekłej białaczki szpikowej (PBS), posiadających chromosom Philadelphia (Ph), takich jak: K562 i Meg-01, hamuje proliferację oraz indukuje apoptozę komórek. PP2 i A-419259, stosowane w tych samych stężeniach, nie miały jednak wpływu na namnażanie i żywotność komórek linii białaczkowych, które nie posia-

dają chromosomu Ph: TF-1 i HEL. Chromosom Philadelphia powstaje w wyniku wzajemnej translokacji długich ramion chromosomów 9 i 22 (9q+;22q-). Następstwem tego jest powstanie patologicznego genu Bcr/Abl, który koduje białko p210, wykazujące nieprawidłową, zwiększoną aktywność kinazy tyrozynowej. Przyjmuje się, że właśnie ekspresja genu kinazy Bcr/Abl jest podstawowym czynnikiem transformacji nowotworowej w przewlekłej białaczce szpikowej (PBS) [26]. Lannutti i wsp. [27] zaobserwowali, że w hodowlach komórek izolowanych ze szpiku kostnego myszy w obecności PP1 pojawiało się więcej dojrzałych megakariocytów o podwyższonej ploiddii jądra.

Przeprowadzono również analizę działania inhibitora kinaz Src, SU6656, na progenitory megakariocytów uzyskane w hodowli *in vitro* z komórek CD34⁺ izolowanych z krwi pępowinowej [28]. Inhibitor hamował proliferację oraz indukował zmiany w morfologii, fenotypie i ploiddii komórek wskazujące na dojrzewanie progenitorów megakariocytów. W 4 dniu hodowli, w obecności SU6656, obserwowano większe komórki z licznymi ziarnistościami i dużymi jądrami, w porównaniu z hodowlą kontrolną bez inhibitora. Jednocześnie odsetek komórek CD34⁺ był czterokrotnie niższy (kontrola – 23%, SU6656 – 6%), natomiast odsetek komórek CD41a⁺, CD42b⁺ i CD184⁺ (CXCR4, receptor dla SDF-1) był wyższy, odpowiednio, o 21%, 8% i 14%, w obecności SU6656. Obserwowano również wyższy odsetek komórek o fenotypie CD41a⁺ z podwyższoną ploiddią w obecności inhibitora. Jednak prezentowane dane poziomu ploiddii w progenitorach megakariocytów z krwi pępowinowej [28], w porównaniu z wynikami badań przeprowadzonych na progenitorach megakariocytów ze szpiku kostnego [25], wskazują na słabszą indukcję endomitozy w obecności SU6656 w komórkach z krwi pępowinowej. Wiadomo, że w hodowli *in vitro* progenitory megakariocytów uzyskane z krwi pępowinowej wykazują niższą ploiddię w porównaniu z megakariocytami ze szpiku kostnego [29].

Analiza komórek Meg-01 eksponowanych na działanie inhibitora kinaz Src, SU6656, potwierdziła indukcję różnicowania badanych komórek [28]. Hamowanie proliferacji ze spadkiem ekspresji antygenu CD71 (receptor transferyny obecny na proliferujących komórkach), pojawianie się dużych komórek z wielopłatowym jądrem wskazującym na indukcję endomitozy, poliploidyzacja jądra, wzrost syntezy antygenu CD41a, jednoznacznie świadczą o dojrzewaniu megakarioblastów Meg-01 w obecności SU6656. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi dla komórek linii Meg-01 hodowanych w obecności inhibitorów kinaz Src, takich jak PP2 i A419259 [22] oraz dla innych linii komórkowych o potencjale megakariocytów hodowanych w obecności SU6656 [25].

UDZIAŁ INHIBITORA KINAZ Src, SU6656, W TROMBOPOEZIE

Gandhi i wsp. [30] przedstawili wyniki potwierdzające udział inhibitora kinaz Src, SU6656, w procesie trombopojezy *in vitro*. Badania przeprowadzono na megakariocytowej linii komórkowej, UT-7/TPO oraz na niedojrzałych pierwotnych megakariocytach człowieka. Po 6 dniach, w obecności trombopoetyny i SU6656, obserwowano wzrost ploiddii komórek oraz zapoczątkowanie uwalniania fragmentów komórek

podobnych do płytek. Fragmenty nie agregowały spontanicznie, jednak szybko agregowały w odpowiedzi na każdy ze standardowych agonistów: kolagen, kwas arachidowy, ADP i epinefrynę. Po 72 godzinach ekspozycji na SU6656, w pierwotnych progenitorach megakariocytów obserwowano powstawanie systemu błon demarkacyjnych, ziarnistości gęstych oraz fragmentów podobnych do płytek. Uwalniane fragmenty megakariocytów funkcjonalnie były podobne do płytek krwi z wykluczeniem spontanicznej agregacji. Autorzy udokumentowali udział SU6656 nie tylko w różnicowaniu megakariocytów, ale również w trombopoecie *in vitro* [30]. Kinazy Lyn i Fyn odgrywają rolę w aktywacji płytek krwi, uczestnicząc w fosforylacji γ -łańcucha Fc-receptora podczas aktywacji glikoproteiny VI (GpVI) przez kolagen [7]. Lyn pośredniczy również w aktywacji płytek indukowanej γ -trombiną [7].

MYSZY *Lyn*(-/-) W BADANIACH ROLI KINAZY Lyn W MEGAKARIOCYTACH

Badania prowadzone na liniach komórkowych wykazały, że kinaza Lyn jest negatywnym regulatorem indukowanej trombopoetyną proliferacji. Uzyskane wyniki zachęciły do dalszych badań enzymu w procesie megakariocytogenezy, tym razem obiektem badań były myszy knock-out pozbawione genu białka Lyn (*lyn*(-/-)) [31]. Zaobserwowano, że ze szpiku kostnego myszy *lyn*(-/-) jest uwalnianych więcej komórek o fenotypie megakariocytów, wykazujących obecność charakterystycznych antygenów powierzchniowych: CD41 i c-Mpl, w porównaniu z myszami dzikiego szczepu. W szpiku myszy zmodyfikowanych genetycznie obserwowano również więcej CFU-Mk. Podczas indukowanej trombopoetyną ekspansji *in vitro* komórek macierzystych izolowanych ze szpiku myszy *lyn*(-/-) wzrosła wielokrotnie liczba dojrzałych megakariocytów wraz ze wzrostem poziomu ploidalności komórek. Analiza histologiczna szpiku kostnego i śledziony myszy *lyn*(-/-) wykazała wzrost liczby megakariocytów. Stymulacja trombopoetyną komórek megakariocytów izolowanych z myszy *lyn*(-/-) nie miała wpływu na poziom fosforylacji: JAK2, STAT3, STAT5 i MEK (MAPK). W megakariocytach *lyn*(-/-) obserwowano podwyższoną aktywność kinaz Erk 1/2 (MAPK) i Akt. Potwierdzono również redukcję fosforylacji tyrozyny w fosfatyzie inozytolu, SHIP. Wyniki jednoznacznie potwierdziły, że kinaza Lyn jest negatywnym regulatorem sygnału trombopoetyny [31].

PODSUMOWANIE

Jak już wspomniano, aktywacja rodziny białek kinaz tyrozynowych Src odgrywa istotną rolę w wielu procesach życiowych komórek. Wykazanie obecności kinaz Src w megakariocytach i poznanie udziału kinaz Src w procesie megakariocytogenezy wzbogaciło wiedzę na temat kontroli rozwoju megakariocytów. Wykazano, że inhibitory kinaz Src mogą być użyteczne, nie tylko w badaniu procesu megakariocytogenezy kontrolowanej przez kinazy Src, ale również jako czynnik indukujący dojrzewanie megakariocytów. W ostatnich latach wykazano, że inhibitory kinaz Src mogą również odgrywać rolę terapeutyczną. I tak, na przykład, lek Dasatinib, podwójny inhibitor kinaz Bcr-Abl/Src, jest nie tylko inhibitorem kinazy Bcr/Abl, ale również

rodziny kinaz Src [32]. Dasatinib jest wysoce aktywny i indukuje hematologiczną oraz cytogenetyczną odpowiedź u pacjentów w kryzysie blastycznej PBS. Do grupy podwójnych inhibitorów Bcr-Abl/Src należą również Bosutinib (SKI-606), INNO-406, PD166326, PD173955, PD180970, AP234664 oraz AZD0530, których zastosowanie zarówno w leczeniu zespołów mieloproliferacyjnych, jak i innych chorób nowotworowych jest w fazie badań klinicznych [26,33].

PIŚMIENNICTWO

1. Brown MT, Cooper JA (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287: 121-149
2. Thomas SM, Brugge JS (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 513-609
3. Martin GS (2001) The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 467-475
4. Sushil GR, Reddy EP (2002) Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene* 21: 3334-3358
5. Person SJ, Person JT (2004) Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23: 7906-7909
6. Roskoski R Jr (2004) Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 1155-1164
7. Roskoski R Jr (2005) Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 1-14
8. Ingley E (2008) Src family kinases: Regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta* 1784: 56-65
9. Kuter DJ (2001) Megakaryopoiesis and thrombosis. W: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U (red). *Williams Hematology*. Wydanie 6. McGraw Hill Companies str 1339-1355
10. Long M (1998) Megakaryocyte differentiation events. *Semin Hematol* 35: 192-199
11. Vainchenker W, Kieffer N (1988) Human megakariocytogenesis: In vitro regulation and characterization of megakaryocytic precursor cells by differentiation markers. *Blood* 72: 102-107
12. Bobik R (1998) Megakariocyty, W: Dąbrowski Z (red) *Fizjologia krwi*. Wybrane zagadnienia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 269-285
13. Baker SJ, Rane SG, Reddy EP (2007) Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene* 26: 6724-6737
14. Matcalf D (2008) Hematopoietic cytokines. *Blood* 111: 485-491
15. Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S (1994) Identification and cloning of megakaryocytes growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 77: 1117-1124
16. Kuter DJ (2004) Thrombopoietin Factors, W: Morstyn G, Foote MA, Lieschke GJ (red) *Hematopoietic Growth Factors in Oncology*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey str 125-154
17. Kaushansky K (1995) Thrombopoietin. The primary regulator of platelet production. *Blood* 86: 419-431
18. Dorsch M, Fan PD, Danial NN, Rothman PB, Goff SP (1997) The thrombopoietin receptor can mediate proliferation without activation of the Jak-STAT pathway. *J Exp Med* 186: 1947-1955
19. Rouyez MC, Boucheron C, Gisselbrecht S, Dussanter-Fourt I, Porteu F (1997) Control of thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* 17: 4991-5000
20. Drayer AL, Boer AK, Los EL, Esselink MT, Vellenga E (2005) Stem cell factor enhances thrombopoietin-induced STAT5 signaling in megakaryocyte progenitors through JAK2 and Src kinase. *Stem Cells* 23: 240-251
21. Lannutti BJ, Shim MH, Blake N, Reems JA, Drachman JG (2003) Identification and activation of Src family kinases in primary megakaryocytes. *Exp Hematol* 31: 1268-1274

22. Wilson MB, Schreiner SJ, Choi HJ, Kamens J, Smithgall TE (2002) Selective pyrrolo-pyrimidine inhibitors reveal a necessary role for Src family kinases in Bcr-Abl signal transduction and oncogenesis. *Oncogene* 21: 8075-8088
23. Blake RA, Broome MA, Liu X, Wu J, Gishizky M, Sun L, Courtneidge SA (2000) SU6656, a selective Src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling. *Mol Cell Biol* 20: 9018-9027
24. Karni R, Mizrachi S, Reiss-Sklan E, Gazit A, Livnah O, Levitzki A (2003) The pp60c-Src inhibitor PP1 is non-competitive against ATP. *FEBS Lett* 537: 47-52
25. Lannutti BJ, Blake N, Reems JA, Ganghi MJ, Drachman JG (2005) Induction of polyploidization in leukemic cell lines and primary bone marrow by Src kinase inhibitor SU6656. *Blood* 105: 3875-3878
26. Grzybowska-Izydorczyk O, Góra-Tybor J, Robak T (2006) Inhibitory kinaz tyrozynowych w terapii przewlekłej białaczki szpikowej. *Postępy Hig Med Dośw* 60: 490-497
27. Lannutti BJ, Drachman JG (2003) Lyn tyrosine kinase regulates thrombopoietin-induced proliferation of hematopoietic cell lines and primary megakaryocytic progenitors. *Blood* 103: 3736-3743
28. Kamińska J, Klimczak-Jajor E, Skierski J, Bany-Łaszewicz U (2008) Effects of inhibitor of Src kinases, SU6656, on differentiation of megakaryocytic progenitors and activity of α 1,6-fucosyltransferase. *Acta Biochim Polon* 55(3): 499-506
29. Oudenrijn S, Borne A, Haas M (2000) Differences in megakaryocyte expansion potential between CD34+ stem cells derived from cord blood, peripheral blood, and bone marrow from adults and children. *Exp Hematol* 25: 1054-1061
30. Gandhi MJ, Drachman JG, Reems JA, Thorning D, Lannutti BJ (2005) A novel strategy for generating platelet-like fragments from megakaryocytic cell lines and human progenitor cells. *Blood Cells Mol Dis* 35: 70-73
31. Lannutti BJ, Minear J, Blake N, Drachman JG (2006) Increased megakaryocytopoiesis in Lyn-deficient mice. *Oncogene* 25(23): 3316-3324
32. Cortes J, Rousselot P, Kim DW, Ritchie E, Hamerschlak N, Coutre S, Hochhaus A, Guilhot F (2007) Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood* 109: 3207-3213
33. Ramirez P, DiPersio JF (2008) Therapy options in Imatinib failures. *The Oncologist* 13: 424-434

Src kinases in the process of maturation megakaryocyte progenitors

Joanna Kamińska[✉], Edyta Klimczak-Jajor, Urszula Bany-Łaszewicz

Department of Biochemistry, Institute of Hematology and Blood Transfusion, 5 Chocimska St., 00-957 Warszawa, Poland

[✉]e-mail: jokam@ihit.waw.pl

Key words: Src kinases, megakaryocytopoiesis, megakaryocyte, inhibitor of Src kinases

ABSTRACT

Src family protein tyrosine kinases play key roles in cell morphology, proliferation, motility, and survival in megakaryocytopoiesis. Six of Src family kinases (Fyn, Lyn, Fgr, Hck, Src and Yes), are present in megakaryocytes (Mks). Src kinases are negative factors of megakaryocytopoiesis induced by thrombopoietin. The inhibitors of Src kinases might be useful as agents inducing maturation of Mks. The experiments with inhibitors of Src kinases used in culture of Mk progenitors and potential megakaryocyte cell lines gave new information about the role of Src kinases in the development of Mks. The pyrrolo-pyrimidine reagents family and highly selective inhibitor, SU6656, are known and used inhibitors of Src kinases. The presence of inhibitor in *ex vivo* culture of Mk progenitors blocks proliferation and simultaneously induces the changes in cell morphology, phenotype and ploidy level, indicating the maturation of the cells. The inhibitors of Src kinases also might play the therapeutic role. Dasatinib, dual Bcr-Abl/Src kinase inhibitor, is of high activity and induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukaemia in blast crisis.

siRNA skierowane przeciwko telomerazie – skuteczne narzędzie w leczeniu nowotworów?

Błażej Rubiś

Anna Półrolniczak

Maria Rybczyńska

Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań; tel.: (061) 869 14 27, e-mail: mrybczyn@ump.edu.pl

Artykuł otrzymano 21 lutego 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 14 kwietnia 2008 r.

Słowa kluczowe: telomeraza, telomery, siRNA, nowotwór, terapia

Wykaz skrótów: ATL (ang. *alternative telomere lengthening*) – alternatywne wydłużanie telomerów; hTERT (ang. *human telomerase reverse transcriptase*) – podjednostka katalityczna telomerazy człowieka o aktywności odwrotnej transkryptazy; hTR (ang. *human telomerase RNA*) – podjednostka RNA telomerazy człowieka; RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*) – kompleks wyciszający indukowany przez RNA; shRNA (ang. *short hairpin RNA*) – krótkie RNA o strukturze spinki do włosów; siRNA (ang. *small interfering RNA*) – krótkie interferencyjne RNA; snoRNA (ang. *small nucleolar RNA*) – małe jąderkowe RNA; TBP (ang. *telomerase binding proteins*) – białka wiążące telomery; TEPI (ang. *human telomerase associated protein*) – białko związane z telomerazą człowieka

Podziękowania: Praca powstała w trakcie realizacji projektu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr N N401 223 534

STRESZCZENIE

Sekwencje telomerów to zlokalizowane na końcach chromosomów, bogate w guaninę powtórzenia, pełniące funkcje ochronne. Z każdym podziałem komórki ulegają one skróceniu, stanowiąc tym samym swoisty zegar molekularny ograniczający liczbę podziałów. Telomerowe DNA może jednak podlegać odbudowie przy udziale telomerazy (polimerazy zależnej od RNA), co zapewnia komórkom nieograniczony potencjał proliferacyjny. W komórkach nowotworowych wykazano znaczną aktywność telomerazy, przy czym w prawidłowych komórkach somatycznych jest ona niewykrywalna. Z tego względu enzym ten stał się atrakcyjnym celem dla terapii przeciwnowotworowej. Obecnie najbardziej obiecującą metodą modulacji aktywności telomerazy jest interferencja RNA. W wielu badaniach, ukierunkowując siRNA na różne podjednostki telomerazy (najczęściej hTERT), udało się uzyskać znaczący spadek syntezy i aktywności tego enzymu, a w rezultacie zahamować proliferację komórek. Jak wykazano, jest to metoda zarówno efektywna, jak i specyficzna, ale wymagająca jeszcze optymalizacji warunków. Terapia z wykorzystaniem siRNA skierowanego przeciwko genom kodującemu elementy kompleksu telomerazy może być rodzajem terapii wspomagającej w leczeniu nowotworów.

WPROWADZENIE

Telomeraza, enzym odpowiedzialny za wydłużanie telomerów, została odkryta i opisana w 1985 roku u *Tetrahymena thermophila*. Podczas intensywnych badań aktywności tego enzymu stwierdzono brak lub niewielki poziom jego aktywności w większości prawidłowych komórek człowieka. Jak wykazano jednak, niemal 90% komórek nowotworowych charakteryzuje się wysoką jej aktywnością. Wielokierunkowość badań nad funkcją i mechanizmami działania telomerazy cały czas się poszerza i wynika z ogromnego znaczenia enzymu dla przewidywania i przebiegu chorób nowotworowych. Ogromne nadzieje wiązane są z możliwością kontroli ekspresji genu kodującego telomerazę i aktywności telomerazy jako kluczowego czynnika dla rozwoju nowotworów, w związku z czym wiele ośrodków badawczych zajmuje się problematyką regulacji aktywności tego enzymu za pośrednictwem mechanizmu interferencji RNA. Mimo obiecujących rezultatów świadczących o możliwości regulacji ekspresji genu i aktywności enzymu, nadal pozostaje wiele istotnych pytań i problemów dotyczących doboru właściwego wektora, a także sposobu dostarczenia i rodzaju cząsteczki siRNA do komórki nowotworowej. Problem efektywności działania siRNA dotyczy również wyboru docelowej podjednostki kompleksu telomerazy, której wyciszenie przyniosłoby najsilniejszy i najbardziej specyficzny efekt, co stanowi obecnie przedmiot intensywnych badań.

TELOMERY – MOLEKULARNA KLEPSYDRA

Pierwszych obserwacji telomerów dokonali już w latach trzydziestych niezależnie Muller i McClintock [1]. Te dynamiczne struktury zlokalizowane na końcach chromosomów pełnią kluczową funkcję w utrzymaniu spójności genomu Eukaryota: zapobiegają utracie informacji genetycznej w czasie replikacji (problem replikacji końca), chronią chromosomy przed fuzją, działaniem egzonukleaz oraz nieprawidłową rekombinacją [1-3].

Telomery zbudowane są z wielokrotnych (150-2000) powtórzeń motywów 5'-TTAGGG-3', połączonych z białkami wiążącymi telomery (TBP, ang. *telomerase binding proteins*) [1-6]. Początkowo zakładano, że telomery mają budowę liniową i przyjmują postać dwuniciowej struktury z wystającym, jednoniciowym końcem 3' bogatym w guaninę [5]. Jak jednak wykazano podczas szczegółowych badań tych struktur, telomery posiadają bardziej złożoną konformację przestrzenną, ukonstytuowaną w postaci pętli, odcinków jedno-, dwu- oraz wieloniciowych cząsteczek DNA [3]. Podstawowymi elementami struktury telomerów są: zachowana w ewolucji pętla t oraz mniejsza pętla D. Istotne znaczenie w procesie formowania tych pętli odgrywają białka z grupy TBP: TRF1 i TRF2 (ang. *telome-*

re repeat factor 1 i telomere repeat factor 2) [3,5,7,8]. Wiadomo również, iż w obrębie telomerów występują struktury czteroniciowe, tzw. tetrapleksy, powstające wskutek oddziaływań czterech reszt guaninowych, tworzących tetradę-G, czyli podstawową jednostkę tetrapleksów [9].

Główną przyczyną skracania telomerowego DNA jest tzw. „problem replikacji końca”, opisany już przez Jamesa Watsona [5]. Jak wykazano, podczas każdego podziału komórki dochodzi do utraty sekwencji telomerowej o długości ok. 50–200 pz [10], co w rezultacie prowadzi do ograniczenia liczby podziałów komórki i jej starzenia [1,4,8]. Związek skracania telomerów z procesem starzenia komórek potwierdziły badania u osób z zespołem Wernera oraz Hutchinsona-Gilforda (formy progerii), u których stwierdzono znaczne skrócenie tych struktur [8]. Jak wykazano, długość telomerów działa niczym wewnątrzkomórkowy zegar, który stanowi swoisty sygnał informujący komórkę o przekroczeniu przez nią krytycznej liczby podziałów (limit Hayflick’a) [1,5,11]. Wskutek skrócenia telomerów dochodzi do zaburzenia ich struktury, co wynika z utraty możliwości utworzenia pętli t. Równocześnie dochodzi też do skrócenia kodującej sekwencji DNA, zlokalizowanej w obrębie końca chromosomu, co jest skutkiem utraty telomerów. W konsekwencji dochodzi do licznych aberracji, a w końcu do zatrzymania podziałów – komórka wchodzi w fazę spoczynku lub jest kierowana na drogę apoptozy [2,4,5,8,12,13].

ZATRZYMAĆ ZEGAR

Nieśmiertelność, czyli możliwość nieograniczonej liczby podziałów zapewnia komórce nie tyle długość telomerów, co ich stabilizacja na poziomie pozwalającym ochronę sekwencji kodujących DNA. W komórkach nowotworowych telomery zazwyczaj są krótsze niż w komórkach prawidłowych, ale jednocześnie wysoka aktywność telomerazy utrzymuje ich długość na stałym poziomie, nie dopuszczając do utraty informacji zawartych w DNA i umożliwia dalsze podziały komórkowe [2,7,14-16].

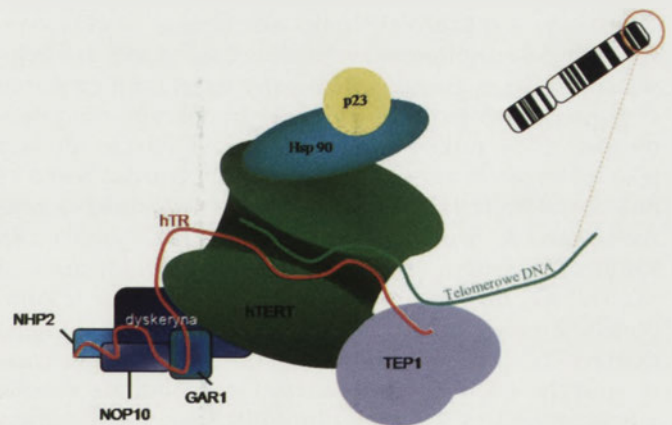
Telomeraza wykazuje aktywność RNA zależnej polimerazy DNA i posiada zdolność dobudowywania telomerowych powtórzeń, przez co przyczynia się do utrzymania długości telomerów. Może ona także tworzyć nowe zakończenia złamanych chromosomów w procesie tzw. „leczenia chromosomów” [1,16]. Większość prawidłowych komórek człowieka wykazuje bardzo niską aktywność telomerazy (z wyjątkiem komórek rozrodczych, macierzystych, aktywnych limfocytów oraz komórek krypt jelitowych). Jej wysoka aktywność jest natomiast charakterystyczna dla okresu embrionalnego oraz dla komórek nowotworowych (ok. 90% z nich wykazuje aktywność telomerazy) [16-19]. Wykazano, że pojawienie się lub wzrost aktywności telomerazy jest ważnym, a nawet kluczowym etapem dla kontynuacji podziałów komórkowych w procesie nowotworzenia [20]. Należy jednak zachować ostrożność w określaniu przyczynowo-skutkowych zależności między aktywnością telomerazy a procesem nowotworowym, bowiem jej aktywność wykazano zarówno w komórkach o łagodnych procesach rozrostowych (przerost stercza, zapalny przerost tarczycy, gruczolakowłókniki piersi), jak i w nowotworach złośliwych [21]. Aktywność telomerazy wzrasta bardzo wcześniej

w nowotworach gruczołu piersiowego, głowy i szyi, płuc, skóry oraz wątroby. Wzrost ten jednak następuje w sposób wtórny względem procesu nowotworzenia. Zgodnie z tym mechanizmem najpierw w wyniku inicjacji kancerogenezy komórka wchodzi w proces nowotworzenia, a dopiero później, pomimo uszkodzeń w DNA, nie jest kierowana do apoptozy, lecz wtórnie przywracana jest aktywność telomerazy. Aktywność enzymu wzrasta z kolei późno w nowotworach jelita, tarczycy i trzustki. Stwierdzono również, że pojawienie się aktywności telomerazy wskazuje jedynie na potencjalne istnienie nowotworu i nie zawsze jest z nim jednoznaczne [20], co wynika ze złożoności wieloczynnikowego procesu nowotworzenia. Z drugiej strony wykazano, że poziom ekspresji genu i aktywności telomerazy może współzależać od ekspresji onkogenów, ale także może przyczynić się do hamowania ekspresji genów supresorowych, indukując proces nowotworowy w komórkach nabłonkowych i fibroblastach [16]. Biorąc pod uwagę rezultaty dotychczasowych badań, słuszne wydaje się więc przyjęcie tezy, że telomeraza może być postrzegana jako marker proliferacji, ale i samego procesu nowotworzenia [21].

Wykazano, że istnieje alternatywny mechanizm wydłużania telomerów, w którym nie uczestniczy telomeraza [3,5]. Choć wykazano niską aktywność telomerazy w niektórych prawidłowych komórkach somatycznych, sugeruje się funkcjonowanie w tych komórkach mechanizmu ATL (ang. *alternative telomere lengthening*). Poznanie tych dwóch mechanizmów i ich zróżnicowania może stać się podstawą do indywidualizacji rodzaju terapii oraz do prognozowania.

BUDOWA TELOMERAZY

Telomeraza jest kompleksem rybonukleoproteinowym, w którego skład wchodzi: podjednostka katalityczna o aktywności odwrotnej transkryptazy (hTERT; ang. *human telomerase reverse transcriptase*), cząsteczka RNA (hTR, ang. *human telomerase RNA*), która stanowi matrycę dla wydłużania jednoniciowego fragmentu telomeru oraz białka pomocnicze (Ryc. 1) [16,18,22].



Rycina 1. Model budowy kompleksu telomerazy. Telomeraza jest złożonym kompleksem enzymatycznym, w którego skład wchodzi zarówno białko pełniące funkcję katalityczną (hTERT), jak i białka pomocnicze (NOP10, GAR1, NHP2, TEP1, HSP90, p23, dyskeryna) oraz cząsteczka RNA (hTR), która zawiera sekwencję komplementarną do sekwencji telomeru (objaśnienia skrótów i funkcji cząsteczek w tekście i w Tabeli 1).

Tabela 1. Białka zasocjowane z telomerazą i wymieniane najczęściej jako wchodzące w skład stabilnego kompleksu telomerazy. Kompleks telomerazy do pełnej aktywności wymaga szeregu podjednostek, których funkcja nadal nie została do końca poznana (szczegółowy opis podjednostek w tekście).

Białko	Chromosom	Funkcja	Podjednostka zasocjowana
TEP1	14q11.2	strukturalne, formowanie kompleksu (?)	hTR, hTERT
p23	12	białko opiekuńcze, formowanie kompleksu	hTERT
Hsp90	1q21.2-q22	białko opiekuńcze, formowanie kompleksu	hTERT
Dyskeryna	Xq28	dojrzwianie i formowanie kompleksu, stabilizacja, lokalizacja	hTR
hGAR1	4q	dojrzwianie i formowanie kompleksu, stabilizacja, lokalizacja	hTR
hNOP10	15	nieznana	hTR
hNHP2	5	dojrzwianie i formowanie kompleksu, stabilizacja, lokalizacja	hTR
L22	3q26	lokalizacja, dojrzwianie hTR	hTR

Podjednostka katalityczna hTERT została po raz pierwszy wyizolowana i zidentyfikowana jako białko p23 w *Euplotes aediculatus* [23]. Jest ona kodowana przez gen zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 5 (5p15.33), zawierający 16 eksonów i 15 intronów [24]. Promotor tego genu oddziałuje między innymi z onkogenem *myc*, receptorami estrogenowymi i progesteronowymi [1,25]. Istotny wpływ na poziom aktywności telomerazy ma proces obróbki potranskrypcyjnej mRNA dla podjednostki hTERT. Wykazano, że różne warianty alternatywnego składowania mRNA występują w komórkach prawidłowych i nowotworowych, przy czym, jak zaobserwowano, w tkance nigdy nie występuje tylko jeden z wariantów, ale przynajmniej kilka [18]. Podjednostka katalityczna zawiera w swoim regionie C-końcowym motyw odwrotnej transkryptazy, zachowany w toku ewolucji, podobnie jak zlokalizowane w N-końcowym fragmencie domeny funkcjonalne. Fragment N-końcowy zawiera także tzw. domenę T [7,26,27]. Ekspresja genu kodującego hTERT jest wysoce zależna od aktywności telomerazy [18] i jest obniżona w komórkach prawidłowych oraz podwyższona w komórkach nowotworowych [16], sugerując istotną rolę tej podjednostki w regulacji aktywności enzymu.

Jak wykazano, obecność telomerazowego RNA obserwuje się w tkankach człowieka niezależnie od aktywności kompleksu telomerazy [16,18]. Część ta kodowana jest przez gen zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 3 (3q26.3). Dojrzały transkrypt zbudowany jest z 451 nukleotydów, natomiast obszar służący jako matryca dla odbudowy telomerów złożony jest z 11 nukleotydów [7,16]. Podjednostka hTR posiada dobrze zachowaną w ewolucji strukturę drugorzędową [16,28]. Koniec 3' zawiera kasetę H/ACA odpowiedzialną za prawidłowe formowanie, działanie oraz stabilność kompleksu. Z kolei w regionie końca 5' znajduje się domena matrycowa oraz sześcionukleotydy, bogate w reszty uracylu odcinki odpowiedzialne za oddziaływanie z białkami C1 i C2 z grupy hnRNPs (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) [8,16,28]. Wielu badaczy donosi o możliwości zastosowania podjednostki hTR jako markera chorób nowotworowych, m. in. układu krwiotwórczego, tkanki nerwowej, czerniaka skóry czy raka endometrium [29].

BIAŁKA TOWARZYSZĄCE

Biorąc pod uwagę aktywność telomerazy złożonej z podjednostek hTERT i hTR *in vitro*, zakładano, że te dwie składowe zapewniają funkcjonowanie enzymu. Jak jednak wykazano, w warunkach *in vivo* telomeraza jest kompleksem złożonym z wielu podjednostek (Tab. 1), w którego skład wchodzi szereg białek zasocjowanych z cząsteczkami hTR i/lub hTERT, koniecznych do funkcjonowania enzymu w komórce [1,16]. Najczęściej, jako najsilniej związane z telomerazą i pełniące najbardziej istotną funkcję, wymieniane są białka TEP1, p23, Hsp90 oraz dyskeryna [16,30].

Zbudowana z 2629 reszt aminokwasowych, podjednostka TEP1 (ang. *human telomerase associated protein*) jest homologiem białka p80 zidentyfikowanego w *Tetrahymena thermophila*, zasocjowana z telomerazowym RNA oraz hTERT. Na jej aminowym końcu zlokalizowany jest region (900 reszt aminokwasowych) homologiczny z białkiem p80, odpowiedzialny za oddziaływanie z RNA, natomiast na końcu karboksylowym zidentyfikowano powtórzenia WD40, motyw zaangażowany w oddziaływanie między cząsteczkami białek [16]. Wykazano, że ekspresja genu kodującego TEP1 wzrasta w aktywowanych limfocytach T i jest związana z aktywnością telomerazy w komórkach nowotworowych [21]. Mechanizm działania TEP1 nie został jeszcze do końca poznany, a jego rola nie jest jasna. Przypuszcza się, iż może ono pełnić funkcje strukturalne w kompleksie telomerazy, brać udział w jego formowaniu lub być zaangażowane w proces progresji nowotworu [30].

Białka p23 i Hsp90 (z rodziny białek szoku cieplnego), należące do grupy białek opiekuńczych, są niezbędnym składnikiem kompleksu, a ich brak uniemożliwia funkcjonowanie telomerazy [1]. Jak wykazano, białka te w stabilny sposób oddziałują z podjednostką katalityczną, wpływając na prawidłowe formowanie enzymu i jego konformację przestrzenną [16,31].

Kolejna podjednostka kompleksu, dyskeryna (NAP57) należy do białek wiążących snoRNA (małe jąderkowe RNA; ang. *small nucleolar RNA*) i jest związana z RNA telomerazy. Białko to oddziałuje z regionem H/ACA cząsteczki hTR. Sugeruje się jej udział w formowaniu, dojrzwianiu, stabilizacji i lokalizacji hTR [16,30,32], jakkolwiek rola ta nie została w pełni potwierdzona.

ZATRZYMAĆ TELOMERAZĘ

Regulacja aktywności telomerazy jest procesem złożonym, obejmującym kontrolę transkrypcji, alternatywne składanie RNA, modyfikacje potranslacyjne oraz szereg czynników wpływających na działanie enzymu zarówno hamujące, jak i pobudzające [18]. Mimo że działanie mechanizmów regulujących aktywność telomerazy nie jest jeszcze do końca poznane, wiadomo, że wzrasta ona w wyniku pobudzenia kinazy białkowej C. Na podwyższenie aktywności enzymu wpływa również obecność antygenów aktywujących limfocyty T, estrogenów, zwiększonej ekspresji genu *c-myc*, czynnika wzrostu naskórka, promieniowania γ oraz wielu karcynogenów chemicznych. Z kolei wzrost stężenia wapnia w komórce i metylacja promotora hTERT obniża aktywność telomerazy [7], co sugeruje udział czynników epigenetycznych w procesie regulacji ekspresji tego enzymu.

Wkrótce po odkryciu telomerazy i określeniu jej znaczenia, podjęto próby wykorzystania tej wiedzy w terapii przeciwnowotworowej. Zapoczątkowało to szereg badań mających na celu zahamowanie aktywności enzymu i w wyniku skrócenia telomerów kierowanie komórek nowotworowych na drogę starzenia i apoptozy. Obecnie, dynamicznie i obiecująco rozwijają się badania nad immunoterapią skierowaną przeciwko telomerazie, które osiągnęły w niektórych wypadkach I, II, a nawet III fazę badań klinicznych. Sukcesy w tej dziedzinie opierają się głównie na wykorzystaniu peptydów homologicznych z podjednostką hTERT [5,33]. Istnieje także możliwość blokowania aktywności telomerazy poprzez bezpośrednie zastosowanie chemicznych inhibitorów. Prowadzone są badania nad różnymi, głównie małowzrostkowymi, związkami chemicznymi, które mają selektywnie hamować telomerazę (np. grupa inhibitorów

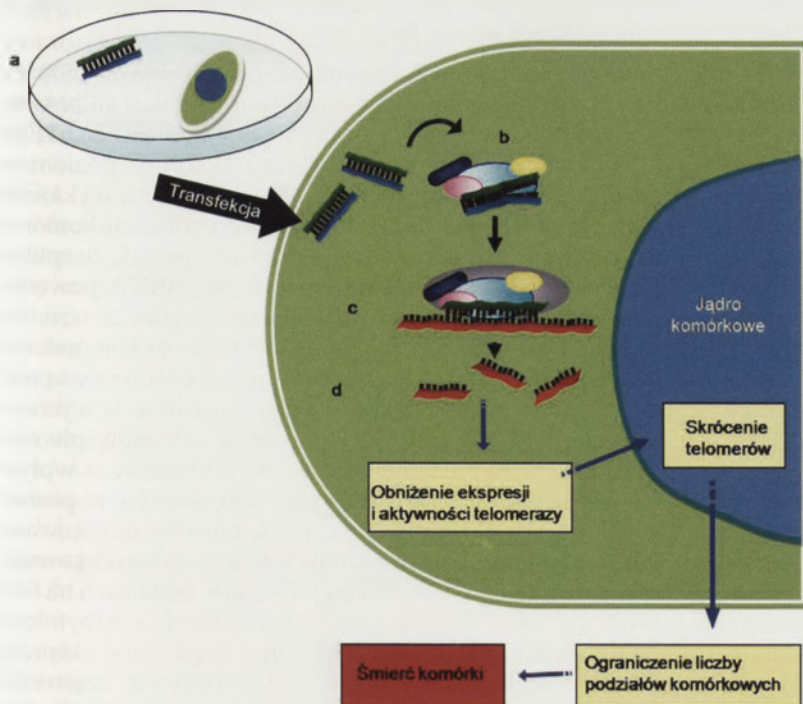
BIBR) lub jej podjednostkę hTERT [34-36]. Szereg prac przynosi również informacje na temat stabilizacji kwadrupleksów z zastosowaniem małych cząsteczek wbudowujących się w struktury G-tetrapleksów i hamujących przyłączanie telomerazy, a przez to odbudowę telomerów [5,37,38]. Aktywność telomerazy może być także zredukowana przez inne związki wbudowujące się w struktury DNA telomerowego, takie jak AZT [5,38]. Możliwe jest również zablokowanie dostępu telomerazy do telomerów, np. poprzez zastosowanie inhibitorów tankyrazy1 [5,39].

Jednak największe nadzieje wiąże się z metodami, które bezpośrednio ingerują w genom komórek nowotworowych, powodując wyciszenie ekspresji genu, a w konsekwencji inaktywację telomerazy. Jedną z pierwszych metod było zastosowanie oligonukleotydów antysensownych (10-20nt), komplementarnych do cząsteczek mRNA, odpowiedzialnych za aktywację RNazy H lub hamowanie translacji poprzez zablokowanie rozpoznania mRNA przez rybosom. Ze względu na toksyczność komórkową oraz niespecyficzne wiązanie endogennych białek przez oligonukleotydy, metoda ta nie znalazła szerszego zastosowania [40,41], mimo że część wyników była bardzo obiecująca. Stwierdzono np., że zastosowanie oligonukleotydów antysensownych skierowanych przeciwko hTR hamuje aktywność telomerazy i zmniejsza dawkę promieniowania koniecznego do skutecznej radioterapii [42]. Duże nadzieje wiąże się też z zastosowaniem modyfikowanych oligonukleotydów antysensownych, które nie wywołują tylu skutków ubocznych, a ich dostarczenie do komórki jest mniej kłopotliwe [5]. Nieco później rozpoczęto badania nad rybozymami, katalitycznymi cząsteczkami RNA swoiście hydrolyzującymi mRNA i uniemożliwiającymi syntezę białka [41]. Rybozomy wymagają jednak użycia relatywnie dużych stężeń,

a ich zastosowanie obarczone jest wysokim ryzykiem niespecyficznego działania [40]. Niemniej jednak zaobserwowano m. in., że degradacja podjednostki hTR w komórkach raka piersi wywołała spadek aktywności telomerazy i indukcję apoptozy [5]. Jako szansę dla terapii genowej uznaje się też zastosowanie genów samobójczych lub genów wirusów odpowiedzialnych za cykl lityczny komórki zwłaszcza w połączeniu z promotorem genu hTERT, który wykazuje wysoką aktywność w komórkach nowotworowych [5].

MECHANIZM DZIAŁANIA siRNA

Wiele badań porównawczych dowiodło, że siRNA znacznie skuteczniej hamuje ekspresję genów niż ma to miejsce w przypadku oligonukleotydów antysensownych czy rybozymów [40]. W ostatnich latach metoda interferencji wzbudza coraz większe zainteresowanie także wśród naukowców pracujących nad blokowaniem telomerazy. Zwraca się uwagę na wysoką specyficzność i wydajność tej metody [40,43]. Wykorzystuje się w niej naturalny proces wyciszania ekspresji genów zależny od dwuniciowego RNA, pełniącego funkcję swego strażnika genów (Ryc. 2).



Rycina 2. Schemat blokowania aktywności telomerazy poprzez zastosowanie interferencji RNA. Transfekcja komórki nowotworowej siRNA (a), formowanie kompleksu RISC w komórce (b), oddziaływanie komplementarnej sekwencji w obrębie mRNA podjednostki telomerazy (c), degradacja mRNA (d).

Cząsteczki siRNA to krótkie 21-23 nukleotydowe fragmenty, posiadające na końcu 3' niesparowane nukleotydy oraz grupę fosforanową na końcu 5' [40-44]. Dwuniciowe RNA (shRNA, ang. *short hairpin RNA*) po dostaniu się do komórki ulega degradacji do postaci siRNA pod wpływem działania enzymu zwanego Dicer. Enzym ten posiada dwie domeny o aktywności RNazyIII, domenę PAZ, domenę helikazy oraz domenę wiążącą dsRNA [40,43-46]. W kolejnym etapie dochodzi do procesu formowania kompleksu wyciszającego RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), podczas którego siRNA ulega rozpleceniu [43]. O tym, która z nici siRNA zostanie związana z RISC decyduje jej struktura i sekwencja nukleotydów [40]. W skład kompleksu RISC wchodzi białka z rodziny Agronaute, białka wiążące dsRNA oraz białka o aktywności helikazy i nukleaz. Po rozpoznaniu przez siRNA komplementarnej sekwencji mRNA, endonukleaza Ago2 (rodzina Argonaute) rozcina mRNA w środkowej części sekwencji komplementarnej do siRNA. W konsekwencji dochodzi do nukleolitycznej degradacji docelowego mRNA [40,43,44]. Cząsteczki siRNA mogą być wprowadzane do komórki z zastosowaniem wektorów wirusowych, plazmidów, liposomów czy też elektroporacji. Opracowywane są także metody wykorzystujące białka zdolne do przenoszenia makromolekuł przez błony komórkowe, w tym m. in. nanocząsteczki, immunosomy i przeciwciała [40,41]. Ekspresja dsRNA w komórce może być także wywołana poprzez syntezę dwóch komplementarnych nici lub sekwencji o strukturze spinki do włosów (shRNA), gdzie dwie komplementarne nici są połączone pętlą zawierającą 3-9 nukleotydów. Wykorzystuje się w tym celu odpowiednie wektory ekspresyjne (plazmidowe lub wirusowe) [41].

siRNA PRZECIWIW TELOMERAZIE

CEL 1 – hTERT mRNA

W badaniach najczęściej próbę zahamowania aktywności telomerazy podejmuje się na drodze wyciszenia podjednostki hTERT. Skuteczność takiego postępowania potwierdzono w szeregu badań prowadzonych np. z wykorzystaniem komórek raka prostaty PC3 i DU145 (obniżenie aktywności telomerazy odpowiednio o 80% i 55%). Wykazano, że zastosowanie cząsteczek siRNA skierowanych przeciwko mRNA kodującemu tę podjednostkę prowadziło do redukcji jego poziomu, a w konsekwencji – do obniżenia poziomu ilości produktu białkowego kodowanego przez ten gen. W rezultacie obserwowano znaczne zahamowanie wzrostu komórek w ciągu kilku dni [47]. Podobnie zahamowanie wzrostu komórek po zastosowaniu siRNA przeciwko hTERT obserwowano w komórkach HT29 [48]. W innych badaniach przeprowadzonych na komórkach raka szyjki macicy (HeLa) transfekowanych za pomocą plazmidu zawierającego siRNA skierowanego przeciwko hTERT, wykazano spadek poziomu mRNA, produkcji białka i zmniejszenie aktywności telomerazy, jakkolwiek nie zaobserwowano zmian we wzroście komórek [49]. Wykazano również, że w komórkach HeLa wyciszenie podjednostki hTERT powodowało zarówno zahamowanie proliferacji komórek, jak i zwiększenie wrażliwości komórek na radioterapię i zasugerowano, że transfekcja siRNA potencjalnie może być stosowana jako terapia wspomagająca [50]. Z kolei w badaniach komórek

nowotworowych żołądka (SGC7901), transfekowanych za pomocą wektora pU6-hTERT-siRNAs specyficznym siRNA, wykazano stałą jego ekspresję, a w efekcie znaczące wyciszenie podjednostki hTERT [51]. Podobne wyniki osiągnięto w badaniach na komórkach wątroby SMMC-7721, gdzie interferencja RNA skierowana przeciw hTERT wywoływała spadek poziomu mRNA i ekspresji genu kodującego hTERT oraz dodatkowo zahamowanie proliferacji komórek w sposób zależny od stężenia siRNA [52]. W tym samym ośrodku potwierdzono skuteczność interferencji RNA, tym razem z zastosowaniem siRNA w komórkach nowotworowych pęcherza moczowego (T24). W badaniach wykazano obniżenie poziomu mRNA podjednostki hTERT (z 99,4 do 53,1%), produkcji białka (z 86,3 do 46,6%) oraz zredukowano wzrost komórek o 37,5% [53]. Analogiczne rezultaty przyniosły badania na komórkach raka pęcherza (T24), gdzie transfekcja wektorem ph2-shRNA wywołała spadek aktywności telomerazy oraz hamowała wzrost nowotworu [54]. Podobnie w komórkach raka krtani (Hep2) odnotowano znaczący spadek aktywności telomerazy, ekspresji genu kodującego hTERT, proliferacji i wzrostu komórek po uprzedniej transfekcji plazmidem niosącym odpowiednio shRNA, pshRNA1 i pshRNA2 [55]. Jak wykazano, w komórkach SEG-1 zastosowanie siRNA przeciwko różnym regionom hTERT mRNA, spowodowało obniżenie produkcji podjednostki telomerazy o 95%, znaczny spadek aktywności enzymu w porównaniu do kontroli (o ok. 77% po 1 dniu i całkowite jej zablokowanie po 3 dniach), zahamowanie wzrostu komórek po 28 dniach (77-85% w porównaniu do kontroli), indukację starzenia, skrócenie telomerów, a w efekcie apoptozę. Dodatkowo, w transfekowanych komórkach wykazano zmianę profilu ekspresji genów uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego (p21, p16, GADD45), apoptozy (FasL, Fas, CARD9, kaspazy 3, 7 i 9), naprawy uszkodzeń DNA (HR23B, p53, p63, p73, E2F1, MDM2) oraz wielu innych, w sumie ok. 600 genów [56].

Badania przeprowadzone na komórkach glejaka (U87MG) z zastosowaniem lentiwirusa w celu transdukcji siRNA doprowadziły do obniżenia ekspresji genu kodującego hTERT oraz aktywności telomerazy (analiza TRAP) do poziomów bliskich dolnej granicy detekcji. Jednocześnie nie wykazano zmian w przebiegu cyklu komórkowego, wzroście komórek czy długości telomerów. Zaobserwowano jednak, że aplikacja wektorów zawierających specyficzne siRNA powodowała zahamowanie wzrostu komórek glejaka *in vivo*. Co więcej, zauważono, że zahamowanie rozwoju komórek następuje w okresie, kiedy zmiany długości telomerów są niewykrywalne. Spostrzeżenie to może sugerować, iż wyciszenie genu kodującego hTERT powoduje zahamowanie rozwoju glejaka niezależnie od długości telomerów, a wpływ ten jest widoczny przed wystąpieniem skutków w postaci ich skrócenia [57]. Brak skrócenia telomerów odnotowano także w badaniach prowadzonych na liniach komórkowych raka prostaty PC-3 i DU134 [47]. Z kolei w badaniach na linii HT29 (komórki kanalikowego gruczolaka odbytnicy), po transfekcji plazmidem posiadającym zdolność ekspresji w komórkach eukariotycznych, zawierającym cząsteczkę shRNA, wykazano zarówno spadek produkcji hTERT i zablokowanie aktywności telomerazy, jak i dramatyczne skrócenie długości telomerów. W rezultacie obserwowano zahamowanie wzrostu i proliferacji komórek [48]. Kluczowym

czynnikiem okazało się kryterium czasu, gdyż, jak zaobserwowano, skrócenie telomerów nie jest wykrywalne w kilka dni po transfekcji, a dopiero po upływie tygodni lub miesięcy (w zależności od linii komórkowej). Wykazano, że w komórkach SEG-1 znaczące skrócenie telomerów nastąpiło po 3 tygodniach od transfekcji [56]. Należy więc zachować ostrożność w interpretacji wyników badania zawartości telomerowego DNA i stosowaniu oceny długości telomerów jako wykładnika skuteczności interferencji. Tym bardziej biorąc pod uwagę istnienie alternatywnych dla telomerazy mechanizmów wydłużania telomerów. Jak udowodniono, na podstawie przeprowadzonej w komórkach HeLa interferencji, możliwe jest długoterminowe tłumienie ekspresji genu kodującego telomerazę poprzez wywołanie stałej ekspresji shRNA w komórkach. Skutkiem tych zabiegów okazał się być spadek produkcji hTERT, znaczne skrócenie telomerów, osłabienie wzrostu komórek oraz wywołanie starzenia komórkowego i apoptozy [58].

WPLYW WYCISZENIA EKSPRESJI GENU KODUJĄCEGO hTERT NA CYKL KOMÓRKOWY

Skuteczność wyciszenia ekspresji genów kodujących podjednostki telomerazy mierzona jest efektywnością zahamowania wzrostu komórek nowotworowych. Ocena cyklu komórkowego w komórkach SMMC-7721 transfekowanych specyficznym siRNA wykazała wzrost ilości komórek w fazie G0/G1 oraz spadek liczby komórek w fazie S [53]. Podobnie, stwierdzono spadek liczebności komórek w fazie S oraz wzrost ilości komórek w fazie G0/G1 w komórkach T24 w wyniku indukcji interferencji specyficznym siRNA [54]. Jak wykazano w badaniach Zhang i wsp. [59] wzrost komórek raka wątroby HepG2 i SMMC-7721 poddanych transfekcji zrekombinowanym plazmidem (p-Silencer 3.1-H1 neo-shTERT) uległ zahamowaniu w fazie G2/M. Zaobserwowano również wzrost ilości komórek w stadium apoptozy, a także wzrost odsetka komórek wykazujących cechy starzenia replikacyjnego w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Co więcej wykazano, iż siRNA zwiększa apoptozę wywołaną przez TRAIL (czynnik martwicy nowotworu indukujący apoptozę) [59]. Z kolei w komórkach SEG-1 (gruczolakorak Barrett'a) apoptozę wykazano w 86% komórek transfekowanych specyficznym siRNA [56]. Co ciekawe, w badaniach komórek płaskonabłonkowego raka jamy ustnej KB wykazano, że transfekcja siRNA powoduje zmniejszenie ekspresji genu na poziomie mRNA, jak i obniżenie syntezy białka, a co za tym idzie – obniżenie aktywności telomerazy. Efekt ten utrzymywał się przez 48h, a proliferacja komórek malała po 48h do 30%. Poziom ten utrzymywał się do 120h i był efektem zahamowania cyklu komórkowego na poziomie przejścia faz G1 i S. Nie obserwowano natomiast wzrostu liczby komórek apoptotycznych [60]. Znaczne zwiększenie liczebności komórek w stadium apoptozy odnotowano z kolei w komórkach wątroby HCCM3 poddanych transfekcji siRNA przeciw hTERT w porównaniu do próby kontrolnej. Zaobserwowano również spadek aktywności telomerazy (o 76% w porównaniu do kontroli) oraz syntezy hTERT [61]. Podobnie, apoptoza została wywołana przez shRNA skierowane przeciw hTERT w komórkach Hep-2 w dwóch badaniach tego samego zespołu [55,62]. Jak wykazano, wskaźnik apoptozy zależał od regionu oddziaływania shRNA. I tak np. w jednej z prac wyka-

zono, iż po 24h ekspozycji na shRNA1 wskaźnik apoptozy wyniósł 32,3%, a po 48h 34,5%, z kolei shRNA2 (skierowane przeciwko innemu regionowi hTERT) wywołało wzrost liczby komórek apoptotycznych do wartości 29,2% i 30,1% (odpowiednio czasy inkubacji 24 i 48h) [62].

CEL II – hTR

Drugą podjednostką, przeciw której najczęściej kierowane jest siRNA, jest podjednostka hTR. Badania takie prowadzone były, m. in., z wykorzystaniem komórek HeLa, gdzie za pomocą adenowirusa transfekowano komórki siRNA pod kontrolą promotora U6, uzyskując znamiennej redukcję poziomu mRNA hTR (79,21%) oraz aktywności enzymu (58,87%) [63]. Osiągnięte efekty sugerują, że podjednostka hTR również może być dogodnym celem dla skutecznej interferencji RNA. Niektóre badania sugerują nawet, iż blokowanie ekspresji genu kodującego hTR jest skuteczniejsze od hamowania genu kodującego hTERT [64]. Z kolei w komórkach nowotworowych nerki (HRCCs) wykazano, że zarówno hTR, jak i hTERT są równie skutecznym celem dla siRNA. Zaobserwowano znaczący spadek poziomu mRNA obu podjednostek, co prowadziło do obniżenia aktywności telomerazy (do 33% dla hTR i 35% dla hTERT) oraz zahamowania proliferacji, a w rezultacie końcowym do – indukcji apoptozy w sposób zależny od stężenia siRNA. Jednoczesne zastosowanie siRNA dla hTR i hTERT nie zwiększało jednak efektu wywieranego przez poszczególne siRNA podawane osobno [65]. W badaniach prowadzonych przez Kościółek i wsp., w których stosowano siRNA skierowane przeciwko hTR lub hTERT w szeregu komórek nowotworowych (HCT15, HeLa, NCIH23, A4311, CCL, HT1080), zaobserwowano zahamowanie aktywności telomerazy w zależności od stężenia zastosowanego siRNA. Spadek aktywności w komórkach mięsaków trwał krócej niż w pozostałych liniach, ale zarówno hTR, jak i hTERT uznano za dogodny cel dla wyciszania telomerazy za pomocą siRNA. Skuteczność interferencji i wyciszania RNA telomerazy potwierdzono, stosując struktury shRNA w celu oceny długoterminowych efektów. Zaobserwowano także, iż powyżej pewnych granicznych stężeń wzrost ilości stosowanego siRNA, jak również powtarzanie dawek nie powodowało wzmocnienia efektu. Mimo że wielu badaczy wykazuje większą skuteczność hamowania hTR, sugeruje się, że wyciszenie podjednostki hTERT daje lepsze wyniki ze względu na większą specyficzność i efektywność hamowania aktywności telomerazy. Jak wykazano, podjednostka hTR występuje także w komórkach prawidłowych, co zmniejsza specyfikę terapii kierowanej przeciw tej podjednostce w odniesieniu do komórek prawidłowych [48].

WPLYW WYCISZENIA GENU KODUJĄCEGO hTR NA CYKL KOMÓRKOWY

Jak wykazano, w komórkach raka nerki HRCCs transfekcja siRNA skierowanym przeciwko podjednostce hTR prowadziła do indukcji apoptozy. Proces ten zaobserwowano w 39% komórek w porównaniu z 10% komórek apoptotycznych w obrębie kontroli. Wykazano także zmniejszenie ilości komórek wykazujących aktywność proliferacyjną o 63% [65]. Podobnie, stwierdzono indukcję apoptozy w przypadku interferencji RNA w komórkach HeLa gdzie wykazano także zahamowanie wzrostu guza (*in vivo*) [63].

Przeprowadzono także badania, w których, poza skuteczną interferencją RNA skierowaną przeciw hTR, prowadzącą do obniżenia ekspresji kodującego ją genu, zahamowania aktywności telomerazy i wzrostu komórek oraz skierowania komórek na drogę apoptozy, wykazano również synergistyczne działanie siRNA z zastosowaniem zmutowanego RNA telomery. W komórkach, w których wcześniej przy użyciu lentiwirusa wywołano nadmierną ekspresję zmutowanego genu kodującego hTR, siRNA ukierunkowane na formę dziką wzmagają proces apoptozy i szybko osłabiało wzrost komórek [17].

INNE SKŁADNIKI KOMPLEKSU JAKO CEL DLA siRNA

W badaniach nad zahamowaniem ekspresji i aktywności telomerazy podjęto także próby zahamowania ekspresji poszczególnych podjednostek kompleksu. Celem terapii stały się również cząsteczki Hsp90 zarówno izoforma α , jak i β . W wyniku uzyskania stabilnej ekspresji siRNA w komórkach, zaobserwowano znaczne obniżenie produkcji Hsp90. Nie zaobserwowano natomiast zmian proliferacji i aktywności telomerazy w porównaniu z kontrolą. Jednakże zahamowanie Hsp90 wywołało skrócenie telomerów, a wyniki te mogą sugerować, że być może Hsp90 jest nie tyle niezbędne do funkcjonowania kompleksu telomerazy, ile do wydłużania telomerów [66].

PODSUMOWANIE

Identyfikacja i poznanie zjawiska interferencji RNA przyczyniło się do poznania i opracowania nowych metod regulacji ekspresji genów. Sposób ich przeprowadzenia i wykorzystania determinowany jest przez takie czynniki, jak trwałość wyciszenia genu docelowego oraz łatwość i efektywność dostarczenia siRNA do docelowej komórki/tkanki z równoczesnym zachowaniem aktywności cząsteczki, a także brakiem występowania efektów ubocznych. Koncepcja wyciszenia genów z zastosowaniem siRNA dała podwaliny licznym badaniom, w tym także nad efektywnym sposobem blokowania ekspresji genu kodującego telomerazę i aktywności tego białka w komórkach nowotworowych. Podjednostką, przeciw której najczęściej kierowane jest specyficzne siRNA, jest podjednostka katalityczna enzymu. W dotychczas przeprowadzonych badaniach istnieją jednak pewne rozbieżności dotyczące wiedzy o skuteczności eliminacji aktywności telomerazy za pomocą transfekcji komórek różnymi cząsteczkami siRNA.

Kompleks telomerazy jest złożony z wielu podjednostek, ale jak dotąd nie udało się udzielić odpowiedzi na pytanie, wyciszenie której podjednostki za pomocą siRNA będzie najbardziej efektywne. Jak się sugeruje skuteczność takiego wyciszenia może być w dużym stopniu uzależniona od rodzaju badanych komórek. Jak wykazano w licznych badaniach *in vitro*, możliwość regulacji aktywności telomerazy wydaje się być jednym ze sposobów zwalczania komórek nowotworowych, jakkolwiek podwyższona aktywność telomerazy w komórkach nowotworowych, choć rozpoznawana jako cecha wysoce swoista, może charakteryzować również niektóre komórki prawidłowe [16-19]. W strategię poszukiwania takiego sposobu doskonale wpisuje się próba zastosowania siRNA do zablokowania ekspresji genów

kodujących składniki kompleksu enzymatycznego telomerazy, a w efekcie końcowym – do zahamowania jej aktywności. Jak wykazano, jest to metoda zarówno efektywna, jak i specyficzna, ale wymagająca jeszcze optymalizacji warunków, podwyższenia specyficzności odpowiedzi, ale i trwałości efektu bez równoczesnego wystąpienia skutków ubocznych. Wykazano istotne znaczenie metody w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, jakkolwiek wciąż wielu autorów postuluje konieczność prowadzenia dalszych badań celem określenia skuteczności metody dla poszczególnych typów nowotworów i rodzajów komórek docelowych.

Badania mające na celu wykorzystanie siRNA w terapii schorzeń weszły już w II, a nawet III fazę kliniczną, nadal pozostaje jednak wiele obaw związanych z tą terapią. W wyniku prowadzonych badań obserwowano bowiem liczne efekty uboczne, m. in. tzw. "off-target", czyli przypadki niespecyficznego oddziaływania siRNA. Jak się postuluje stosowanie interferencji siRNA niesie także ze sobą ryzyko aktywacji układu immunologicznego w sposób zależny od sekwencji (odpowiedź interferonowa i apoptoza). Jak wykazano w badaniach skuteczności siRNA, w organizmie myszy obserwowano poważne uszkodzenia wątroby, a nawet śmierć zwierząt w wyniku zastosowania zbyt dużych dawek siRNA [67]. W badaniach prowadzonych na naczelnym wykazano jednak, że stosowanie techniki transfekcji siRNA do wyciszenia ekspresji genu *ApoB* jest skuteczne i bezpieczne [68], co daje nadzieję na podobne rezultaty w przypadku prób wyciszenia innych genów w tym kodujących podjednostki telomerazy. W nielicznych badaniach *in vivo* dotyczących stosowania siRNA przeciwko podjednostkom telomerazy wykazano, że shRNA-hTERT może być skutecznym inhibitorem proliferacji komórek raka pęcherza [54].

Badając skuteczność i możliwość wykorzystania siRNA, podnosi się też kwestię jego współzawodnictwa z cząsteczkami microRNA o dostęp do elementów kompleksu RISC. Kolejnym problemem do rozwiązania jest bezpieczny sposób podania siRNA czy to na drodze inhalacji (drogą przez błonę śluzową), czy to drogą pokarmową lub za pomocą elektroporacji, mikroiniekcji albo wektorów – plazmidowych lub wirusowych. Na liście chorób, w których zwalczanie angażowane jest siRNA znajdują się już (w co najmniej I fazie klinicznej) m.in.: AMD (zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem), zakażenie RSV (ang. *respiratory syncytial virus*), wirusowe zapalenie wątroby typu C, HIV, AIDS, astma. Planuje się również objąć tą metodą leczenie cukrzycy, a także przeciwdziałanie odrzucaniu przeszczepów [41].

Oczywistym jest, że terapia z wykorzystaniem siRNA skierowanego przeciwko genom kodującym elementy kompleksu telomerazy może być rodzajem terapii wspomagającej w leczeniu nowotworów, co wynika z charakteru i funkcji enzymu. Jak bowiem wykazano, zablokowanie telomerazy w sposób znaczący spowalnia rozwój choroby, mimo że nie zawsze w trybie natychmiastowym eliminuje nowotworowo zmienione komórki [50-58,67]. Niewątpliwie jednak zarówno odkrycie zjawiska interferencji RNA, jak i wykorzystanie tego zjawiska w terapii przeciwnowotworowej czy przeciwwirusowej daje duże nadzieje na lepsze efekty terapeutyczne [69,70].

PIŚMIENNICTWO

1. Szalata M, Słomski R (2000) Zakończenia chromosomów: telomery, telomeraza i białka współdziałające. *Postepy Biol Kom* 14: 95-114
2. Blanco MA (2003) Telomerase and cancer: a tale with many endings. *Curr Opin Genet Dev* 13: 70-76
3. Dettlaff-Pokora A, Schlichtholz B (2003) Alternatywne wydłużanie telomerów. *Postepy Biochem* 49: 147-155
4. Poynter KR, Elmore LW, Holt SE (2006) Telomeres and Telomerase in aging and cancer: lessons learned from experimental model systems. *Drug Discov Today: Disease Models* 3: 155-160
5. Kowalska A, Kowalik A (2006) Telomer i telomeraza w onkogenezie. *Współcz Onkol* 10: 485-496
6. Blackburn EH (2000) The end of the DNA line. *Nat Struct Biol* 7: 847-850
7. Skórzyńska K, Kolano J, Kocki J, Wojciewski J (2003) Białka TRF1/TRF2 i TANK1/TANK2 w regulacji długości telomerów. *Postepy Biol Kom* 30: 201-211
8. Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE (2001) Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet* 10: 677-685
9. Bukowiecka-Matusiak M, Woźniak LA (2006) Struktura DNA od A do Z – biologiczne implikacje różnorodności strukturalnej DNA. *Postepy Biochem* 52: 229-236
10. Huffman KE, Levene SD, Tesmer VM, Shay JW, Wright WE (2000) Telomere shortening is proportional to the size of the 3'-rich telomeric overhang. *J Biol Chem* 275: 19719-19722
11. Halvorsen TL, Leibowitz G, Levine F (1999) Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis. *Mol Cell Biol* 19: 1864-1870
12. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97: 503-514
13. Lo AW, Sabatier L, Fouladi B, Pottier G, Ricoul M, Murnane JP (2002) DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line. *Neoplasia* 4: 531-538
14. Shay JW, Wright WE (2006) Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. *Nat Rev Drug Discov* 5: 577-584
15. Herbert BS, Wright WE, Shay JW (2001) Telomerase and breast cancer. *Breast Cancer Res* 3: 146-149
16. Cong YS, Wright WE, Shay JW (2002) Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 8: 407-425
17. Li S, Rosenberg JE, Donjacour AA, Botchkina IL, Hom YK, Cunha GR, Blackburn EH (2004) Rapid inhibition of cancer cell growth induced by lentiviral delivery and expression of mutant-template telomerase RNA and anti-telomerase short-interfering RNA. *Cancer Res* 64: 4833-4840
18. Saeboe-Larssen S, Fossberg E, Gaudernack G (2006) Characterization of novel alternative splicing sites in human telomerase reverse transcriptase (hTERT): analysis of expression and mutual correlation in mRNA isoforms from normal and tumour tissues. *BMC Mol Biol* 7: 26
19. Dragan M, Roliński J (2001) Ocena długości telomerów i aktywności telomerazy za pomocą cytometrii przepływowowej. *Postepy Biol Kom* 28: 471-481
20. Shay JW, Gazdar AF (1997) Telomerase in the early detection of cancer. *J Clin Pathol* 50: 106-109
21. Nowak J, Lewandowski K, Januszkiewicz D (2000) Rola telomerazy w rozwoju procesu nowotworowego. *Postepy Biol Kom* 14: 143-150
22. Li S, Crothers J, Haqq CM, Blackburn EH (2005) Cellular and gene expression responses involved in the rapid growth inhibition of human cancer cells by RNA interference-mediated depletion of telomerase RNA. *J Biol Chem* 280: 23709-23717
23. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR (1997) Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276: 561-567
24. Bryce LA, Morrison N, Hoare SF, Muir S, Keith WN (2000) Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia* 2:197-201
25. Cong YS, Wen J, Bacchetti S (1999) The human telomerase catalytic subunit hTERT organization of the gene and chromosome synapsis and segregation in yeast. *Hum Mol Genet* 8: 137-142
26. Armbruster BN, Banik SS, Guo C, Smith AC, Counter CM (2001) N-terminal domains of the human telomerase catalytic subunit required for enzyme activity *in vivo*. *Mol Cell Biol* 21: 7775-7786
27. Moriarty TJ, Huard S, Dupuis S, Autexier C (2002) Functional multimerization of human telomerase requires an RNA interaction domain in the N terminus of the catalytic subunit. *Mol Cell Biol* 22: 1253-1265
28. Chen JL, Blasco MA, Greider CW (2000) Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* 100: 503-514
29. Mitchel JR, Collins K (2000) Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell* 6: 361-371
30. Chang JTC, Chen YL, Yang HT, Chen CY, Cheng AJ (2002) Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits. *Eur J Biochem* 269: 3442-3450
31. Forsythe HL, Jarvis JL, Turner JW, Elmore LW, Holt SE (2001) Stable association of hsp90 and p23, but not hsp70, with active human telomerase. *J Biol Chem* 276: 15571-15574
32. Shay JW, Wright WE (1999) Mutant dyskerin ends relationship with telomerase. *Science* 286: 2284-2285
33. Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, George DJ, Hoar KM, Chen DY, Stephani KF, Masutomi K, Loda M, Xia Z, Anderson KS, Hahn WC, Nadler LM (2004) Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumour CD+ T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 10: 828-839
34. Shammas MA, Simmons CG, Corey DR, Shmookler Reis RJ (1999) Telomerase inhibition by peptide nucleic acids reverses 'immortality' of transformed human cells. *Oncogene* 18: 6191-6200
35. Barma DK, Elayadi A, Falck JR, Corey DR (2003) Inhibition of telomerase by BIBR1532 and related analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 13: 1333-1336
36. Damm K, Hemmarin U, Garin-Chesa P, Huel N, Kauffmann I, Pripke H, Nistrój C, Daiber Ch, Enekel B, Guilliard B, Lauritsch I, Muller E, Pascolo E, Sauter G, Pantic M, Martens UM, Wenz Ch, Lingner J, Kraut N, Rettig WJ, Schnapp A (2001) A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J* 20: 6958-6968
37. Gomez D, Mergny JL, Riou JF (2002) Detection of telomerase inhibitors based on G-quadruplex ligands by a modified telomeric repeat amplification protocol assay. *Cancer Res* 62: 3365-3368
38. Raymond E, Sun D, Chen SF, Windle B, Von Hoff DD (1996) Agents that target telomerase and telomeres. *Curr Opin Biotechnol* 7: 583-591
39. Ulaner GA (2004) Telomere maintenance in clinical medicine. *Am J Med* 117: 262-269
40. Majorek M, Guzenda P, Lamparska-Przybysz M, Wiczorek M (2006) Krótkie interferujące RNA w onkologii. *Współcz Onkol* 8: 367-372
41. Gabryelska M, Wyszko E, Nowak S, Żukiel R, Barciszewski J (2006) Zastosowanie technologii interferencji RNA w medycynie. *Neuroskop* 8: 143-159
42. Ji X, Xie C, Fang M, Zhou F, Hang W, Hang M, Zhou Y (2006) Efficient inhibition of human telomerase activity by antisense oligonucleotides sensitizes cancer cells to radiotherapy. *Acta Pharmacol Sin* 27: 1185-1191
43. Wesołowska A (2004) Wykorzystanie małych interferujących RNA do hamowania ekspresji genów w komórkach ssaków- zastosowanie w neurobiologii. Konferencja „Nowe metody w neurobiologii” 7-12
44. Markocki Z, Figlerowicz M (2006) Krótkie interferencyjne RNA działające in trans. *Postepy Biochem* 52: 253-258
45. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811
46. Aravin AA, Naumova NM, Tulina AV, Vagin VV, Rozovsky YM, Gvozdev VA (2001) Double-stranded RNA-mediated silencing of

- genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr Biol* 11: 1017-1027
47. Gandellini P, Folini M, Bandiera R, De Cesare M, Binda M, Veronese S, Daidone MG, Zunino F, Zaffaroni N (2007) Down-regulation of human telomerase reverse transcriptase through specific activation of RNAi pathway quickly results in cancer cell growth impairment. *Biochem Pharmacol* 73: 1703-1714
 48. de Souza Nascimento P, Alves G, Fiedler W (2006) Telomerase inhibition by an siRNA directed against hTERT leads to telomere attrition in HT29 cells. *Oncol Rep* 16: 423-428
 49. Li Y, Li M, Peng Y, Jiang Z, Li W, Li H (2006) Suppression of telomerase activity by plasmid-mediated RNA interference. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 23: 615-619
 50. Wang R, Lin F, Wang X, Gao P, Dong K, Wei SH, Cheng SY, Zhang HZ (2007) The therapeutic potential of survivin promoter-driven siRNA on suppressing tumor growth and enhancing radiosensitivity of human cervical carcinoma cells via downregulating hTERT gene expression. *Cancer Biol Ther* 6: 1295-1301
 51. Ma JP, Zhan WH, Wang JP, Peng JS, Gao JS, Yin QW (2004) Specific inhibition of hTERT gene expression by short interfering RNAs in gastric cancer SGC7901 cell. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 42: 1372-1376
 52. Zheng SJ, Xia Y, Ren H, Zhong S, Yang Y, Tao P, Wang SQ (2004) The anti-cancer effect of siRNA targeting human telomerase reverse transcriptase in SMMC-7721 cells. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 12: 530-533
 53. Zhang PH, Tu ZG, Yang MQ, Huang WF, Zou L, Zhou YL (2004) Experimental research of targeting hTERT gene inhibited in hepatocellular carcinoma therapy by RNA interference. *Ai Zheng* 23: 619-625
 54. Zou L, Zhang P, Luo C, Tu Z (2006) shRNA-targeted hTERT suppress cell proliferation of bladder cancer by inhibiting telomerase activity. *Cancer Chemother Pharmacol* 57: 328-334
 55. Chen SM, Tao ZZ, Xiao BK, Pan S, Liu D, Chi HM (2005) Inhibition of growth and proliferation of Hep-2 cells by targeting human telomerase reverse transcriptase mRNA using RNA interference technology. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 34: 796-800
 56. Shammas MA, Koley H, Bachu R, Berthau RC, Protopotom A, Munshi NC, Goyal RK (2005) Telomerase inhibition by siRNA causes senescence and apoptosis in Barrett's adenocarcinoma cells: mechanism and therapeutic potential. *Mol Cancer* 4: 24
 57. Zhao P, Wang C, Fu Z, You Y, Cheng Y, Lu X, Lu A, Liu N, Pu P, Kang C, Salford LG, Fan X (2007) Lentiviral vector mediated siRNA knock-down of hTERT results in diminished capacity in invasiveness and in vivo growth of human glioma cells in a telomere length-independent manner. *Int J Oncol* 31: 361-368
 58. Kurvinen K, Syrjanen S, Johansson B (2006) Long-term suppression of telomerase expression in HeLa cell clones, transfected with an expression vector carrying siRNA targeting hTERT mRNA. *Int J Oncol* 29: 279-288
 59. Zhang RG, Fang DC, Luo YH, Guo LP (2006) Effects of hTERT RNAi on apoptosis of hepatocellular carcinoma cells induced by TRAIL. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 14: 435-440
 60. Yang ZQ, Chen GS, Chen JK, Wu ZL, Lei YX (2004) Telomerase siRNA inhibits KB cell growth in human oral squamous cell carcinoma. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 39: 376-378
 61. Lu XD, Qin WX, Pan DN, Li JJ, Wan DF, Wen CJ, Li CJ, Gu JR, Yang SL (2004) A DNA vector-based RNAi technology to inhibit the activity of the telomerase of cell line HCCLM3. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 84: 1381-1385
 62. Chen SM, Tao ZZ, Hua QQ, Liu D, Chi HM, Cai Q (2006) Inhibition of human telomerase reverse transcriptase in Hep-2 cells using short hairpin RNA expression vectors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132: 200-205
 63. Li Y, Li H, Yao G, Li W, Wang F, Jiang Z, Li M (2007) Inhibition of telomerase RNA (hTR) in cervical cancer by adenovirus-delivered siRNA. *Cancer Gene Ther* 14: 748-755
 64. Natarajan S, Chen Z, Wancewicz EV, Monia BP, Corey DR (2004) Telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and telomerase RNA (hTR) as targets for downregulation of telomerase activity. *Oligonucleotides* 14: 263-273
 65. Zheng JN, Sun YF, Pei DS, Liu JJ, Chen JC, Li W, Sun XQ, Shi QD, Han RF, Ma TX (2006) Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human renal carcinoma cells by anti-telomerase small interfering RNAs. *Acta Biochim Biophys Sin* 38: 500-506
 66. Campton SA, Elmore LW, Haydu K, Jackson-Cook CK, Holt SE (2006) Induction of nitric oxide synthase-dependent telomerase shortening after functional inhibition of Hsp90 in human tumor cells. *Mol Cell Biol* 26: 1452-1462
 67. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441: 537-541
 68. Choi C (2006) RNAi works in monkeys. <http://www.the-scientist.com/news/display/23250>
 69. Cheng J, Tao ZZ, Xiao BK, Duan HC, Chen SM (2006) Targeting hTERT gene influenced the viability on hMSCs by small hairpin RNA. *Wei Sheng Yan Jiu* 35: 564-566
 70. Xia Y, Lin RX, Zheng SI, Yang Y, Bo XC, Zhu DY, Wang SQ (2005) Effective siRNA targets screening for human telomerase reverse transcriptase. *World J Gastroenterol* 11: 2497-2501

siRNA targeting telomerase – effective tool in anti-cancer therapy?

Błażej Rubiś, Anna Półrolniczak, Maria Rybczyńska

Poznan University of Medical Sciences, Department of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 49 Przybyszewskiego St., 60-35 Poznan, Poland

e-mail: mrybczyn@ump.edu.pl

Key words: telomerase, telomer, siRNA, cancer, telomerase reverse transcriptase, anti-cancer therapy

ABSTRACT

Telomeres are guanine-rich repeated sequences located at the ends of chromosomes. The loss of telomeric repeats after each cell division may function as a biological clock limiting the cell proliferation ability. Telomerase is a RNA-dependent DNA polymerase that synthesizes telomeric DNA and thus enables cancer cells an unlimited proliferative potential. Human telomerase is a ribonucleoprotein complex composed of reverse transcriptase – hTERT, RNA component – hTR (functioning as a template for the telomeric DNA addition) and associated proteins. Telomerase activity is present in most malignant cells but undetectable in most normal cells. The enzyme and its altered activity distinguishing cancer cells, is an attractive molecular target for anti-cancer therapy. One of the most promising methods for modulation of the telomerase activity is RNA interference. Many investigators showed that targeting different subunits of telomerase (mainly hTERT) with siRNA had inhibitory effects on expression and activity of the enzyme and cells proliferation. siRNA targeting telomerase has the possibility to become effective anti-cancer agent especially in an adjuvant therapy.

Molekularne odpowiedzi aparatu fotosyntetycznego roślin na długoterminowe zmiany natężenia światła

STRESZCZENIE

W odpowiedzi na długoterminową zmianę (co najmniej 1–3 h) natężenia światła struktura i funkcje aparatu fotosyntetycznego roślin ulegają modulacjom, których sensem fizjologicznym jest dążność do utrzymania, w zmienionych warunkach oświetleniowych, równowagi pomiędzy ilością energii wzbudzenia elektronowego docierającej za pośrednictwem anten energetycznych do centrów reakcji fotosystemów a ilością energii wzbudzenia elektronowego, wykorzystywaną w formie transportu elektronów i reakcji ciemnych fotosyntezy. W odpowiedzi na długoterminowy wzrost natężenia światła dochodzi do osłabienia intensywności przeniesienia energii wzbudzenia elektronowego przez główny kompleks zbierający światło fotosystemu II (LHCII) i jednocześnie wzmocnienia intensywności fotosyntetycznego transportu elektronów i reakcji ciemnych fotosyntezy. Reakcja na poziomie LHCII polega na zmniejszeniu udziału tej anteny wśród kompleksów barwnikowo-białkowych błony tylakoidowej, a wydarzenia regulacyjne dotyczą ekspresji genów kodujących apoblika LHCII lub/i biosyntezy chlorofilu *b*. Reakcja na poziomie fotosyntetycznego transportu elektronów obejmuje, między innymi, wzrost puli cytochromu *f*, plastochinonu (PQ) i aktywności katalitycznej ATPazy. Z kolei intensywność reakcji ciemnych fotosyntezy wzrasta w rezultacie uruchomienia szlaków sygnalizacyjnych wiodących do wzrostu puli oraz aktywności katalitycznej rubisco i innych enzymów cyklu Calvina.

WPROWADZENIE

Natężenie i skład spektralny światła, które stanowi dla roślin źródło energii promienistej, niezbędnej dla procesu fotosyntezy, może zmieniać się w bardzo szerokim zakresie. Fluktuacje natężenia światła mogą w naturalnym środowisku zachodzić w zróżnicowanej skali czasowej, od trwających kilka sekund do wielodniowych. Krótkoterminowe zmiany natężenia światła docierającego do liścia mogą być konsekwencją niestabilności pokrywy chmur, względnie zasłaniania i odsłaniania przez inne liście (tej samej lub sąsiedniej rośliny) wskutek zmian siły i kierunku wiatru. Z kolei zmiany długoterminowe są uwarunkowane głównie rytmemi sezonowymi i dobowymi, a także zasłanianiem i odsłanianiem liści w konsekwencji trwałych zmian morfologii sąsiednich roślin. Inną przyczyną długoterminowych zmian natężenia światła może być znalezienie się rosnących liści w strefie cienia rzucanego przez nieruchome obiekty nieożywione (np. skały). Pojęcie „zmiany krótkoterminowe” i „zmiany długoterminowe” nie są ściśle zdefiniowane, ale przyjmuje się, że granicę między jednym i drugim przedziałem wyznacza czas ok. 1–3 h [1].

Ogromny sukces ewolucyjny jaki osiągnęły rośliny opanowując środowiska skrajnie różniące się warunkami oświetleniowymi, związany jest z wykształceniem szerokiej gamy mechanizmów umożliwiających skuteczną odpowiedź zarówno na krótko-, jak i długoterminowe zmiany natężenia (a także składu spektralnego światła). Odpowiedzi na długoterminowe zmiany natężenia światła tradycyjnie dzieli się na takie, które realizowane są na poziomie całej rośliny, na poziomie liścia oraz na poziomie aparatu fotosyntetycznego [2]; przedmiotem niniejszego opracowania jest przegląd stanu wiedzy na temat molekularnych podstaw odpowiedzi na poziomie aparatu fotosyntetycznego.

Badania zmierzające do wyjaśnienia mechanizmów leżących u podstaw odpowiedzi na zmiany natężenia światła rzadko wykonuje się na roślinach rosnących w ich naturalnym środowisku, w niszach o zróżnicowanym poziomie natężenia światła. Zdecydowanie przeważają ilościowo studia odnoszące się do roślin hodowanych w kontrolowanych warunkach (w komorach fitotronowych). Najczęściej stosowanym modelem badawczym są populacje roślin hodowanych (aż do osiągnięcia przez liście fazy dojrzałości) w warunkach ekspozycji na światło o określonym natężeniu, a następnie aklimatyzowane w różnym czasie (krótkie lub długie okresy) do światła o natężeniu zmienionym (obniżonym lub podwyższonym). Innym, stosowanym rzadziej, modelem badawczym są populacje roślin hodowanych w komorach fitotronowych w warunkach ekspozycji

Małgorzata Adamiec

Grzegorz Jackowski[✉]

Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

[✉]Zakład Fizjologii Roślin; Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań; tel.: (061) 829 58 91, e-mail: grzesiek@amu.edu.pl

Artykuł otrzymano 20 listopada 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 6 marca 2008 r.

Słowa kluczowe: fitochrom, LHCII, natężenie światła, promotor, rubisco, sygnalizacja retrogradowa

Wykaz skrótów: bHLH – rodzina czynników transkrypcyjnych zawierających strukturę helisa-skręt-helisa ze znacznym udziałem aminokwasów o charakterze zasadowym; chl – chlorofil; HIR – reakcje na światło o wysokim natężeniu; LFR – reakcje na światło o niskim natężeniu; LHCII – główny kompleks zbierający światło fotosystemu II; LRE – elementy odpowiedzi na światło; PET – fotosyntetyczny transport elektronów; PSII – fotosystem II; PQ/PQH₂ – utleniony/zredukowany plastochinon; VLFR – reakcje na światło o bardzo niskim natężeniu

na światło o zróżnicowanym natężeniu. Pojęcia „ światło o podwyższonym natężeniu” i „światło o obniżonym natężeniu”, często używane przez Autorów pracy w jej dalszej części, nawiązują do pierwszego z dwóch modeli badawczych wymagających użycia komór fitotronowych. Pojęcia te oznaczają światło, które dojrzałym liściom roślin wyhodowanych w komorze fitotronowej w określonych warunkach świetlnych jest aplikowane w okresie ich aklimatyzacji do nowych warunków. Natężenie tego światła jest, odpowiednio, wyższe lub niższe od tego, przy którym roślina została wyhodowana.

ODPOWIEDZI NA DŁUGOTERMINOWE ZMIANY NATĘŻENIA ŚWIATŁA NA POZIOMIE LHCI

Już w latach osiemdziesiątych ubiegłego stulecia zauważono, że wraz z podwyższaniem natężenia światła, na które rośliny są ekspozycjonowane podczas hodowli w komorze fitotronowej, spada względny udział LHCI wśród kompleksów barwnikowo-białkowych błony tylakoidowej [3]. Obserwowany efekt wiązany był ze spadkiem puli tzw. „subpopulacji peryferycznej” LHCI. Wykazano mianowicie, że jej udział w całkowitej puli LHCI u roślin ekspozycjonowanych na niskie natężenie światła wynosi około 70%, podczas gdy w warunkach ekspozycji roślin na wysokie natężenie światła udział ten spada do około 58% [4]. Tożsamość biochemiczna „subpopulacji peryferycznej” LHCI pozostaje niewyjaśniona. Sugeruje się, że w błonach tylakoidowych szpinaku tę podjednostkę współtworzy grupa trimerycznych subkompleksów LHCI charakteryzujących się niskimi wartościami pI [5]. Uważa się, że sensem fizjologicznym spadku wielkości puli LHCI w odpowiedzi na ekspozycję na światło o podwyższonym natężeniu jest zmniejszenie ilości tego kompleksu przypadającego na pojedynczy kompleks rdzeniowy PSII. Ma to prowadzić do ograniczenia ilości energii wzbudzenia elektronowego przenoszonego do centrów reakcji PSII i tym samym zmniejszenia ryzyka fotouszkodzenia PSII.

REGULACJA AKUMULACJI TRANSKRYPTÓW *LHCB* OBEJMUJĄCA SZLAKI SYGNALIZACYJNE INICJOWANE PRZEZ ODDZIAŁYWANIE ŚWIATŁO:FOTORECEPTOR

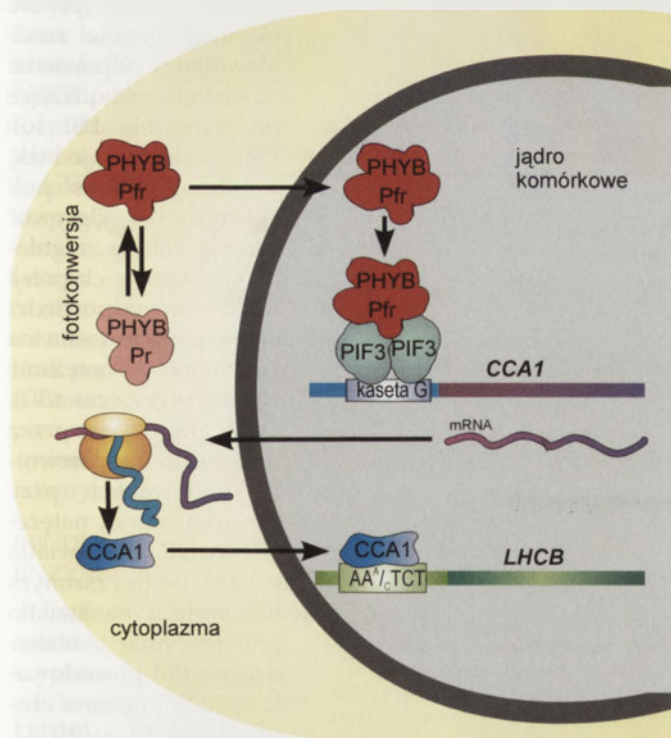
Według jednej z hipotez wielkość puli LHCI regulowana jest w odpowiedzi na długoterminowe natężenia światła na poziomie akumulacji transkryptów *LHCB*, tzn. jądrowych genów kodujących apobiałka LHCI. Hipoteza ta znajduje potwierdzenie w obserwacjach wykazujących, iż poziom transkryptów apobiałek LHCI spada w odpowiedzi na światło o podwyższonym natężeniu. Wykorzystując technikę „Northern blotting”, u rzodkiewnika stwierdzono spadek poziomu transkryptów *LHCB1* w odpowiedzi na długoterminową (24h) ekspozycję na podwyższone natężenie światła [6]. W ostatnich latach do badań nad modulacją poziomu transkryptów *LHCB* w odpowiedzi na zmieniające się natężenie światła wykorzystuje się technikę mikro-macierzy DNA. W jednej z prac należących do tego nurtu przeanalizowano zmiany poziomu ekspresji 7000 genów rzodkiewnika w odpowiedzi na trwającą 3 h ekspozycję siewek na światło o podwyższonym natężeniu i zaobserwowano osłabienie poziomu ekspresji czterech genów kodujących apobiałka typu *LHCB* 1 (*LHCB1.2*, *LHCB1.3*, *LHCB1.4* i *LHCB1.5*) oraz dwóch genów kodujących apobiałka typu

LHCB 2 (*LHCB2.1* oraz *LHCB2.2*) [7]. Spadek poziomu ekspresji *LHCB1* i *LHCB2* zaobserwowali również autorzy w innej pracy, analizującej zmiany poziomu ekspresji 6500 genów w odpowiedzi na trwającą 3 h ekspozycję na podwyższone natężenie światła, nie generujące stresu świetlnego; obserwacja ta dotyczyła *LHCB1.3*, *LHCB1.5*, *LHCB2.2* i *LHCB2.4* [1].

Ustalono, że mechanizmy regulacji transkrypcji genów kodujących apobiałka LHCI w odpowiedzi na długoterminowe zmiany natężenia światła mogą obejmować „klasyczne” dla roślin szlaki przekazywania sygnału inicjowane przez oddziaływanie światło:fotoreceptor. Jednym z fotoreceptorów biorących udział w regulacji transkrypcji genów kodujących apobiałka LHCI jest fitochrom. Chromoproteid, jakim jest fitochrom, występuje w formie homodimeru przyjmującego dwie fotoodwracalne konformacje: „Pr”- forma absorbująca światło czerwone i „Pfr”- forma absorbująca światło dalekiej czerwieni. Częsteczki fitochromu roślin wyższych przejawiają aktywność kinaz serynowo-treoninowych. Pojedynczy polipeptyd ma masę cząsteczkową około 125 kDa i pozostaje związany kowalencyjnie z cząsteczką chromoforu – fitochromobiliny. Domena N-końcowa polipeptydu odpowiada za percepcję bodźca świetlnego, podczas gdy domena C-końcowa odpowiedzialna jest za dimeryzację białka i przekazywanie informacji o odebraniu bodźca do kolejnych cząsteczek szlaku przekazywania sygnału [8]. Częsteczki fitochromu biorą udział w regulacji poziomu ekspresji genów poprzez trzy typy reakcji: VLFR, LFR i HIR. Reakcje typu VLFR uruchamiane są w odpowiedzi na pulsy światła czerwonego lub światła dalekiej czerwieni o natężeniu od 0,001 do 1 μ moli kwantów światła \times $m^{-2} s^{-1}$. Z kolei do reakcji typu LF dochodzi w wyniku ekspozycji rośliny na światło o natężeniu mieszczącym się w przedziale od 1 do 1000 μ moli kwantów światła \times $m^{-2} s^{-1}$, a reakcje typu HIR są uruchamiane w odpowiedzi na kontakt rośliny z natężeniem światła powyżej 1000 μ moli kwantów światła \times $m^{-2} s^{-1}$ [9]. W reakcjach typu VLFR i LFR aktywną formę fitochromu stanowi Pfr, a w reakcjach typu HIR elementem aktywnym fizjologicznie jest krótkotrwały półprodukt powstający w czasie fotokonwersji Pfr do Pr [10].

Regulacja poziomu ekspresji genów z rodziny *LHCB* następuje głównie jako element reakcji typu LFR lub VLFR, dotyczy to w szczególności *LHCB1.1*, *LHCB1.4* i *LHCB2.1* [11,12]. U rzodkiewnika, spośród pięciu scharakteryzowanych dotychczas produktów genów kodujących apobiałka fitochromu (*PHYA-PHYE*) [13], kluczową rolę w regulacji poziomu ekspresji genów z rodziny *LHCB* odgrywają *PHYA* i *PHYB*. W reakcjach typu VLFR głównym fotoreceptorem uczestniczącym w ścieżce przekazywania sygnału jest *PHYA*, natomiast w reakcjach typu LFR – *PHYB* [9]. W ścieżce przekazywania sygnału prowadzącej od *PHYB* (a także od *PHYA*) do modulacji poziomu ekspresji *LHCB*, istotną rolę odgrywają czynniki transkrypcyjne PIF3 i CCA1. Ustalono, że forma Pfr *PHYB* może specyficznie i fotoodwracalnie oddziaływać na terenie nukleoplazmy z PIF3 (należącym do czynników transkrypcyjnych z rodziny bHLH) skompleksowanym w formie dimeru z promotorami genów kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny Myb [14-16]. Motywem rozpoznawanym przez PIF3 jest kasetta typu G (CACGTG), jeden z szerszej grupy elementów obecnych w promotorach genów,

których transkrypcja jest regulowana przez światło (LRE) [17]. Oddziaływanie to prowadzi do aktywacji transkrypcji stosownych genów. Jednym z genów, których ekspresja podlega tego rodzaju regulacji jest *CCA1*. Produkt tego genu reguluje z kolei ekspresję genów z rodziny *LHCB* poprzez oddziaływanie z odnalezioną w promotorach *LHCB* sekwencją AAA/CTCT, należąca do LRE [9,18] (Ryc. 1). W ścieżce transdukcji sygnału, w której pośredniczy *PHYA*, zaangażowany może być ponadto czynnik transkrypcyjny *HFR1* należący do rodziny *bHLH*. Białko to funkcjonuje jako pozytywny sygnał regulatorowy w formie homodimeru lub heterodimeru z *PIF3*. W promotorze genu *LHCB1.1* rzodkiewnika zidentyfikowano również dwa inne elementy biorące udział w zależnej od fitochromu ścieżce transdukcji sygnału: *cis*-element regulacyjny o rdzeniowej sekwencji ACGT, oddziałujący z czynnikiem transkrypcyjnym *CUF-1* oraz motyw o długości 78pz, zawierający zachowane w ewolucji kasyety *GATA*, rozpoznawany przez czynnik transkrypcyjny *CGF-1* [19]. U *Lemna gibba* za zależną od światła czerwonego regulację poziomu ekspresji *LHCB2.1* odpowiedzialne są z kolei dwie sekwencje o długości 10pz, z których jedna zawiera motyw AACCAA, druga natomiast motyw CGGATA [20]. Oba motywy są zachowane w ewolucji i występują w wielu sekwencjach promotorowych genów z rodziny *LHCB* roślin wyższych, między innymi u rzodkiewnika w promotorach genów *LHCB1.1*, *LHCB1.2* i *LHCB1.3*, u grochu w promotorach: *LHCB 1.2*, *LHCB1.3*, *LHCB1.4* oraz *LHCB2.1*, a także u pszenicy i kukurydzy w promotorze *LHCB1.1* [21].



Rycina 1. Hipotetyczny mechanizm kontroli ekspresji *LHCB* przez *PHYB* (według [9], zmienione). W reakcjach typu LFR-*PHYB* ścieżkę przekazywania sygnału, prowadzącą od formy Pfr *PHYB* do zmienionej ekspresji *LHCB*, inicjuje specyficzne oddziaływanie Pfr *PHYB* z czynnikiem transkrypcyjnym *PIF3* (rodzina *bHLH*). W oddziaływanie to wchodzi dimeryczne cząsteczki *PIF3* tworzące kompleksy z promotorami genów kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny *Myb*, w tym z promotorem *CCA1*. Oddziaływanie prowadzi do aktywacji transkrypcji *CCA1*, a motywem rozpoznawanym przez *PIF3* jest kaseeta typu G (CACGTG). Produkt białkowy *CCA1* aktywuje transkrypcję genów z rodziny *LHCB* poprzez oddziaływanie w obrębie promotora z sekwencją AAA/CTCT.

U niektórych gatunków roślin *LHCB1-3* pozostają również pod kontrolą światła niebieskiego. Wydarzenia regulacyjne rozgrywają się zarówno na poziomie transkrypcyjnym, jak i dotyczą poziomu stabilności mRNA, jednak wszystkie istniejące dane odnoszą się do reakcji na pulsy o różnym natężeniu, a nie na długoterminowe zmiany natężenia światła niebieskiego [22,23].

REGULACJA AKUMULACJI TRANSKRYPTÓW *LHCB* OBEJMUJĄCA SZLAKI SYGNALIZACYJNE INICJOWANE PRZEZ SYGNAŁY CHLOROPLASTOWE

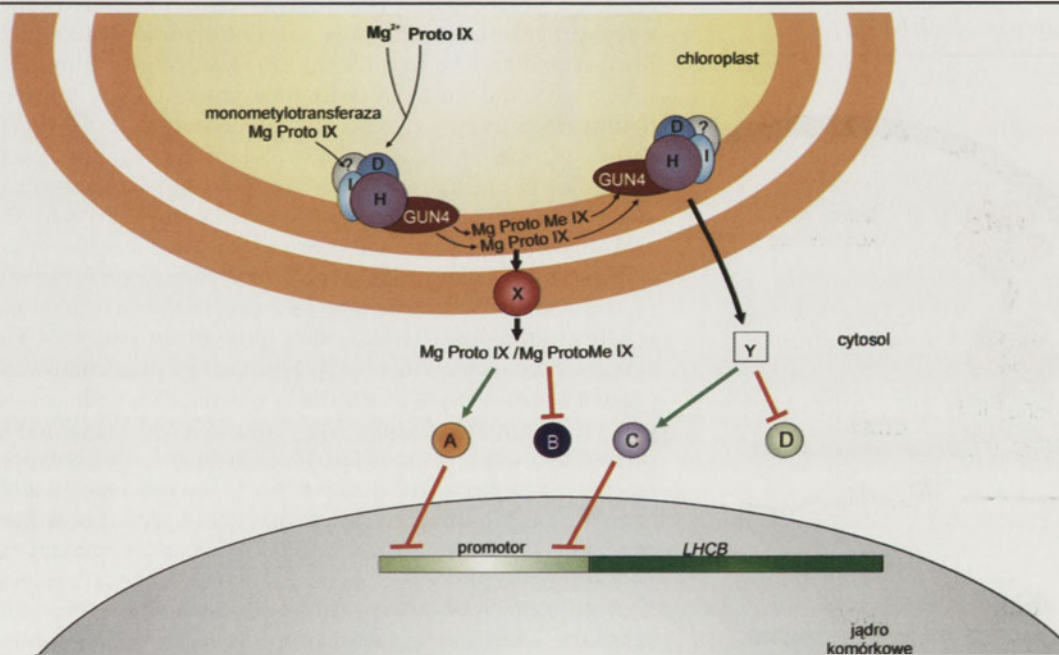
Poziom ekspresji genów kodujących apobiałka *LHCII* podlega regulacji także przez sygnały pochodzenia chloroplastowego (sygnały retrogradowe), z wykorzystaniem mechanizmów nie inicjowanych przez typowe oddziaływania światło:fotoreceptor. Jednym z lepiej poznanych sygnałów retrogradowych jest prekursor metaboliczny chlorofilu, a mianowicie ester metylowy magnezoproporfiryny IX (*Mg ProtoMe IX*). Wykazano, że akumulacja *Mg ProtoMe IX* w komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* wywołana traktowaniem czynnikami blokującymi syntezę chlorofilu prowadzi do obniżenia poziomu akumulacji mRNA genów *LHC* [24]. Taki sam efekt obserwowano także u roślin wyższych – *Lepidium sativum* [25] oraz rzodkiewnika [26]. Udział *Mg ProtoMe IX* (a także jego bezpośredniego prekursora metabolicznego – magnezoproporfiryny IX, *Mg Proto IX*) w regulacji poziomu ekspresji potwierdzają również badania z wykorzystaniem mutantów *gun (1-5)* rzodkiewnika [27]. Brak sygnalizacji retrogradowej sprawia, że u tych mutantów fotouszkodzenie plastydów nie prowadzi, jak w przypadku roślin typu dzikiego, do zahamowania transkrypcji genów z rodziny *LHCB*. Ustalono, że *GUN5* koduje podjednostkę H chelatazy Mg^{2+} – enzymu katalizującego reakcję przekształcenia protoporfiryny IX do *Mg Proto IX*, zlokalizowanego w wewnętrznej błonie otoczki chloroplastowej [28]. Z kolei produkt *GUN4* aktywuje podjednostkę H, a *GUN2* i *GUN3* związane są z przekształcaniem hemu w fitochromobilinę (*GUN2* koduje oksygenazę hemu, *GUN3* syntazę fitochromobiliny) [29]. Mechanizm przekazywania sygnału, prowadzący do zmiany poziomu ekspresji genów w wyniku zmian poziomu *Mg Proto IX* i *Mg ProtoMe IX*, pozostaje nieznany. Istniejące dane doświadczalne pozwalają poważnie rozważać dwa możliwe szlaki przekazywania sygnału [30,31]; obydwa przypisują istotną rolę podjednostce H chelatazy Mg^{2+} oraz białku *GUN4*, które wydają się pełnić funkcję głównego „sensora” zmian stężenia magnezoproporfiryn w otoczce chloroplastowej, być może jako składniki kompleksu obejmującego ponadto monometylotransferazę *Mg Proto IX* i inne enzymy. Jeden z możliwych szlaków byłby inicjowany przez wydobycie się *Mg Proto IX* i *Mg ProtoMe IX* z chloroplastu do cytosolu gdzie – być może poprzez oddziaływanie z nieznanymi czynnikami – dochodziłoby do ciągu reakcji wiodących do aktywacji represora lub dezaktywacji aktywatora transkrypcji *LHCB*. Alternatywny scenariusz obejmuje oddziaływanie *Mg Proto IX* i *Mg ProtoMe IX* z hipotetycznym kompleksem otoczki chloroplastowej składającym się z podjednostki H chelatazy Mg^{2+} (oraz, być może, cząsteczek innych enzymów) i *GUN4*. Oddziaływanie takie miałoby prowadzić do uruchomienia w cytosolu ciągu reakcji kończących się także aktywacją represora lub dezaktywacją aktywatora transkrypcji *LHCB*.

Istotną różnicą w stosunku do pierwszego z możliwych szlaków jest fakt, że Mg Proto IX i Mg ProtoMe IX pozostają wewnątrz chloroplastu (Ryc. 2).

Dalszych danych na temat tożsamości chloroplastowych sygnałów retrogradowych uczestniczących w regulacji ekspresji apobiałek LHCII dostarczyły badania nad mutantem *laf6* rzodkiewnika (obniżona reaktywność na ciągłe oświetlenie daleką czerwienią), charakteryzującym się osłabieniem poziomu ekspresji genów z rodziny *LHCB*. Ustalono, że *laf6* mapuje się w genie *AtNAP1* kodującym białko zlokalizowane w stromie chloroplastu, wykazujące znaczną homologię do nie związanych integralnie z błonami transporterów typu ABC cyjanobakterii i glonów [32,33]. Mutant *laf6* charakteryzuje się obniżoną zdolnością do syntezy chlorofilu, która zostaje zatrzymana na etapie protoporfiryny IX (Proto IX). Następujące w wyniku akumulacji Proto IX zmiany poziomu ekspresji genów *LHCB* wskazują na udział także tego prekursora chlorofilu w sygnalizacji retrogradowej na szlaku chloroplast-geny kodujące apobiałka LHCII [32]. *AtNAP1* jest Fe-zależną ATP-azą, której nieobecność u mutantu *laf6* prowadzi do wzrostu stężenia Fe na terenie stromy i do akumulacji Proto IX. Przyczyną tych zmian jest prawdopodobnie zakłócenie stanu równowagi między intensywnością syntezy chlorofilu i hemu, wynikające ze zmian aktywności zawierających centra Fe-S enzymów szlaku biosyntezy tetrapiroli [33].

W regulacji poziomu ekspresji genów *LHCB* w odpowiedzi na zmiany natężenia światła biorą udział również chloroplastowe sygnały redoks, odzwierciedlające intensywność PET. Wykazano, że u glonu *Dunaliella tertiolecta* poziom ekspresji genów *LHCB* jest zależny od statusu redoks puli PQ [34]. W hodowanych w warunkach stałego natężenia światła koloniach tej zieleńcy całkowite utlenienie puli PQ wskutek podania 3-(3-4-dichlorofenyl)-1,1-dimetylo mocznika (DCMU), powodowało w ciągu 12 h ponad dwukrotny wzrost poziomu transkryptów *LHCB*, imitując efekt występujący podczas aklimatyzacji do obniżonego natężenia światła. Podanie koloniom glonów 2,5-dibromo-3-metylo-6-izopropyl-p-benzochinonu (DBMIB), prowadzące do całkowitej redukcji puli PQ, powodowało 75% spadek poziomu transkryptów *LHCB*, imitując efekt następujący podczas aklimatyzacji do podwyższonego natężenia światła. Wyniki te wskazują na stymulację transkrypcji *LHCB* przez PQ i jej hamowanie przez PQH_2 [34]. Przypuszcza się, że przekazywanie sygnału pochodzącego od statusu redoks puli PQ do jądra odbywa się z udziałem kaskady fosforylacyjnej, a mianowicie PQH_2 miałby aktywować kinazę fosforylującą niezidentyfikowane białko efektorowe błony tylakoidowej, co w konsekwencji prowadziło do jego przejścia w formę rozpuszczalną. Białko to przedostawałoby się następnie do cytoplazmy, gdzie doprowadzałoby, przez kolejną fosforylację, do aktywacji represora blokującego region promotory genów *LHCB* [34].

Wyniki wielkoskalowej analizy zmian profilu ekspresji genów rzodkiewnika w odpowiedzi na światło wzbudające preferencyjnie PSI lub PSII wskazuje jednak, że status redoks puli PQ może nie odgrywać istotnej roli w regulacji poziomu ekspresji *LHCB* w odpowiedzi na ekspozycję roślin na zmienione natężenie światła przez czas ≤ 3 h. Otóż ekspozycja przez 3 h roślin rzodkiewnika hodowanych przy umiarkowanym natężeniu światła na światło białe o podwyższonym natężeniu i na światło preferencyjnie wzbudające PSI powodowała spadek poziomu ekspresji *LHCB1* i *LHCB2*, mimo iż nowe warunki świetlne prowadziły do osiągnięcia przez plastochinon przeciwnych stanów redoks [1]. Autorzy sugerują, że plastochinon może brać udział w regulacji poziomu



Rycina 2. Hipotetyczny mechanizm kontroli ekspresji *LHCB* przez Mg ProtoIX, Mg ProtoMe IX oraz podjednostkę H chelatazy Mg^{2+} i produkt genu *GUN4*. Proto IX i jony Mg^{2+} są substratami w reakcji katalizowanej przez, zlokalizowaną w wewnętrznej błonie otoczki chloroplastowej, chelatazę Mg^{2+} , enzymu zbudowanego z podjednostek D, H i I. Produktem reakcji jest Mg Proto IX. Chelataza Mg^{2+} prawdopodobnie tworzy kompleks z białkiem *GUN4* i z kilkoma enzymami zaangażowanymi w biosyntezę chlorofilu, w tym z monometylotransferazą Mg Proto IX, katalizującą syntezę Mg ProtoMe IX. Dane doświadczalne z jednakowym prawdopodobieństwem wspierają dwa alternatywne szlaki sygnalizacyjne prowadzące od akumulacji Mg Proto IX i Mg ProtoMe IX w otocze chloroplastowej do zahamowania transkrypcji *LHCB* na terenie jądra komórkowego. W obydwu szlakach istotną rolę odgrywa podjednostka H chelatazy Mg^{2+} oraz *GUN4*. W przebiegu jednego z prawdopodobnych szlaków (lewa część ryciny) Mg Proto IX i Mg ProtoMe IX wydostają się do cytosolu i tam, w nieznanym sposób, uruchamiają ciąg reakcji prowadzący do aktywacji represora lub dezaktywacji aktywatora transkrypcji *LHCB*. Drugi szlak (prawa część ryciny) nie obejmuje przechodzenia Mg Proto IX i Mg ProtoMe IX do cytosolu. Metabolity te pozostają w otocze chloroplastowej, ale oddziałują tam z podjednostką H i *GUN4* w sposób skutkujący wytworzeniem nieznannej cząsteczki sygnałowej, przemieszczającej się z otoczki chloroplastowej do cytosolu. Tam nieznaną cząsteczką sygnałową uruchamia ciąg reakcji prowadzących do aktywacji represora lub dezaktywacji aktywatora transkrypcji *LHCB*. Objasnienia symboli: A i C – domniemane represory transkrypcji *LHCB*, B i D – domniemane aktywatory transkrypcji *LHCB*, D, H i I – podjednostki D, H i I chelatazy Mg^{2+} , Proto IX, Mg Proto IX, Mg ProtoMe IX – protoporfiryna IX, magnezoprotoporfiryna IX, ester metylowy magnezoprotoporfiryny IX, odpowiednio, X – domniemany transporter uczestniczący w przenoszeniu Mg Proto IX, Mg ProtoMe IX do cytosolu, Y – nieznaną cząsteczką sygnałową. Na podstawie prac [28,29].

ekspresji *LHCB1* i *LHCB2* podczas aklimatyzacji do natężeń światła trwających dłużej niż 3 h. Teza ta znajduje poważne potwierdzenie eksperymentalne w doniesieniach sugerujących, że u *Dunaliella tertiolecta* status redoks puli plastochinonu uczestniczy w regulacji poziomu ekspresji *LHCB1* tylko w odpowiedzi na zmiany natężenia światła trwające ≥ 8 h [35].

REGULACJA AKUMULACJI TRANSKRYPTÓW *LHCB* OBEJMUJĄCA SZLAKI SYGNALIZACYJNE INICJOWANE PRZEZ WSPÓŁDZIAŁANIE SYGNAŁU CHLOROPLASTOWEGO I CYTOPLAZMATYCZNEGO

Regulacja poziomu ekspresji *LHCB* w odpowiedzi na długoterminowe zmiany natężenia światła podlega również bardziej złożonej kontroli, wymagającej współdziałania sygnału chloroplastowego – prawdopodobnie w formie statusu redoks puli glutationu lub tioredoksyny – oraz sygnału cytoplazmatycznego w formie puli cukrów rozpuszczalnych [36]. Okazało się, że represja transkrypcji *LHCB* następująca u rzodkiewnika w warunkach dostępności wysokiego stężenia rozpuszczalnych cukrów egzogennych jest obserwowana również w warunkach głodu cukrowego, jeżeli siewkom podany zostanie DCMU. Zważywszy, że pula plastochinonu pozostaje utleniona zarówno w warunkach wysokiego stężenia cukrów, jak i w warunkach głodu cukrowego, sygnałem plastydowym współdziałającym z sygnałem pochodzącym ze stężenia cukrów w komórce musi być inny czynnik niż status redoks puli plastochinonu [36]. Sugeruje się, że jest nim status redoks puli glutationu lub tioredoksyny. Miałby on pełnić w tym mechanizmie funkcję pozytywnego regulatora poziomu ekspresji *LHCB*, podczas gdy zależny od wysokiego stężenia cukrów rozpuszczalnych sygnał cytosolowy miałby funkcjonować jako regulator negatywny [36]. Sugestia co do roli statusu redoks puli glutationu w mechanizmie regulacji poziomu ekspresji *LHCB* wydaje się prawdopodobna w związku z istnieniem danych wskazujących na to, iż metabolizm glutationu w istotny sposób wpływa na ekspresję genów roślin (a mianowicie kilkudziesięciu genów jądrowych rzodkiewnika związanych z odpowiedzią na stres) [37], podczas gdy brak podobnych informacji w odniesieniu do tioredoksyny. Glutation może regulować ekspresję genów, zmieniając stopień utlenienia grup tiolowych białek regulatorowych albo zmieniając aktywność tych białek przez bezpośrednią glutationylację [37].

REGULACJA AKUMULACJI *LHCB* NA POZIOMIE ENZYMATYCZNEJ DEGRADACJI BIAŁKA

Istnieje szereg dowodów wskazujących na to, że obok mechanizmów działających na poziomie akumulacji transkryptów *LHCB* istotną rolę w zależnej od długoterminowych zmian natężenia światła regulacji wielkości puli *LHCII* odgrywa enzymatyczna degradacja gotowych cząsteczek apobiałek *LHCB1-3*. U rzodkiewnika jako proteazę zaangażowaną w proteolityczną degradację *LHCB1* w odpowiedzi na długoterminową ekspozycję (24-72 h) na światło o podwyższonym natężeniu zidentyfikowano chloroplastową metaloproteazę *FtsH6*. Dowód na to pochodzi z oceny intensywności degradacji *LHCB1* w tylakoidach serii mutantów rzodkiewnika, u których drogą mutagenyzy insercyjnej indywidualnie wyciszono geny kodujące

różne proteazy należące do rodziny *FtsH* [38]. Do rodziny tej należą ATP- i cynkozależne metaloproteazy będące integralnymi białkami błony tylakoidowej. W degradacji *LHCB2* w odpowiedzi na trwającą 48-72h ekspozycję szpinaku na światło o podwyższonym natężeniu odgrywa rolę, dotąd niezidentyfikowana, tzw. proteaza aklimatyzacyjna. Enzym ten rozpoznaje i degraduje *LHCB2* wchodzący w skład monomerycznej formy *LHCII*. Do tej pory nie ustalono jednoznacznie, czy jest to proteaza typu serynowego czy cysteinowego. Elementem umożliwiającym rozpoznanie i degradację *LHCB2* w składzie monomerycznej formy *LHCII* jest dostępność N-końcowej sekwencji, niedostępnej w przypadku formy trimerycznej. Proteaza aklimatyzacyjna odpowiada za degradację *LHCB2* wchodzącego w skład „subpopulacji peryferycznej” *LHCII*, co prowadzi do 20-30% redukcji przekroju optycznego *PSII*. Aktywność proteazy aklimatyzacyjnej jest regulowana zarówno na poziomie enzymu, jak i na poziomie jego substratu [39].

Poza opisanymi powyżej przykładami potwierdzającymi możliwość regulacji wielkości puli *LHCII* w odpowiedzi na długoterminowe zmiany natężenia światła na poziomie transkrypcji oraz enzymatycznej degradacji apobiałek *LHCII* istnieją dane wskazujące, że poziom apobiałek *LHCII* spada wraz ze wzrostem natężenia światła, ale nie wskazując jednoznacznie poziomu, na którym mogą się rozgrywać wydarzenia regulacyjne. U rzodkiewnika zaobserwowano mianowicie, że wraz z podwyższaniem natężenia światła, na które eksponowane są rośliny podczas hodowli wyraźnie spada poziom *LHCB1* i *LHCB2* [2]. Z kolei u szpinaku po 72 h aklimatyzacji do światła o podwyższonym natężeniu obserwowany był spadek poziomu *LHCB1-3*, przy czym spadek poziomu białka *LHCB1* widoczny był dopiero w warunkach aklimatyzacji do światła o natężeniu światła indukującym umiarkowany stres świetlny [5].

REGULACJA NA POZIOMIE BIOSYNTETY CHLOROFILU *B*

Zdaniem niektórych badaczy wielkość puli *LHCII* jest regulowana w odpowiedzi na długoterminowe zmiany natężenia światła nie na poziomie ekspresji apobiałek *LHCII*, lecz na poziomie biosyntezy chlorofilu *b* [40]. Według tej hipotezy do błony tylakoidowej włączane są tylko apobiałka *LHCII*, które związały chlorofil *b*, pozostałe natomiast zostają zdegradowane przez proteazy. Hipoteza ta pozostaje w zgodzie z licznymi doniesieniami wskazującymi na pozytywną zależność pomiędzy dostępnością chlorofilu *b* a akumulacją *LHCII* w błonie tylakoidowej [41]. Według tej hipotezy przyczyną obserwowanego u glonów dramatycznego zwiększenia puli *LHCII* w odpowiedzi na długoterminową ekspozycję na światło o obniżonym natężeniu jest stymulacja tempa biosyntezy chlorofilu *b* i chlorofilu całkowitego. Kluczowym enzymem biosyntezy chlorofilu *b* wydaje się oksygenaza chlorofilidu *a* (CAO), która katalizuje przekształcenie chlorofilidu *a* w chlorofilid *b*. Zarówno poziom białka CAO, jak poziom jego mRNA znacząco wzrastają u *Dunaliella salina* w odpowiedzi na światło o obniżonym natężeniu [42]. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku rzodkiewnika [43]. Hipotezę o kluczowej roli CAO potwierdza ponadto obserwacja, że nadekspresja CAO powoduje u roślin transgenicznych rzodkiewnika 10-20% wzrost puli *LHCII* bez modyfikacji natężenia światła [44].

Niezależnie od tego czy wielkość puli LHCI jest w istocie regulowana w odpowiedzi na długoterminowe zmiany natężenia światła tylko na poziomie ekspresji apobiałek LHCI, tylko biosyntezy chlorofilu *b*, czy na obydwu tych poziomach jednocześnie, efektem spadku udziału LHCI podczas ekspozycji na światło o podwyższonym natężeniu jest wzrost stosunku ilościowego chl *a*/chl *b* i spadek tego stosunku w odpowiedzi na światło o obniżonym natężeniu [3]. Zależne od natężenia światła zmiany puli LHCI i stosunku ilościowego chl *a*/chl *b* potwierdzono także w odniesieniu do licznych gatunków roślin badanych na naturalnych stanowiskach o zróżnicowanym reżimie świetlnym [45]. Konsekwencją zmian wielkości puli LHCI są także inne odpowiedzi obserwowane na poziomie chloroplastu, np. wraz ze wzrostem natężenia światła, przy którym hodowano rośliny obserwowano spadek stosunku ilościowego tylakoidów zespolonych do niezespolonych oraz liczby tylakoidów zespolonych w pojedynczym granum [41].

ODPowiedzi na długoterminowe zmiany natężenia światła na poziomie mniejszościowych, peryferycznych anten energetycznych PSII

W odpowiedzi na ekspozycję na światło o podwyższonym natężeniu zaobserwowano również spadek poziomu transkryptów genów kodujących apobiałka innych niż LHCI peryferycznych anten PSII (tzn. anten mniejszościowych). W wyniku zastosowania techniki mikromacierzy DNA stwierdzono mianowicie, że u rzodkiewnika w warunkach ekspozycji na światło o podwyższonym natężeniu, nie generującym stresu świetlnego następuje spadek poziomu ekspresji *LHCB4.2* i *LHCB6* [1]. W zgodzie z tymi obserwacjami pozostaje doniesienie wskazujące, że wraz ze wzrostem natężenia światła, przy którym hodowane są rośliny rzodkiewnika spada poziom *LHCB4-6* [2]. Sensem fizjologicznym spadku wielkości puli mniejszościowych anten peryferycznych PSII, podobnie jak w przypadku LHCI, jest ograniczenie ilości energii wzbudzenia elektronowego dostępnej dla P680 i zmniejszenie ryzyka fotouszkodzenia. W literaturze brak danych dotyczących ewentualnej roli szlaków sygnalizacyjnych inicjowanych oddziaływaniami światła: fotoreceptor i sygnałami retrogradowymi w regulacji poziomu ekspresji genów kodujących apobiałka mniejszościowych anten peryferycznych PSII.

ODPowiedzi na długoterminowe zmiany natężenia światła – białka związane z PET i reakcjami ciemnymi fotosyntezy

U licznych gatunków roślin w odpowiedzi na długoterminową ekspozycję na światło o podwyższonym natężeniu równolegle ze spadkiem wielkości puli LHCI obserwuje się wzrost liczby cząstek PSII w przeliczeniu na całkowity chlorofil liścia, podczas gdy liczba cząstek PSI nie zmienia się znacząco [46]. Można oczekiwać, że ekspozycja na światło o podwyższonym natężeniu oznacza, wobec spadku wielkości puli LHCI, zwiększoną akumulację przynajmniej niektórych polipeptydów kompleksu rdzeniowego PSII. Jednak w literaturze światowej brakuje danych jednoznacznie potwierdzających to

oczekiwanie. Zwiększonej akumulacji w odpowiedzi na długoterminowy wzrost natężenia światła można oczekiwać np. w odniesieniu do *PsbS* (ponieważ wzrasta poziom transkryptu [8]) czy w przypadku *PsbA* (ponieważ wzrasta pula PQ [40]). Ponadto wiadomo, że poziom akumulacji transkryptów *PsbA* i *PsbP* wzrasta przy przejściu ciemność:światło [47,48]. Transkrypcja genów kodujących białka kompleksu rdzeniowego PSII może pozostawać pod kontrolą fitochromu [47]. U szpinaku światło czerwone wydaje się również kontrolować poziom transkryptu *PsbS* na etapie potranskrypcyjnym [48].

REGULACJA AKUMULACJI I AKTYWNOŚCI KATALITYCZNEJ BIAŁEK ZWIĄZANYCH Z PET ORAZ AKUMULACJI PRZENOŚNIKÓW REDOKS ZWIĄZANYCH Z PET

Długoterminowe zmiany natężenia światła prowadzą do zmian w poziomie ekspresji genów białek kompleksu cytochromowego *b6f*. Ekspozycja siewek jęczmienia na światło o podwyższonym natężeniu (7 dni) prowadzi do znacznego zwiększenia puli cytochromu *f* [49], a u kilku gatunków roślin (np. tytoniu, rzodkiewnika) obserwowano, że ekspozycji na światło o podwyższonym natężeniu towarzyszy wzrost poziomu transkryptu *PETC*, kodującego białko Rieskego [50]. W siewkach tytoniu i pomidora zmiany te regulowane są na drodze zależnej od fitochromu i kryptochromu [51]. Akumulacja białka Rieskego w odpowiedzi na długoterminowe zmiany natężenia światła może być kontrolowana również na poziomie potranskrypcyjnym [50]. Wykazano ponadto, że u szpinaku promotor genu *PetH* kodującego reduktazę ferredoksyna:NADP działa w sposób zależny od światła [52]. Jakkolwiek obserwowano, że w odpowiedzi na światło o podwyższonym natężeniu następuje niewielki spadek puli polipeptydów wchodzących w skład podjednostki katalitycznej syntazy CF₁ ATP [53], to jednak aktywność katalityczna tej podjednostki silnie wzrasta [41]. Wzrost puli cytochromu *f*, PQ i aktywności katalitycznej ATPazy w odpowiedzi na światło o podwyższonym natężeniu częściowo tłumaczy powody, dla których rośliny wielu gatunków rosnące w środowiskach naturalnych na stanowiskach silnie nasłonecznionych cechują się znacząco wyższymi wartościami maksymalnej wydajności fotosyntezy w porównaniu z roślinami egzystującymi na stanowiskach zacienionych, mimo posiadania zredukowanej puli LHCI [45].

REGULACJA AKUMULACJI I AKTYWNOŚCI KATALITYCZNEJ RUBISCO I INNYCH ENZYMÓW UCZESTNICZĄCYCH W FAZIE CIEMNEJ FOTOSYNTEZY

Natężenie światła wpływa również na poziom ekspresji i aktywność enzymów fazy ciemnej fotosyntezy. Dotyczy to między innymi rubisco, enzymu katalizującego reakcję karboksylacji RuBP w chloroplastach wszystkich zielonych komórek roślin typu C₃ i CAM oraz w chloroplastach komórek pochwy wokółtętnikowej roślin typu C₄. Zaobserwowano, że w odpowiedzi na długotrwałą ekspozycję na światło o podwyższonym natężeniu u licznych gatunków roślin dochodzi do wzrostu puli oraz aktywności rubisco (której miarą jest stopień karbamylacji cząsteczek enzymu) [2,54,55]. Mechanizm prowadzący do zmian puli rubisco w stromie w odpowiedzi na zmiany natężenia światła obejmuje zmiany w poziomie transkrypcji genów jądrowych, kodujących małe podjednostki rubisco (SSU). U grochu regulacja poziomu transkrypcji

genów kodujących SSU pozostaje zarówno pod kontrolą światła niebieskiego, jak i czerwonego. Mechanizm ten zależny jest również od rytmu okołodobowego i etapu rozwoju rośliny [56]. Promotory genów *RBCS* (kodujących mniejszą podjednostkę rubisco) zawierają liczne LRE – są to między innymi kasety typu I (GATAA), typu G (CACGTG), typu L (AATTAACCAA), elementy GT (GTGTGGTTAATATG), motyw GGCCACT oraz elementy AT [57-61]. Zidentyfikowano również wiele elementów *trans*-regulatorowych biorących udział w regulacji poziomu ekspresji genów *RBCS*, a mianowicie: GT-1 (oddziałujący z elementami GT), PIF3 (oddziałujący z kasetami typu G), 3AF1 i AT-1 (wiążące się w rejonach promotorowych bogatych w adeninę i tyminę) oraz czynniki transkrypcyjne z grupy IBF-1 [16,58,62-64]. Aktywność niektórych z wymienionych wyżej czynników podlega regulacji potranslacyjnej. Dotyczy to między innymi białek AT-1 i GT-1, które podlegają odwracalnej fosforylacji. Czynniki transkrypcyjne AT-1 pozostaje aktywny w formie nieufosforylowanej [65] podczas gdy w przypadku czynnika transkrypcyjnego GT-1 fosforylacja powoduje zwiększenie aktywności [66]. Zależna od natężenia światła regulacja może funkcjonować także na poziomie translacji, obejmując zarówno etap inicjacji, jak i elongacji [67]. Istnieją ponadto powody by sądzić, że pewną rolę w zależnej od długoterminowych zmian natężenia światła regulacji puli rubisco odgrywa enzymatyczna degradacja gotowych cząsteczek dużej podjednostki enzymu (LSU). Udowodniono bowiem, że połówki liści tytoniu (wyhodowanego przy umiarkowanym natężeniu światła) eksponowane na światło o niskim natężeniu miały niższy poziom i aktywność rubisco niż połówki tego samego liścia eksponowane na światło o wysokim natężeniu, mimo iż obie połówki zawierały identyczną pulę mRNA dla LSU [68].

Aktywność rubisco (mierzona stopniem karbamylacji cząsteczek) jest, obok puli tego enzymu, czynnikiem w istotnym stopniu określającym szybkość przyswajania dwutlenku węgla i tempo cyklu Calvina. W odpowiedzi na oświetlenie rośliny obserwuje się karbamylację nieaktywnej w ciemności puli cząsteczek rubisco, a stopień karbamylacji wzrasta wraz ze wzrostem natężenia światła, na które roślina jest długoterminowo eksponowana. Za aktywację rubisco na świetle poprzez umożliwienie karbamylacji cząsteczek odpowiedzialna jest aktywaza rubisco. Ten ATP-zależny enzym doprowadza najprawdopodobniej do zmian konformacji centrum katalitycznego rubisco i przejścia struktury centrum z zamkniętej (ze związanymi w centrum katalitycznym fosforanami cukrów) w otwartą (po dysocjacji fosforanów cukrów). Otwarcie centrum katalitycznego czyni je dostępnym dla cząsteczek CO₂ dokonujących karbamylacji reszty aminokwasowej Lys 201 i umożliwiających związanie jonów Mg²⁺ [68]. U niektórych gatunków roślin aktywaza rubisco może stymulować karbamylację także przez usuwanie z centrum katalitycznego cząsteczek karboksyarabinitol 1-fosforanu (CA1P), tzw. nocnego inhibitora rubisco. Wydajność stymulacji karbamylacji przez aktywazę rubisco wzrasta wraz ze wzrostem natężenia światła, przy którym roślina jest hodowana [68].

W odpowiedzi na długoterminowe zmiany natężenia światła zmienia się też poziom ekspresji genów kodujących inne enzymy fazy ciemnej fotosyntezy oraz aktywność gotowych cząsteczek enzymów, w tym tych które katalizują reakcje składające się na cykl Calvina. Zmiany natężenia światła wpływają

na poziom transkrypcji genów kodujących zależną od NADP dehydrogenazę jabłczanową, dikinazę pirogronian-ortofosforan, dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego, aldolazę fruktozo-1,6-bisfosforanu, kinazę fosforybulozy, fruktozo-1,6-bisfosfatazę oraz izomerazę rybulozo-5-fosforan [69]. Poziom ekspresji genów kodujących dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego, kinazę fosforybulozy oraz izomerazę rybulozo-5-fosforanu pozostaje pod kontrolą fitochromu [47]. W promotorach genów *GapA* i *GapB*, kodujących odpowiednio podjednostki A i B dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, znaleziono dwa LRE, a mianowicie kasetę Gap (ATGA-A(A/G)A) oraz element AE (AGAAACTT) [70,71]. Ponadto, tylko w promotorze *GapB* znajduje się kilka innych LRE: PI (AGGTACCG), PII (TTGGTTTGGATCAAAACCAA), XXIII (CCCCATATGTATCTTA CCTACAT) oraz dwie kasety typu T (GGTACC) [72]. U tytoniu z promotorami *GapA* i *GapB* oddziałuje między innymi czynniki transkrypcyjny GAPF [71].

Na poziomie aktywności katalitycznej niektóre enzymy związane z cyklem Calvina podlegają regulacji zależnej od natężenia światła w następstwie odwracalnej redukcji ich mostków dwusiarczkowych przez system ferredoksyna/tioredoxyna. Dotyczy to między innymi takich enzymów, jak fruktozobisfosfataza, sedoheptulozo-1,7-bisfosfataza, fosforybulokinaza oraz dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Enzymy te charakteryzują się wysoce ujemną wartością potencjału oksydoredukcyjnego i mogą być zredukowane jedynie przez zredukowaną tioredoksynę, powstającą na świetle w wyniku redukcji utlenowanej tioredoksyny przez zredukowaną ferredoksynę. Zredukowana, aktywna forma wspomnianych enzymów utrzymuje się zatem tylko w warunkach ekspozycji rośliny na światło, a wzrost natężenia światła prowadzi do wzrostu stopnia redukcji mostków dwusiarczkowych i wzrostu aktywności katalitycznej. Wykazano, że w aktywacji fruktozobisfosfatazy bierze udział tioredoksyna f. W przypadku grochu kluczową rolę w regulacji aktywności tego enzymu, zależnej od statusu redoks puli ferredoksyny, odgrywają trzy reszty aminokwasowe, a mianowicie Cys-173, Cys-178 oraz Cys-153. Tioredoxyna f aktywuje również fosforybulokinazę i dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Sedoheptulozo-1,7-bisfosfataza jest z kolei aktywowana zarówno przez tioredoksynę f, jak i tioredoksynę m [69].

Wzrost puli oraz aktywności enzymatycznej rubisco i innych enzymów cyklu Calvina – wraz z opisanym wcześniej wzrostem puli cytochromu f, PQ i aktywności katalitycznej ATPazy – w pełni wyjaśnia dlaczego rośliny rosnące w środowiskach naturalnych na stanowiskach silnie nasłonecznionych osiągają znacząco wyższe wartości maksymalnej wydajności fotosyntezy w porównaniu z roślinami egzystującymi na stanowiskach zacienionych [45].

PIŚMIENNICTWO

1. Piippo M, Allahverdiyeva Y, Paakkari V, Suoranata UM, Battchikova N, Aro EM (2006) Chloroplast-mediated regulation of nuclear genes in *Arabidopsis thaliana* in absence of light stress. *Physiol Genomics* 25: 142-152
2. Bailey S, Walters RG, Jansson S, Horton P (2001) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta* 213: 794-801
3. Leong TY, Anderson JM (1984) Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. I. Study on the distribution of chlorophyll-protein complexes. *Photosynth Res.* 5: 105-115

4. Mäenpää P, Andersson B (1989) Photosystem II heterogeneity and long-term acclimation of light harvesting. *Z Naturforsch* 44C: 403–406
5. Jackowski G, Olkiewicz P, Żelisko A (2003) The acclimative response of main light-harvesting chlorophyll a/b protein complex of photosystem II (LHC II) to elevated irradiances at the level of trimeric subunits. *J Photochem Photobiol B Biol* 70: 163–170
6. Jansson S, Andersson J, Kim SJ, Jackowski G (2000) An *Arabidopsis thaliana* protein homologous to cyanobacterial high-light-inducible proteins. *Plant Mol Biol* 42: 345–351
7. Kimura M, Yamamoto YY, Seki M, Sakurai T, Sato M, Abe T, Yoshida S, Manabe K, Shinozaki K, Matsui M (2003) Identification of *Arabidopsis* genes regulated by high light-stress using cDNA microarray. *Photochem Photobiol* 77: 226–233
8. Quail PH (1997) An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant Cell Environ* 20: 657–666
9. Wang H, Deng XW (2003) Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. *Trends Plant Sci* 8: 172–178
10. Shinomura T, Uchida K, Furuya M (2000) Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyls elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122: 147–156
11. White MJ, Kaufman LS, Horwitz BA, Briggs WR, Thompson WF (1995) Individual Members of the Cab Gene Family Differ Widely in Fluence Response. *Plant Physiol* 107: 161–165
12. Horowitz B, Thompson W, Briggs W (1988) Phytochrome regulation of greening in *Pisum*. *Plant Physiol* 86: 299–300
13. Clack T, Mathews S, Sharrock RA (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol Biol* 25: 413–427
14. Ni M, Tepperman JM, Quail PH (1999) Binding of phytochrome B to its nuclear signaling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* 400: 781–784
15. Zhu Y, Tepperman JM, Fairchild CD, Quail PH (2000) Phytochrome B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13419–13424
16. Martínez-García JF, Huq E, Quail PH. (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288: 859–863
17. Patikoglou G, Burley K (1997) Eukaryotic transcription factor-DNA complexes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26: 289–326
18. Wang ZY, Kenigsbuch D, Sun L, Harel E, Ong MS, Tobin EM (1997) A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis* lhcb gene. *Plant Cell* 9: 491–507
19. Anderson SL, Teakle GR, Martino-Catt SJ, Kay SA (1994) Circadian clock and phytochrome-regulated transcription is conferred by a 78bp cis-acting domain of the *Arabidopsis* CAB2 promoter. *Plant J* 6: 457–470
20. Degenhardt J, Tobin EM (1996) A DNA binding activity for one of two closely defined phytochrome regulatory elements in an LHCb promoter is more abundant in etiolated than in green plants. *Plant Cell* 8: 31–41
21. Kehoe DM, Degenhardt J, Winicov I, Tobin EM (1994) Links Two 10-bp regions are critical for phytochrome regulation of a *Lemna gibba* LHCb gene promoter. *Plant Cell* 6: 1123–1134
22. Folta KM, Kaufman LS (1999) Regions of the pea LHCb1*4 promoter necessary for blue-light regulation in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 120: 747–755
23. Folta KM, Kaufman LS (2003) Phototropin 1 is required for high-fluence blue-light-mediated mRNA destabilization. *Plant Mol Biol* 51: 609–618
24. Johanningmeier U (1988) Possible control of transcript levels by chlorophyll precursors in *Chlamydomonas*. *Eur J Biochem* 177: 417–424
25. Oster U, Bruner H, Rudiger W (1996) The greening in cress seedlings. V. Possible interference of chlorophyll precursors, accumulated after thujaplicin treatment, with light-regulated expression of Lhc genes. *J Photochem Photobiol B Biol* 36: 255–261
26. Strand A, Asami T, Alonso J, Ecker JR, Chory J (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature* 421: 79–83
27. Susek RE, Ausubel FM, Chory J (1993) Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* 74: 787–799
28. Mochizuki N, Brusslan JA, Larkin R, Nagatani N, Chory J (2001) *Arabidopsis* genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2053–2058
29. Rodermeier S, Park S (2003) Pathways of intracellular communication: tetrapyrroles and plastid-to-nucleus signaling. *BioEssays* 25: 631–636
30. Beck CF (2005) Signaling pathways from the chloroplast to the nucleus. *Planta* 222: 743–756
31. Yurina NP, Odintsova MS (2007) Plant signaling systems. Plastid-generated signals and their role in nuclear gene expression. *Russ J Plant Physiol* 54: 427–438
32. Moller SG, Kunkel T, Chua NH (2001) A plastidic ABC protein involved in intercompartmental communication of light signaling. *Genes Dev* 15: 90–103
33. Xu XM, Adams S, Chua NH, Moller SG (2005) AtNAPI represents an atypical SufB protein in *Arabidopsis* plastids. *J Biol Chem* 280: 6648–6654
34. Escoubas J, Lomas M, LaRoche J, Falkowski PG (1995) Light Intensity Regulation of cab Gene Transcription is Signaled by the Redox State of the Plastoquinone Pool. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10237–10241
35. Chen YB, Durnford DG, Koblizek M, Falkowski PG (2004) Plastid regulation of LHCB 1 transcription in the chlorophyte alga *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol* 136: 3737–3750
36. Oswald O, Martin T, Dominy PJ, Graham IA (2001) Plastid redox state and sugars: Interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2047–2052
37. Ball L, Accotto GP, Bechtold U, Creissen G, Funck D, Jimenez A, Kular B, Leyland N, Mejia-Carranza J, Reynolds H, Karpinski S, Mullineaux PM (2004) Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2448–2462
38. Żelisko A, Garcia-Lorenzo M, Jackowski G, Jansson S, Funk C (2005) AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13699–13704
39. Garcia-Lorenzo M, Żelisko A, Jackowski G, Funk C (2004) Degradation of the main photosystem II light-harvesting complex. *Photochem Photobiol Sci* 4: 1065–1071
40. Hooper J, Eggink L (2001) A potential role of chlorophylls b and c in assembly of light-harvesting complexes. *FEBS Lett* 489: 1–3
41. Anderson JM, Chow WS, Goodchild DJ (1988) Thylakoid membrane organization in sun/shade acclimation. *Aust J Plant Physiol* 15: 11–16
42. Masuda T, Polle J, Melis A (2002) Biosynthesis and distribution of chlorophyll among the photosystems during recovery of the green alga *Dunaliella salina* from irradiance stress. *Plant Physiol* 128: 603–614
43. Harper AL, von Gesjen SE, Linford AS, Peterson MP, Faircloth RS, Thissen MM, Brusslan JA (2004) Chlorophyllide a oxygenase mRNA and protein levels correlate with the chlorophyll a/b ratio in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth. Res* 79: 149–159
44. Tanaka R, Koshino Y, Sawa S, Ishiguro S, Okada K, Tanaka A (2001) Overexpression of chlorophyllide a oxygenase, (CAO) enlarges the antenna size of Photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 26: 365–373
45. Murchie EH, Horton P (1997) Acclimation of photosynthesis to irradiance and spectral quality in British plant species: chlorophyll content, photosynthetic capacity and habitat preference. *Plant Cell Environ* 20: 438–448
46. Walters RG, Rogers JJM, Shepard F, Horton P (1999) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the role of photoreceptors. *Planta* 209: 517–527
47. Kuno N, Muramatsu T, Hamazato F, Furuya M (2000) Identification by large-scale screening of phytochrome-regulated genes in etiolated

- seedlings of *Arabidopsis* using a fluorescent differential display technique. *Plant Physiol* 122: 15-24
48. Zhang L, Paakkari V, van Wijk KJ, Aro EM (1999) Cotranslational assembly of the D1 protein into photosystem II. *J Biol Chem* 274: 16062-16067
 49. de la Torre WR, Burkey KO (1990) Acclimation of barley to changes in light intensity: photosynthetic electron transport activity and components. *Photosynth Res* 24: 127-136
 50. Knight JS, Duckett CM, Sullivan JA, Walker AR, Gray J (2002) Tissue-specific light regulated and plastid regulated expression of single copy nuclear gene encoding the chloroplast Rieske FeS protein of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43: 522-531
 51. Palomares R, Herrmann RG, Oelmüller R (1991) Different blue-light requirement for the accumulation of transcripts from nuclear genes for thylakoid proteins in *Nicotiana tabacum* and *Lycopersicon esculentum*. *J Photochem Photobiol B Biol* 11: 151-162
 52. Oelmüller R, Bolle C, Tyagi AK, Niekrawietz N, Breit S, Herrmann RG (1993) Characterization of the promoter from single-copy gene encoding ferredoxin-NADP⁺-oxidoreductase from spinach. *Mol Gen Genet* 237: 261-272
 53. Phee BK, Cho JH, Park S, Jung JH, Lee YH, Jeon JS, Bhoo SH, Hahn TR (2004) Proteomic analysis of the response of *Arabidopsis* chloroplast proteins to high light stress. *Proteomics* 4: 3560-3568
 54. Krall JP, Shevelena EV, Pearcy RW (1995) Regulation of photosynthetic induction state in high and low light grown soybean and *Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don. *Plant Physiol* 109: 307-317
 55. Lauerer M, Saftic D, Quick WP, Labate C, Fichtner K, Schuzle ED, Rodermeil SL, Bogorad L, Stitt M (1993) Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with 'antisense' rbcS. VI. Effect on photosynthesis in plants grown at different irradiances. *Planta* 190: 332-345
 56. Seemann JR, Kirschbaum MUF, Sharkey TD, Pearcy RW (1988) Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in *Alocasia macrorrhiza* in response to step changes in irradiance. *Plant Physiol* 99: 227-231
 57. Fluhr R, Chua NH (1986) Developmental regulation of two genes encoding ribulose-bisphosphate carboxylase small subunit in pea and transgenic petunia plants: Phytochrome response and blue-light induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2358-2362
 58. Giuliano G, Pichersky E, Malik VS, Timko MP, Scolnik PA, Cashmore AR (1988) An evolutionary conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7089-7093
 59. Green PJ, Yong MH, Cuzzo M, Kano-Murakami Y, Silverstein P, Chua NH (1988) Binding site requirements for pea nuclear factor GT-1 correlate with sequences required for light-dependent transcriptional activation of the rbcS-3A gene. *EMBO J* 7: 4053-4044
 60. Grob U, Stüber K (1987) Discrimination of phytochrome dependent light inducible from non-light inducible genes. Prediction of common light responsive element (LRE) in phytochrome dependent light inducible plant genes. *Nucl Acid Res* 15: 9957-9973
 61. Schöffner AR, Sheen J (1991) Maize rbcS promoter activity depends on sequence elements not found in dicot rbcS promoters. *Plant Cell* 3: 997-1012
 62. Ueda T, Pichersky E, Malik F, Cashmore AR (1989) Level of expression of the tomato rbcS-3A gene is modulated by a far upstream promoter element in developmentally regulated manner. *Plant Cell* 1: 217-227
 63. Borello U, Ceccarelli E, Giuliano G (1993) Constitutive light-responsive and circadian clock-responsive factors compete for the different I box elements in plant light-regulated promoters. *Plant J* 4: 611-619
 64. Datta N, Cashmore AR (1989) Binding of pea nuclear protein to promoters of certain photoregulated genes is modulated by phosphorylation. *Plant Cell* 1: 1096-1077
 65. Lam E, Kano-Murakami Y, Gilmartin P, Niner B, Chua NH (1990) A metal-dependent DNA-binding protein interacts with a constitutive element of a light-responsive promoter. *Plant Cell* 2: 857-866
 66. Marechal E, Hiratsuka K, Delgado J, Nairn A, Qin J, Chait BT, Chua NH (1999) Modulation of GT-1 DNA binding activity by calcium dependent phosphorylation. *Plant Mol Biol* 40: 373-386
 67. Berry JO, Breiding DE, Klessig DF (1990) Light-mediated control of translational initiation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in amaranth cotyledons. *Plant Cell* 2: 795-803
 68. von Caemmerer S, Quick WP (2000) Rubisco: Physiology *in vivo* W: Leegood R, Sharkey T, von Caemmerer S (red) Photosynthesis: physiology and metabolism. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, str 85-11
 69. Martin W, Scheibe R, Schnarrenberger C (2000) The Calvin cycle and its regulation, W: Leegood R, Sharkey T, von Caemmerer S (red) Photosynthesis: physiology and metabolism. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, str 9-51
 70. Kwon HB, Park SC, Peng HP, Goodman HM, Dewdney J, Shih MC (1994) Identification of a light-responsive region of nuclear gene encoding the B subunit of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 105: 357-367
 71. Park SC, Kwon HB, Shih MC (1996) Cis-acting elements essential for light regulation of the nuclear gene encoding the A subunit of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 112: 1563-1571
 72. Chan CS, Guo L, Shih MC (2001) Promoter analysis of the nuclear gene encoding the of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of the *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 46: 131-141

Molecular responses of photosynthetic apparatus of plants to long term irradiance changes

Małgorzata Adamiec, Grzegorz Jackowski

Adam Mickiewicz University, Department of Plant Physiology, 89 Umultowska St., 61-614 Poznan, Poland

e-mail: grzesiek@amu.edu.pl

Key words: irradiance, LHCII, phytochrome, promoter, rubisco, retrograde signaling

ABSTRACT

In response to long term (at least 1-3 h) irradiance changes the responses are elicited at the level of structure and function of photosynthetic apparatus of plants which are thought to be aimed to keep the balance between the level of excitation energy funneled to the reaction centers of the photosystems by energetic antennae and the utilization of this energy in the form of photosynthetic electron transfer and dark reactions. At high vs medium irradiances the rate of excitation energy transfer via LHCII is reduced while the rate of electron flow and photosynthetic dark reactions is increased. The reaction at LHCII level stems from the reduction of its pool per PSII reaction center and the regulatory events comprise changes in the expression of LHCII apoproteins and/or chl *b* biosynthesis. The basis for higher electron flow capabilities lies in significant increases in the content of some electron carriers and the catalytic activity of ATP synthase. The upregulation of photosynthetic dark reaction in turn is due to the activation of signaling pathways leading to the increase in the pool and catalytic activities of rubisco and other Calvin cycle enzymes.

Grzegorz Moniuszko[✉]

Agnieszka Sirko

Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

[✉]Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa; tel.: (022) 658 48 01; e-mail: Mongr@ibb.waw.pl

Artykuł otrzymano 4 lutego 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 14 kwietnia 2008 r.

Słowa kluczowe: deficyt siarczanu, ekspresja genów, glutation, metabolizm siarki w roślinach, regulacja

Wykaz skrótów: ACC – kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy; APS – 5'-fosfo-siarczan adenozyliny (aktywny siarczan); GSH – γ -glutamyl-cysteinyl-glicyna (glutation); OAS – O-acetylo-L-seryna; OAS-TL – liaza O-acetyloserynowo-tiolowa (EC 4.2.99.8); PAPS – 5'-fosfosiaraczan 3'-fosfoadenozyliny; SAM – S-adenozylometionina; SAT – acetyltransferaza serynowa (EC 2.3.1.30); SDCs (ang. sulfur-containing defence compounds) – czynniki odporności zawierające siarkę

Podziękowania: Praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego PBZ-KBN-110/P04/2004 finansowanego, przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

STRESZCZENIE

Siarka, jeden z makroelementów, występuje w przyrodzie na kilku stopniach utlenienia (S^{+VI} , S^{+IV} , S^{II} , S^0). W większości związków organicznych siarkę znajdujemy w formie zredukowanej (S^{II}), natomiast większość siarki w środowisku nieożywionym to siarka utleniona w formie siarczanu (S^{+VI}). Zwierzęta, w tym człowiek, potrafią asymilować siarkę pochodzącą jedynie ze źródeł organicznych, głównie aminokwasów siarkowych. Rośliny, wiele grzybów i bakterii posiadają unikatową zdolność do pobierania ze środowiska nieorganicznego siarczanu, jego redukcji oraz wbudowania w związki organiczne. Poznanie regulacji tego procesu ma podstawowe znaczenie dla zrozumienia zależności pomiędzy dostępnością źródła siarki a wzrostem i rozwojem roślin, ich odpornością na stresy oraz, w przypadku roślin jadalnych, ich wartością odżywczą i zdrowotną. Uświadomienie sobie powyższych faktów stworzyło silną motywację dla szeregu grup badawczych do prowadzenia w ostatniej dekadzie intensywnych badań dotyczących metabolizmu siarki w roślinach oraz regulacji tego procesu. Praca ta ma na celu przybliżenie polskiemu czytelnikowi nowych wyników i koncepcji dotyczących tej tematyki.

WPROWADZENIE

Siarka jest jednym z makroelementów wchodzących w skład organizmów żywych. Występuje w wielu białkach, odgrywając istotną rolę w kształtowaniu ich odpowiedniej struktury drugo- i trzeciorzędowej poprzez mostki dwusiarczkowe, wchodzi w skład centrów aktywnych wielu enzymów, jest niezbędna do biosyntezy szeregu ważnych metabolitów oraz innych składników komórki. Nieorganiczna forma siarki (np. siarczan, siarczyn) może być wykorzystywana przez rośliny, bakterie i niektóre grzyby, natomiast dla organizmów zwierzęcych (w tym człowieka) jedyną dostępną formą siarki jest jej forma organiczna, tj. aminokwasy siarkowe (cysteina i metionina) wchodzące w skład białek. Rośliny odgrywają kluczową rolę w obiegu siarki w przyrodzie dzięki zdolności pobierania i asymilacji siarczanu. Są one najważniejszymi w biosferze producentami aminokwasów siarkowych oraz głównym źródłem tych aminokwasów dla zwierząt. Cywilizacyjna działalność człowieka istotnie wpływa na zmiany ilościowe siarczanu w glebie, wywołując zarówno niedobór, jak i nadmiar, co z kolei powoduje konsekwencje rolnicze i środowiskowe, np. spowolniony wzrost roślin, mniejszą wydajność plonów, większą wrażliwość na stresy biotyczne i abiotyczne. Znajomość szlaku asymilacji siarczanu oraz metabolizmu związków siarki w roślinach na poziomie biochemicznym i molekularnym jest niezwykle istotna z punktu widzenia możliwości optymalizacji procesu obiegu siarki w przyrodzie. Wiedza ta może znaleźć w przyszłości bezpośrednie przełożenie na takie dziedziny gospodarcze, jak: rolnictwo, ochrona przyrody, nauka o żywieniu i żywności czy nawet farmakologia i medycyna.

Ostatnie lata obfitowały w prace poruszające problematykę odpowiedzi roślin na głodzenie siarkowe oraz roli należytego nawożenia siarkowego w rozwoju roślin, ich odporności na stresy i choroby. Tematyka ta stała się szczególnie popularna ze względu na coraz częstsze występowanie objawów charakterystycznych dla niedoborów siarki u roślin uprawnych. Niedobory te, widoczne u roślin o bardzo dużym lub dużym zapotrzebowaniu na siarkę (np. rzepak, gorczyca, kapusta, rzodkiew, rzepa, cebula, czosnek), spowodowane są przede wszystkim zmniejszonym opadem, pochodzącym z zanieczyszczeń, związków siarkowych na powierzchni pól. W krajach europejskich oraz w USA emisja dwutlenku siarki do atmosfery stale maleje, na przykład w latach 1980–2006 emisja tego związku w USA spadła o 66%, a w Europie w okresie 1980–2004 aż o 73% [1]. W Azji natomiast, utrzymuje się tendencja wzrostowa, a na czele emiterów dwutlenku siarki znajdują się Chiny, które dopiero w roku 2006 wprowadziły pierwszy narodowy plan redukcji emisji tego związku, o 10% do roku 2010. W Polsce, według danych szacunkowych GUS, całkowita emisja dwutlenku siarki spadła o 62% w

okresie 1990–2005. Kolejnym czynnikiem odpowiedzialnym za ogólne zmniejszenie zawartości siarki w glebach jest powszechne stosowanie w rolnictwie nowoczesnych, bezsiarkowych (lub z niską zawartością siarki) nawozów mineralnych. Deficyt siarki w glebie obniża wydajność plonów roślin uprawnych, wpływając na ograniczenie pobierania azotu, redukując zawartość bogatych w siarkę metabolitów, które odpowiedzialne są za odporność roślin na stropy biotyczne i abiotyczne [2], a także obniżając jakość produktów roślinnych przeznaczonych do spożycia [3]. Celem tego opracowania jest przybliżenie i usystematyzowanie obecnego stanu wiedzy w zakresie metabolizmu siarki w roślinach z naciskiem na regulację tego procesu w warunkach niedoborów siarki.

TRANSPORT I REDUKCJA SIARCZANU

Pobrane z gleby siarczany jest transportowane do wiązek przewodzących, którymi dociera do pozostałych organów. Podczas pobierania i dystrybucji siarczany kilkakrotnie musi pokonywać błony biologiczne za pomocą transporterów w nich ulokowanych. Pierwszą barierą jest błona cytoplazmatyczna komórek najbardziej zewnętrznej warstwy epidermy korzenia przy pobieraniu siarczany z gleby, następnymi są błony tkanki przewodzącej podczas przenoszenia pomiędzy organami rośliny i wreszcie błony komórek mezofilu liści. Wewnątrz komórek również zachodzi transport transbłonowy do organelli, takich jak plastidy czy wakuole. Liczne badania potwierdzają, że rośliny są w stanie dostosowywać aktywność transporterów oraz poziom pobierania siarki zarówno do własnych potrzeb, jak i do zewnętrznych warunków środowiska [4]. Stężenie siarczany w cytoplazmie utrzymywane jest na względnie stałym poziomie, a jego nadmiar magazynowane jest w wakuoli. Transport siarczany jest głównym etapem podlegającym regulacji w roślinie. Pozostałe mechanizmy regulacyjne są z nim połączone w celu optymalizacji wydatków energetycznych rośliny, utrzymania homeostatycznego poziomu siarczany w cytoplazmie oraz zapobiegania nadmiernej akumulacji produktów asymilacji siarczany. Skoordynowana ekspresja genów kodujących transportery siarczany umożliwia roślinie właściwe zarządzanie zasobami siarczany. Dotychczas

poznane roślinne transportery siarczany, wliczając w to 14 transporterów *Arabidopsis thaliana* (Tab. 1), grupują się w pięć rodzin strukturalnych [5].

Kontrola pobierania siarczany z gleby zachodzi przede wszystkim na poziomie ekspresji genów kodujących transportery pierwszej grupy, tj. transportery o wysokim powinowactwie do siarczany, SULTR1;1 i SULTR1;2. U *A. thaliana* poziom mRNA *AtSULTR1;1* w warunkach optymalnej zawartości siarki w podłożu jest bardzo niski, a wzrost poziomu ekspresji w odpowiedzi na głodzenie siarkowe – bardzo wyraźny. Gen kodujący *AtSULTR1;2* podlega słabszej regulacji – stwierdzono znacznie wyższy poziom mRNA *AtSULTR1;2* w warunkach optymalnych oraz słabszą indukcję głodzeniem siarkowym w porównaniu do *AtSULTR1;1* [7]. Rośliny z wyłączonymi genami *AtSULTR1;1* i *AtSULTR1;2* są całkowicie niezdolne do pobierania siarczany [8]. Wymienione geny ulegają ekspresji głównie w epidermie i warstwie korowej korzeni oraz kodują transportery charakteryzujące się wysoką specyficznością względem siarczany. Transporter *AtSULTR1;3* jest nieco odmienny niż pozostałe, gdyż występuje w błonach komórek towarzyszących we floemie, pełniąc prawdopodobnie funkcję w redystrybucji siarczany [9].

Transportery drugiej grupy charakteryzuje niższa specyficzność w stosunku do siarczany. Ich ekspresja zachodzi w tkankach przewodzących, co sugeruje, że mogą być odpowiedzialne za dystrybucję siarczany oraz jego redystrybucję, współdziałając ze wspomnianym wcześniej białkiem *AtSULTR1;3* z grupy pierwszej. Geny kodujące białka grupy drugiej ulegają ekspresji we wszystkich organach *A. thaliana* (liście, łodygi i korzenie). Regulacja ekspresji *AtSULTR2;2* u *A. thaliana* jest odmienna od regulacji ekspresji jego homologa u *Brassica oleracea* [4]. Obserwacja ta uświadamia nam konieczność prowadzenia badań z użyciem różnych gatunków roślin w celu dokładniejszego scharakteryzowania transportu siarczany oraz roli poszczególnych transporterów w tym procesie. Różnice w dystrybucji i zawartości siarczany w korzeniach i pędach wyżej wspomnianych gatunków roślin są

Tabela 1. Transportery siarczany w *Arabidopsis thaliana* (według Buchner i wsp. [6]).

	Nazwa	Gen	Nr sekwencji cDNA w GenBank	Prawdopodobna funkcja
Grupa1	SULTR1;1	At4g08620	AB018695	pobieranie, szczególnie w warunkach niskiego stężenia siarczany pobieranie/słabiej regulowany niż SULTR1;1 redystrybucja pomiędzy organami/floem
	SULTR1;2	At1g78000	AB042322	
	SULTR1;3	At1g22150	AB049624	
Grupa2	SULTR2;1	At5g10180	AB003591	redystrybucja przez tkanki przewodzące redystrybucja/słabiej regulowany niż SULTR2;1
	SULTR2;2	At1g77990	D85416	
Grupa3	SULTR3;1	At3g51895	D89631	niejasna rola/ekspresja genu w liściach niejasna rola/ekspresja genu w liściach niejasna rola/ekspresja genu w liściach niejasna rola/ekspresja genu w liściach redystrybucja/wspomaga funkcję SULTR2;1
	Sultr3;2	At4g02700	AB004060	
	Sultr3;3	At1g23090	AB023423	
	Sultr3;4	At3g15990	B054645	
	SULTR3;5	At5g19600	AB061739	
Grupa4	SULTR4;1	At5g13550	AB008782	transport przez błonę tonoplastu/mobilizacja zasobów transport przez błonę tonoplastu/mobilizacja zasobów
	SULTR4;2	At3g12520	AB052775	
Grupa5	SULTR5;1	At1g80310	NP_178147	niejasna rola niejasna rola
	SULTR5;2	At2g25680	NP_180139	

prawdopodobnie skutkiem różnic w ekspresji genów kodujących homologiczne transportery.

Trzecia grupa transporterów pozostaje słabo funkcjonalnie scharakteryzowana i być może, ze względu na wielkość, zostanie w przyszłości podzielona na podgrupy. Do tej pory badania koncentrowano głównie na izoformie AtSULTR3;5, która ma związek z intensywnością transportu siarczanu z korzeni do części nadziemnych [10]. Na podstawie badań w drożdżach wysunięto wniosek, iż białko to pełni funkcję transportera tylko w postaci heterodimeru z białkiem AtSULTR2;1, którego gen ulega wzmożonej ekspresji w warunkach obniżonej zawartości siarki w podłożu. Odmienne wyniki uzyskano z homologiem AtSULTR3;5, pochodzącym z *Lotus japonicus*, który lokuje się w błonie symbiosomu z bakteroidem i odpowiada za dostarczanie siarki do składnika nieroślinnego. Białko to w przeciwieństwie do AtSULTR3;5 pochodzącego z *A. thaliana* jest zdolne pełnić swoją funkcję w komórkach drożdży samodzielnie, bez konieczności dimeryzacji z innym transporterem, a także wydaje się pełnić funkcję w asymilacji azotu atmosferycznego [11].

Grupy czwarta i piąta zawierają transportery zlokalizowane w błonie tonoplastu. Transportery czwartej grupy wydają się być zaangażowane w przenoszenie (remobilizację) siarczanu z wakuoli do cytoplazmy i są regulowane pozytywnie przez głodzenie siarkowe [12]. Rola białek grupy piątej nie została dotychczas poznana. Więcej informacji na temat transporterów siarczanu w roślinach czytelnik może znaleźć w szerokich opracowaniach przeglądowych na ten temat [5].

Wewnątrzkomórkowy siarczan stanowi, zależnie od zasobności gleby oraz wieku i aktywności metabolicznej tkanki roślinnej, 70–90% całkowitej siarki zawartej w liściach [13]. Inne formy siarki nieorganicznej (np. siarka elementarna [S⁰], siarczyn [S^{+IV}], siarczek [S^{-II}]) obecne są w tkankach roślinnych w mniejszej ilości. Pozostała siarka znajduje się we frakcji organicznej, wchodząc w skład białek, polipeptydów, lipidów chloroplastowych oraz wtórnych siarkowych metabolitów.

Większość związków organicznych zawiera siarkę w formie zredukowanej (S^{-II}). Redukcja siarczanu zachodzi szczególnie prędko w chloroplastach intensywnie fotosyntetyzujących liści oraz stopniowo słabnie w miarę starzenia się tkanki liściowej. W mniejszym stopniu proces ten zachodzi również w plastydach korzeni. Siarczan jest związkiem stabilnym. Z tego powodu redukcja pobranego z podłoża siarczanu do siarczku jest procesem bardzo energochłonnym i zachodzi w trzech etapach. Pierwszym etapem jest, katalizowany przez sulfurylazę ATP (EC 2.7.7.4), proces aktywacji, w którym przy udziale ATP powstaje aktywny siarczan (5'-fosfosiarczan adenozyliny; APS). U *A. thaliana* izoenzymy sulfurylasy ATP istnieją zarówno w chloroplastach, jak i w cytosolu. APS jest następnie redukowany przez reduktazę APS (EC 1.8.4.9) do siarczynu. Do reakcji tej potrzebny jest GSH. Czytelnik zainteresowany szczegółami tej reakcji i właściwościami enzymu odsyłany jest do niedawnej pracy przeglądowej [14]. Ostatnim etapem jest redukcja siarczynu do siarczku katalizowana przez reduktazę siarczynową (EC

1.8.7.1). Warto wspomnieć, że białko to, oprócz funkcji katalitycznej, wydaje się pełnić, niezbyt dobrze zdefiniowaną, dodatkową funkcję w chloroplastach roślinnych, wykazując silne powinowactwo do DNA i zwiększając upakowanie nukleoidów, co z kolei wpływa na ograniczenie aktywności transkrypcyjnej DNA chloroplastowego [15]. Obecnie przyjmuje się, że zarówno siarczyn, powstający w wyniku redukcji APS, jak i siarczek, powstający w następnym etapie występują w formie wolnej [16], a nie w formie związanej z jakimś związkiem organicznym, jak poprzednio spekulowano.

Należy wspomnieć o tym, że siarka jest wbudowywana w związki organiczne także w formie niezredukowanej (S^{VI+}). Transfer grupy siarczanowej na różnorodne substraty (np. białka, peptydy, lipidy, flawonoidy, ksenobiotyki) katalizowany jest przez sulfotransferazy. W wyniku tych reakcji powstają siarczanowe estry i koniugaty, których właściwości (np. rozpuszczalność) i biologiczna aktywność odbiegają od ich niezmodyfikowanych odpowiedników. Spekuluje się, że enzymy te mogą odpowiadać za modulację takich procesów, jak wzrost, rozwój i odpowiedź na stresy środowiskowe [17]. Uniwersalnym donorem reszty siarczanowej w reakcjach katalizowanych przez białka z tej rodziny jest 5'-fosfosiarczan 3'-fosfoadenozyny (PAPS), powstający w wyniku fosforylacji APS przez kinazę APS. Uważa się, że w przeciwieństwie do plastydowej izoformy tego enzymu, która produkuje APS wykorzystywany następnie do asymilacyjnej redukcji siarczanu, cytosolowa izoforma produkuje PAPS służący jako substrat dla sulfotransferaz. Jedynie u niższych roślin (np. *Physcomitrella patens*), podobnie jak u bakterii, PAPS jest redukowany do siarczynu przy użyciu reduktazy PAPS [18].

Siarczyn może zostać ponownie utleniony do siarczanu dzięki aktywności oksydazy siarczynowej, zawierającej molibden jako kofaktor w centrum aktywnym. Obecność tego enzymu w peroksysomach jest dobrze udokumentowana, aczkolwiek do niedawna wzbudzała kontrowersje w środowisku naukowców zajmujących się metabolizmem siarki. Enzym ten służy prawdopodobnie jako „zawór bezpieczeństwa” niezbędny do detoksyfikacji nadmiaru siarczynu w tkankach, przy czym siarczyn mógłby pochodzić zarówno ze źródła zewnętrznego (zanieczyszczenie atmosfery), i ze źródła wewnętrznego (działanie szlaku asymilacji siarczanu) [19,20].

BIOSYNTeza ORAZ METABOLIZM CYSTEINY

W przeciwieństwie do asymilacyjnej redukcji siarczanu, która zachodzi głównie w chloroplastach, biosynteza cysteiny jest możliwa zarówno w plastydach, jak i w cytoplazmie i mitochondriach. Cysteina powstaje w wyniku działania liazy O-acetyloserynowo-tiolowej (OAS-TL), katalizującej reakcję przyłączenia siarczku do O-acetyloseryny (OAS). OAS, który jest dawką szkieletu aminokwasowego, powstaje w wyniku przeniesienia grupy acetylowej, pochodzącej z acetylo-CoA, na serynę przy udziale acetylotransferazy serynowej (SAT). Cysteina jest pierwszym związkiem organicznym zawierającym zredukowaną siarkę (Ryc. 1).

nia siarkowego i traktowania egzogennym OAS obserwowano tylko w liściach i jedynie dla wybranych genów. Dokładniejsza analiza wykazała brak takiej zależności w przypadku szeregu innych genów, co sugerowało, że OAS nie może być jedynym sensorem głodzenia siarkowego [28]. Obecnie za najbardziej prawdopodobną uważa się hipotezę, że akumulacja OAS, który w normalnych warunkach jest zwykle limitującym substratem, jest jedynie wskaźnikiem braku zrównowżenia metabolizmu siarki i azotu, wobec czego zwiększona akumulacja OAS odczytywana jest błędnie przez komórki jako informacja o głodzeniu siarkowym lub zwiększonym zapotrzebowaniu na metabolity siarkowe [4].

Metabolity zawierające grupy tiolowe, cysteina i GSH, wywierają antagonistyczny do OAS wpływ na przepustowość szlaku asymilacji siarczanu. Zwłaszcza glutation jest postulowany jako cząsteczka sygnałna odpowiedzialna za represję genów szlaku i mediator statusu siarkowego rośliny. Ze względu na bardzo szeroką rolę tego związku i jego udział w wielu różnych procesach związanych z odpowiedzią na stresy środowiskowe oraz regulacją statusu redoks w cytoplazmie komórek funkcja glutationu jako mediatora statusu siarkowego rośliny wydaje się jednak dyskusyjna.

WPLYW GŁODZENIA SIARKOWEGO NA ROŚLINY

Odpowiedź roślin na głodzenie siarkowe można podzielić na trzy główne etapy [4]. W fazie początkowej zmiany ograniczone są do szlaku asymilacji siarczanu i polegają głównie na optymalizacji pobierania siarczanu i jego wykorzystania, a także na uwalnianiu rezerw siarczanu z wakuoli. Następny etap obejmuje zmiany innych szlaków metabolicznych, w tym mobilizację siarki z zasobów organicznych (np. zainicjowanie degradacji glukozyzolanów w *A. thaliana*), dostosowanie metabolizmu azotu do obniżonego metabolizmu siarki oraz zainicjowanie odpowiedzi typowej dla stresów środowiskowych (indukcja antyoksydantów). W ostatniej fazie roślina ukierunkowuje metabolizm na szybsze zakończenie wzrostu wegetatywnego i wejście w okres generatywny. Charakterystyczne dla tego etapu jest m.in. ograniczenie wzrostu, zmniejszenie stosunku długości pędów do korzeni, zainicjowanie procesów starzenia się tkanek oraz podjęcie próby wydania nasion.

Jednym z charakterystycznych objawów długotrwałego głodzenia siarkowego jest chloroza, dotycząca zwłaszcza najmłodsze liście w pobliżu wierzchołka pędu. W warunkach niedoboru siarki dochodzi do zmniejszenia ilości syntetyzowanego chlorofilu oraz zawartości sulfolipidów w liściach [29]. Skutkuje to zahamowaniem błonowych procesów energetycznych, w szczególności intensywności fotosyntezy, począwszy od tkanek najmłodszych. W przypadku postępujących niedoborów ilość dystrybuowanej i redystrybuowanej siarki do młodych organów ulega obniżeniu, jednak jest to spadek większy niż wynikający ze zmniejszenia dostępności źródła. Prawdopodobnie zatem długotrwałe głodzenie siarkowe prowadzi do wysłania hipotetycznego sygnału do jak najszybszego zakończenia wzrostu wegetatywnego i podjęcia próby wydania nasion. Początkowo zahamowany zostaje wzrost części nadziemnej przy jed-

noczesnym zwiększonym wroście korzeni lateralnych. W przypadku niepowodzenia strategii poszukiwania nowych źródeł siarki w glebie, w obliczu zmniejszających się rezerw związków siarkowych, hamowany jest wszelki rozrost organów wegetatywnych, w tym również korzeni. Jest to prawdopodobnie związane z przestawieniem metabolizmu w kierunku wytworzenia organów generatywnych.

Szczególną rolę w odporności roślin na stresy środowiskowe odgrywają czynniki odporności zawierające siarkę (SDCs; ang. *sulfur-containing defence compounds*). Należą do nich związki silnie związane z odpornością, jak: glutation, glukozyzolaty, białka bogate w siarkę; a także te o dotychczas niepotwierdzonej roli w mechanizmach odpornościowych roślin, jak: fitoaleksyny, lotne związki siarkowe oraz siarka elementarna [2,30]. Związki te ulegają akumulacji w wyniku zakażenia i wykazują działanie toksyczne w stosunku do chorobotwórczych grzybów, niektórych gram-dodatnich bakterii, owadów oraz nicieni. Gromadzenie niektórych z tych związków, wydaje się być związane z ilością dostępnej siarki w podłożu. W wyniku głodzenia siarkowego dochodzi do zmniejszenia ilości roślinnych SDCs w roślinach zdrowych oraz obniżenia intensywności odpowiedzi na patogeny w roślinach zakażonych. Postępujące wraz ze zwiększeniem stężenia źródła siarki, gromadzenie SDCs podnosi odporność roślin na przyszłe zakażenia, a prawdopodobnie także tolerancję na metale ciężkie. Wykorzystywane jest to w ogrodnictwie gdzie, aby zwiększyć odporność roślin, dostarcza się im dodatkowego źródła siarki, powodując tym samym zwiększenie stężenia SDCs w uprawianych roślinach.

REGULACJA TRANSKRYPCJI

Badania zmian ekspresji genów pod wpływem głodzenia siarkowego były prowadzone intensywnie przez wiele zespołów badawczych. Najbardziej kompletne dane pochodzą z eksperymentów nad transkryptomem *A. thaliana* [26,31,32]. Mimo że badania te dotyczyły tylko części transkryptomu (około 7000–9000 genów) oraz nie pozwalały zidentyfikować genów o niskim konstytutywnym poziomie ekspresji, ulegających indukcji w warunkach głodzenia siarkowego, wyznaczyły kolejnym badaczom grupę genów potencjalnie zaangażowanych w odpowiedź na niedobory siarki oraz pozwoliły na postawienie hipotez łączących różne procesy z tą odpowiedzią. Wykryto bowiem, że wśród genów regulowanych na poziomie transkrypcji, poza tymi związanymi z pobieraniem, asymilacją i metabolizmem siarki, licznie reprezentowane są geny powiązane ze szlakami flawonoidów, auksyn czy kwasu jasmonowego, geny zaangażowane w syntezę i degradację białek, odpowiedź na inne stresy (biotyczne i abiotyczne), a także grupa genów o innych funkcjach. Na podstawie analizy mikromacierzy szacuje się, że około 7–10% wszystkich genów *A. thaliana* charakteryzuje korelacja poziomu transkrypcji z dostępnością źródła siarki. W naszym laboratorium, stosując metodę bibliotek subtrakowanych, zidentyfikowaliśmy szereg genów tytoniu regulowanych przez krótkoterminowe (48 godzin) głodzenie siarkowe [33]. Nasze obserwacje w dużym stopniu pokrywają się z wynikami uzyskanymi dla *A. thaliana*. Szerzej zainteresowanych wynikami badań transkryptomu oraz powiązania transkryptomu z metabolizmem odsyłamy

do prac oryginalnych oraz zgrabnego porównania wyników pochodzących z kilku eksperymentów [29,34-37].

Ze względu na postulowaną wagę regulacji na poziomie transkrypcji przeprowadzono wiele eksperymentów, których celem było poszukiwanie komponentów szlaku przekazywania sygnału zapewniającego skoordynowaną regulację ekspresji genów metabolizmu siarki. Udało się zidentyfikować 16-nukleotydowe fragmenty sekwencji promotorów (elementy *cis*), które są niezbędne do indukcji genu w warunkach głodzenia siarkowego rośliny, zwane sekwencjami SURE (ang. *sulfur-responsive elements*) [38], jednakże czynnik transkrypcyjny zdolny do wiązania się do tych sekwencji nie został dotąd zidentyfikowany. Sekwencje SURE występują w promotorach wielu, ale nie wszystkich genów indukowanych przez głodzenie siarkowe. Co więcej, można je znaleźć w genach, które przez niedobór siarki nie są regulowane. Uzasadniona zatem wydaje się konkluzja, że sekwencje SURE nie mogą być jedynymi elementami *cis* determinującymi regulację ekspresji genów przez głodzenie siarkowe.

Ostatnio zidentyfikowano aktywator genów pozytywnie regulowanych w warunkach głodzenia siarkowego, SLIM1 (ang. *sulfur limitation 1*) [39], który okazał się identyczny z czynnikiem transkrypcyjnym, znanym poprzednio jako EIL3 (ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE3). Badania, z użyciem m.in. ilościowych technik monitorowania ekspresji genów, potwierdziły wpływ SLIM1 na transkrypcję genów kodujących transportery siarczanu z grupy 1, 3 i 4 oraz białka związane z biosyntezą i degradacją glukozynolatów. Jednakże, indukcja wielu innych genów regulowanych przez głodzenie siarkowe, w tym genów kodujących wszystkie izoformy reduktazy APS, jest niezależna od SLIM1 (w mutantach pozbawionych białka SLIM1 były one indukowane przez głodzenie siarkowe w podobnym stopniu, co w roślinach niezmutowanych). Obserwacja ta sugeruje, że pomimo tego iż SLIM1 jest niezbędny do prawidłowej odpowiedzi na głodzenie siarkowe, nie jest jej naczelnym ani jedynym regulatorem.

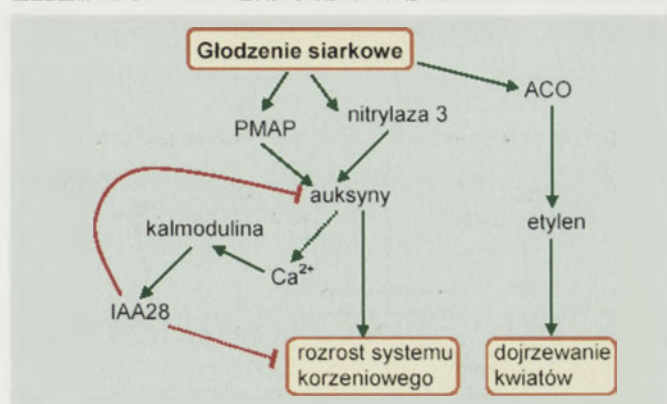
Kolejnym genem związanym z regulacją transkrypcji genów odpowiedzi na stres głodzenia siarkowego jest *BIG*, kodujący białko odpowiadające za polarny transport auksyn [40]. Prawdopodobnie nie jest to jedyna funkcja białka *BIG*, gdyż mutanty z uszkodzonym genem charakteryzowały się plejotropowymi defektami, między innymi w zakresie wrażliwości na cytokininy, etylen i inhibitory transportu auksyn, wykazywały zmiany w szlakach sygnalizacji giberelin i światła, różniły się poziomem „cieniożności” oraz posiadały zmienioną charakterystykę odpowiedzi na niedobór fosforu na poziomie zmian w morfologii organów. *BIG*, w przeciwieństwie do SLIM1 działającego jako aktywator, wydaje się negatywnie regulować ekspresję genów metabolizmu siarki, co stwierdzono dla *APR1* oraz promotora genu β -konglicyny. Nie do końca wiadomo jednak jaki jest mechanizm tej regulacji. Autorzy, na podstawie dodatkowych doświadczeń z roślinami traktowanymi auksynami, dyskutują, że być może następują lokalne, ograniczone do poszczególnych organów, zmiany poziomu auksyn w roślinie, co sugeruje, że obserwowane zjawisko regulacji jest związane z efektem plejotropowym genu *BIG*.

Glukozynolaty syntetyzowane są głównie przez rośliny z rodziny *Brassicaceae*, do której należy wykorzystywana w badaniach modelowych *A. thaliana*. Związki te uważane są za magazyn siarki organicznej, ponieważ w jednej cząsteczce zawierają 2-3 atomy siarki. Są to równocześnie związki wykorzystywane przez rośliny do obrony przed patogenami. Głodzenie siarkowe negatywnie reguluje trzy aktywatory genów biorących udział w biosyntezie glukozynolatów: PMG1/Myb28, PMG2/Myb29 i ATR1/Myb34, z których jeden (ATR1/Myb34) jest, pośrednio lub bezpośrednio, pod kontrolą SLIM1/EIL3 [41].

REGULACJA METABOLIZMU SIARKI PRZEZ FITOHORMONY

Bardzo prawdopodobne jest, że niektóre fitohormony roślinne są cząsteczkami sygnałowymi związanymi z odpowiedzią na deficyt siarki. Należy jednak podkreślić, że trudno jest określić wpływ poszczególnych pojedynczych hormonów z powodu nakładających się, często plejotropowych efektów.

Rola auksyn w regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na głodzenie siarkowe jest ciągle niejasna i kontrowersyjna, a uzyskane wyniki w dużym stopniu zależą od metodyki doświadczenia, np. czasu głodzenia siarkowego, fazy odpowiedzi roślin na głodzenie siarkowe, badanego genu i tego, czy badania prowadzone są w korzeniach czy pędach. Ostatnio pojawiło się doniesienie o pozytywnej regulacji transkrypcji *SULTR2;2* oraz, w mniejszym stopniu, *APR1* przez IAA [40]. Należy jednak podkreślić, że analiza dostępnych wyników z użyciem mikromacierzy nie wykazała wpływu IAA na ekspresję genów *SULTR2;2* i *APR1* *A. thaliana* (Genevestigator; <https://www.genevestigator.ethz.ch>). W innej publikacji stwierdzono, że IAA nie wywiera wpływu na ekspresję *APR2* w warunkach głodzenia siarkowego, a jego wpływ na promotor wspomnianego wcześniej genu At2g44460 zależy od badanego organu rośliny [42]. Interpretację roli auksyn komplikuje fakt, że zarówno ekspresja genów potrzebnych do biosyntezy auksyn [36], jak i ekspresja wielu genów indukowanych przez auksyny [32,34] wzrasta



Rycina 2. Hipotetyczny model wyjaśniający za pomocą obserwowanych zmian ekspresji genów i poziomu metabolitów występowanie zmian morfologicznych i rozwojowych w roślinach poddanych głodzeniu siarkowemu (zmodyfikowane według [33,36], wyjaśnienia w tekście). Wyjaśnienia skrótów: PMAP – potencjalne białko związane z myrozynazą (ang. *putative myrosinase-associated protein*); ACO – oksydaza kwasu 1-amino-cyklopropano-1-karboksylowego.

podczas głodzenia siarkowego. Zaproponowana została hipoteza sugerująca, że udział auksyn w sygnalizacji głodzenia siarkowego mógłby podlegać wyciszeniu przez czynnik transkrypcyjny IAA28, który działałby pośrednio lub bezpośrednio jako element negatywnego sprzężenia zwrotnego (Ryc. 2). Hipoteza ta powstała w wyniku badania powiązań międzygenowych z użyciem metod bioinformatycznych [36]. Nie została ona jednak jeszcze eksperymentalnie zweryfikowana.

Równie hipotetyczne jest przyspieszenie dojrzewania kwiatów i nasion wskutek wzmoczonej syntezy etylenu w wyniku głodzenia siarkowego (Ryc. 2). Proponowany przez nas model opiera się jedynie na stwierdzeniu zwiększonej ekspresji w tych warunkach tytoniowego genu *NtACO3* [33], kodującego jedną z izoform oksydazy kwasu 1-amino-cyklopropano-1-karboxylowego. Enzym ten katalizuje ostatni etap biosyntezy etylenu, hormonu pełniącego funkcję, między innymi, we wzroście generatywnym roślin. Produkcja etylenu jest ściśle związana z metabolizmem siarki, ponieważ jego bezpośrednim prekursorem jest kwas 1-amino-cyklopropano-1-karboxylowy (ACC), który powstaje z S-adenozylometioniny (SAM). Oba etapy biosyntezy etylenu katalizowane są przez enzymy kodowane przez wielogenowe rodziny [43] jednak, według danych literaturowych regulacja syntezy etylenu odbywa się głównie poprzez kontrolę poziomu ACC [44]. Ponadto, należy podkreślić, że nie ma opublikowanych danych na temat poziomu etylenu w roślinach hodowanych w warunkach deficytu siarki.

Cytokiny, chociaż nieregulowane w odpowiedzi na stres niedoboru siarki, zostały zidentyfikowane jako regulatory transkrypcji genów metabolizmu siarkowego. Na ten temat ukazały się prace kilku grup badawczych. Jedna z grup wykazała, że zeatyna indukuje ekspresję genów kodujących – β podjednostkę β -konglicyny, głównego białka zapasowego w nasionach soi, niskowydajny transporter siarczanu (*SULTR2;2*) oraz jedną z izoform reduktazy APS (*APR1*) [45]. Wydaje się jednak, że zeatyna działała w przypadku dwóch ostatnich genów (*SULTR2;2* i *APR1*) raczej pośrednio, zwiększając stężenie sacharozy, czyli poprzez ścieżkę niezależną od głodzenia siarkowego. Inni autorzy stwierdzili negatywny wpływ zeatyny na ekspresję genów *SULTR1;1* i *SULTR1;2*, kodu-

jących wysoko specyficzne transportery siarczanu indukowane w korzeniach *A. thaliana* przez głodzenie siarkowe. Traktowanie roślin zeatyną skutkowało obniżeniem transkrypcji tych genów oraz pobierania siarczanu o 75% w porównaniu do roślin kontrolnych. Ostatnio ukazała się praca pokazująca negatywny wpływ cytokinin na indukcję przez głodzenie siarkowe genu *APR2* oraz genu *At2g44460*, kodującego prawdopodobną tioglukozydazę [42]. Zdaniem autorów tej pracy cytokiny pełnią istotną funkcję w ogólnej odpowiedzi na deficyt siarki, podczas gdy auksyny biorą udział jedynie w regulowaniu pewnej podgrupy genów, np. genów kodujących białka odpowiedzialne za uwolnienie siarki z wewnątrzkomórkowych rezerw.

Kwas jasmonowy (JA) został zidentyfikowany jako induktor genów szlaku asymilacji siarki kodujących *SAT* i *APR* oraz biosyntezy glutationu [46,47], co jest związane z jego ważną rolą w przekazywaniu sygnału w różnych stresach. Pomimo tego że geny biosyntezy JA są zaindukowane w czasie głodzenia siarkowego [26,31,32] nie ma bezpośrednich danych na temat poziomu JA w tych warunkach.

Poziom GSH wzrasta po traktowaniu roślin zarówno kwasem abscysynowym [48], jak i kwasem salicylowym [49], jednak trudno jest ocenić czy obserwowane różnice wynikają z bezpośredniego czy pośredniego wpływu tych hormonów na ekspresję genów szlaku asymilacji siarki.

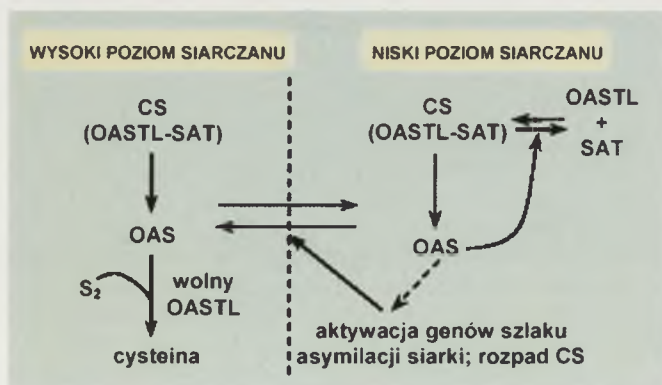
REGULACJA ZA POMOCĄ mikroRNA

Niedawno wykazano, że ten typ regulacji potranskrypcyjnej, który polega na kontrolowaniu stabilności lub hamowaniu translacji wybranych transkryptów przez specyficznie wiążące się do nich, krótkie (20-24 nt) cząsteczki, tzw. mikroRNA, ma znaczenie w odpowiedzi roślin na stresy biotyczne i abiotyczne oraz głodzenie fosforanowe i siarkowe [50]. Cząsteczka mikroRNA395 odgrywa potencjalną rolę w regulacji homeostazy siarczanu w roślinach poprzez regulację ekspresji genu kodującego transporter siarczanu *SULTR2;1* oraz genów kodujących trzy izoformy reduktazy APS [51]. Fizjologiczne znaczenie oraz szczegóły tego typu regulacji nie są jeszcze poznane.

REGULACJA POTRANSLACYJNA

Działanie potranslacyjnych mechanizmów regulacyjnych wykazano w przypadku transporterów siarczanu, które oprócz N-końcowej domeny trans membranowej, posiadają, oddzielną łącznikiem, C-końcową domenę STAS (ang. *sulfate transporters anti-sigma antagonist domain*) [52-54]. Domena ta przypomina domeny białek bakteryjnych, a mutacje w niej nie wpływają na błonową lokalizację białka, ale mimo wszystko istotnie redukują transport siarczanu przez transportery. Domena STAS wydaje się być niezbędna nie tylko do prawidłowej aktywności transporterów, ale także do ich biogenezy i stabilności.

Innym białkiem szlaku, które wydaje się być regulowane potranslacyjnie jest reduktaza APS, dla której zaproponowano model regulacji zależny od procesów redoks [55].



Rycina 3. Regulacja biosyntezy cysteiny poprzez tworzenie kompleksu syntazy cysteinowej (CS) przez białka OASTL i SAT. Szczegóły regulacji opisano w tekście.

Funkcjonowanie kompleksu syntazy cysteinowej jest, jak dotąd, jednym z lepiej scharakteryzowanych przykładów regulacji potranslacyjnej. Poziom syntetyzowanej cysteiny kontrolowany jest za pomocą dwóch nakładających się mechanizmów. Pierwszy to klasyczne sprzężenie zwrotne, wykorzystujące hamowanie niektórych roślinnych izoform SAT poprzez hamowanie produktem (ang. *feedback inhibition*), czyli cysteiną [56]. Z działaniem tego mechanizmu bardzo ściśle wiąże się niedawno odkryte zjawisko fosforylacji białka GmSERAT2;1 (izoforma SAT z soi zlokalizowana prawdopodobnie w cytosolu) przez zależną od wapnia kinazę CDPK (ang. *calcium-dependent protein kinase*). Fosforylacja ta zachodzi w odpowiedzi na stres oksydacyjny, a jej skutkiem jest zniesienie wrażliwości SAT na hamowanie produktem, co skutkuje zwiększoną produkcją cysteiny [57]. Funkcjonowanie tego mechanizmu regulatorowego jest uzasadnione przez wzrost zapotrzebowania na GSH i inne metabolity siarkowe w czasie stresu oksydacyjnego. Drugi mechanizm regulacyjny wykorzystuje fakt, że cząsteczki SAT występują zarówno w stanie wolnym, jak również w kompleksie z OAS-TL, tworząc tzw. syntazę cysteinową, której funkcjonowanie stwierdzono po raz pierwszy w bakteriach, a następnie potwierdzono w roślinach [58]. Aktywność obu enzymów zależy od tego czy występują one w stanie wolnym czy jako składniki kompleksu (Ryc. 3). Wolna forma OAS-TL, która jest obecna zawsze, ze względu na to, że jej stężenie w komórce jest 300 razy wyższe niż stężenie SAT, odpowiada za syntezę cysteiny w warunkach dostępności siarczku i OAS. Wolna forma SAT jest nieaktywna, natomiast SAT jako składnik kompleksu katalizuje powstawanie OAS. Kompleks SAT-OAS-TL tworzy się przy niskim stężeniu OAS, a rozpada się przy wysokim stężeniu tego związku.

Bardzo prawdopodobna jest również regulacja szlaku przez inne kinazy białkowe niż wspomniana powyżej CDPK. Kinazy z rodziny SnRK2 podobne są do białka SAC3 z *Chlamydomonas reinhardtii*, które zostało zidentyfikowane jako jeden z trzech regulatorów metabolizmu siarkowego w tych glonach [59]. Niedawno okazało się, że głodzenie siarkowe indukuje transkrypcję co najmniej kilku genów *A. thaliana* należących do tej rodziny. Wykazano ponadto, że w mutantach z nieaktywną kinazą SnRK2.3 odpowiedź na głodzenie siarkowe jest słabsza niż w linii kontrolnej, co sugerowałoby udział tej kinazy w regulacji szlaku asymilacji siarczanu [60].

PODSUMOWANIE

Siarka jest makroelementem istotnym dla prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Jej pobieranie, asymilacja oraz włączanie do dalszych szlaków metabolicznych podlegają regulacji zapewniającej optymalne dopasowanie metabolizmu siarkowego do dostępności źródła siarki oraz do zapotrzebowania na metabolity siarkowe. Zrozumienie mechanizmów regulacyjnych zajmuje szczególną rolę w badaniu metabolizmu siarki, ze względu nie tylko na dużą wartość poznawczą, ale także późniejszą możliwość wykorzystania uzyskanej wiedzy w pracach aplikacyjnych. Mimo iż ta gałąź biologii roślin rozwija się bardzo

intensywnie, ciągle jeszcze istnieje konieczność przeprowadzenia wielu badań w poszukiwaniu odpowiedzi na otwarte pytania dotyczące głównych elementów szlaku przekazywania informacji o statusie siarkowym rośliny oraz molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za dostosowanie metabolizmu roślin do dostępności źródła siarki. Wiedza ta pozwoli uzyskać rośliny optymalnie wykorzystujące zasoby środowiskowe, odporne na biotyczne i abiotyczne stropy oraz zawierające pożądany poziom metabolitów siarkowych.

PIŚMIENNICTWO

- Vestreng V, Myhre G, Fagerli H, Reis S, Tarrason L (2007) Twenty-five years of continuous sulphur dioxide emission reduction in Europe. *Atmosph Chem Phys* 7: 3663-3681
- Rausch T, Wachter A (2005) Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci* 10: 503-509
- Muttucumaru N, Halford NC, Elmore JS, Dodson AT, Parry M, Shewry PR, Mottram DS (2006) Formation of high levels of acrylamide during the processing of flour derived from sulfate-deprived wheat. *J Agric Food Chem* 54: 8951-8955
- Hawkesford MJ, De Kok LJ (2006) Managing sulphur metabolism in plants. *Plant Cell Environ* 29: 382-395
- Hawkesford MJ, Buchner P, Hopkins L, Howarth JR (2003) The plant sulfate transporter family: specialized functions and integration with whole plant nutrition. W: Davidian J-C, Grill D, De Kok LJ, Stuhlen I, Hawkesford MJ, Schnug E, Rennenberg H (red) *Sulfur transport and assimilation in plants: regulation, interaction and signaling*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. str. 1-10
- Buchner P, Stuiver CE, Westerman S, Wirtz M, Hell R, Hawkesford MJ, De Kok LJ (2004) Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in *Brassica oleracea* as affected by atmospheric H₂S and pedospheric sulfate nutrition. *Plant Physiol* 136: 3396-3408
- Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Yamaya T, Takahashi H (2004) Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation. *J Exp Bot* 55: 1843-1849
- Yoshimoto N, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Saito K, Takahashi H (2007) Posttranscriptional regulation of high-affinity sulfate transporters in *Arabidopsis* by sulfur nutrition. *Plant Physiol* 145: 378-388
- Yoshimoto N, Inoue E, Saito K, Yamaya T, Takahashi H (2003) Phloem-localizing sulfate transporter, Sultr1;3, mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131: 1511-1517
- Kataoka T, Hayashi N, Yamaya T, Takahashi H (2004) Root-to-shoot transport of sulfate in *Arabidopsis*. Evidence for the role of SULTR3;5 as a component of low-affinity sulfate transport system in the root vasculature. *Plant Physiol* 136: 4198-4204
- Krusell L, Krause K, Ott T, Desbrosses G, Kramer U, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, James EK, Sandal N, Stougaard J, Kawaguchi M, Miyamoto A, Suganuma N, Udvardi MK (2005) The sulfate transporter SST1 is crucial for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* root nodules. *Plant Cell* 17: 1625-1636
- Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Hawkesford MJ, Yamaya T, Takahashi H (2004) Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2693-2704
- Blake-Kalff MM, Harrison KR, Hawkesford MJ, Zhao FJ, McGrath SP (1998) Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiol* 118: 1337-1344
- Kopriva S, Koprivova A (2004) Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future. *J Exp Bot* 55: 1775-1783

15. Sekine K, Fujiwara M, Nakayama M, Takao T, Hase T, Sato N (2007) DNA binding and partial nucleoid localization of the chloroplast stromal enzyme ferredoxin:sulfite reductase. *FEBS J* 274: 2054-2069
16. Suter M, von Ballmoos P, Kopriva S, den Camp RO, Schaller J, Kuhlemeier C, Schurmann P, Brunold C (2000) Adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase and adenosine 5'-phosphosulfate reductase are identical enzymes. *J Biol Chem* 275: 930-936
17. Klein M, Papenbrock J (2004) The multi-protein family of *Arabidopsis* sulphotransferases and their relatives in other plant species. *J Exp Bot* 55: 1809-1820
18. Kopriva S (2006) Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. *Ann Bot (Lond)* 97: 479-495
19. Hansch R, Lang C, Rennenberg H, Mendel RR (2007) Significance of plant sulfite oxidase. *Plant Biol (Stuttg)* 9: 589-595
20. Lang C, Popko J, Wirtz M, Hell R, Herschbach C, Kreuzwieser J, Rennenberg H, Mendel RR, Hansch R (2007) Sulphite oxidase as key enzyme for protecting plants against sulphur dioxide. *Plant Cell Environ* 30: 447-455
21. Leustek T (2002) Sulfate Metabolism, W: Somerville CR, Meyerowitz EM (Red) *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD
22. Balk J, Lobreaux S (2005) Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci* 10: 324-331
23. Hatzfeld Y, Maruyama A, Schmidt A, Noji M, Ishizawa K, Saito K (2000) beta-Cyanoalanine synthase is a mitochondrial cysteine synthase-like protein in spinach and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 123: 1163-1171
24. Noctor G (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ* 29: 409-425
25. Kredich NM (1996) Biosynthesis of cysteine, W: Neidhardt FC, Curtiss R, Ingraham JL, Linn ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger M (red) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. ASM Press, Washington DC. str. 514-527
26. Hirai MY, Fujiwara T, Awazuwara M, Kimura T, Noji M, Saito K (2003) Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA microarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *Plant J* 33: 651-663
27. Hopkins L, Parmar S, Blaszczyk A, Hesse H, Hoefgen R, Hawkesford MJ (2005) O-acetylserine and the regulation of expression of genes encoding components for sulfate uptake and assimilation in potato. *Plant Physiol* 138: 433-440
28. Hirai MY, Klein M, Fujikawa Y, Yano M, Goodenowe DB, Yamazaki Y, Kanaya S, Nakamura Y, Kitayama M, Suzuki H, Sakurai N, Shibata D, Tokuhisa J, Reichelt M, Gershenzon J, Papenbrock J, Saito K (2005) Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in *Arabidopsis* by integration of metabolomics and transcriptomics. *J Biol Chem* 280: 25590-25595
29. Nikiforova VJ, Kopka J, Tolstikov V, Fiehn O, Hopkins L, Hawkesford MJ, Hesse H, Hoefgen R (2005) Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol* 138: 304-318
30. Kruse C, Jost R, Lipschis M, Kopp B, Hartmann M, Hell R (2007) Sulfur-enhanced defence: effects of sulfur metabolism, nitrogen supply, and pathogen lifestyle. *Plant Biol (Stuttg)* 9: 608-619
31. Maruyama-Nakashita A, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Yamaya T, Takahashi H (2003) Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiol* 132: 597-605
32. Nikiforova V, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H, Hoefgen R (2003) Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant J* 33: 633-650
33. Wawrzynska A, Lewandowska M, Hawkesford MJ, Sirko A (2005) Using a suppression subtractive library-based approach to identify tobacco genes regulated in response to short-term sulphur deficit. *J Exp Bot* 56: 1575-1590
34. Hirai MY, Saito K (2004) Post-genomics approaches for the elucidation of plant adaptive mechanisms to sulphur deficiency. *J Exp Bot* 55: 1871-1879
35. Hirai MY, Yano M, Goodenowe DB, Kanaya S, Kimura T, Awazuwara M, Arita M, Fujiwara T, Saito K (2004) Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10205-10210
36. Nikiforova VJ, Daub CO, Hesse H, Willmitzer L, Hoefgen R (2005) Integrative gene-metabolite network with implemented causality deciphers informational fluxes of sulphur stress response. *J Exp Bot* 56: 1887-1896
37. Nikiforova VJ, Gakiere B, Kempa S, Adamik M, Willmitzer L, Hesse H, Hoefgen R (2004) Towards dissecting nutrient metabolism in plants: a systems biology case study on sulphur metabolism. *J Exp Bot* 55: 1861-1870
38. Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Watanabe-Takahashi A, Inoue E, Yamaya T, Takahashi H (2005) Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots. *Plant J* 42: 305-314
39. Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Tohge T, Saito K, Takahashi H (2006) *Arabidopsis* SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulfur response and metabolism. *Plant Cell* 18: 3235-3251
40. Kasajima I, Ohkama-Ohtsu N, Ide Y, Hayashi H, Yoneyama T, Suzuki Y, Naito S, Fujiwara T (2007) The *BIG* gene is involved in regulation of sulfur deficiency-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 129: 351-363
41. Hirai MY, Sugiyama K, Sawada Y, Tohge T, Obayashi T, Suzuki A, Araki R, Sakurai N, Suzuki H, Aoki K, Goda H, Nishizawa OI, Shibata D, Saito K (2007) Omics-based identification of *Arabidopsis* Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6478-6483
42. Dan H, Yang G, Zheng ZL (2007) A negative regulatory role for auxin in sulphate deficiency response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 63: 221-235
43. Dugardeyn J, Vandenbussche F, Van Der Straeten D (2008) To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by in silico gene expression analysis? *J Exp Bot* 59: 1-16
44. Frankowski K, Kęsy J, Kopcewicz J (2006) Regulacja biosyntezy etylenu w roślinach. *Postepy Biochem* 53: 66-73
45. Ohkama N, Takei K, Sakakibara H, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T (2002) Regulation of sulfur-responsive gene expression by exogenously applied cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43: 1493-1501
46. Jost R, Altschmied L, Bloem E, Bogs J, Gershenzon J, Hahnel U, Hansch R, Hartmann T, Kopriva S, Kruse C, Mendel RR, Papenbrock J, Reichelt M, Rennenberg H, Schnug E, Schmidt A, Textor S, Tokuhisa J, Wachter A, Wirtz M, Rausch T, Hell R (2005) Expression profiling of metabolic genes in response to methyl jasmonate reveals regulation of genes of primary and secondary sulfur-related pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth Res* 86: 491-508
47. Sasaki-Sekimoto Y, Taki N, Obayashi T, Aono M, Matsumoto F, Sakurai N, Suzuki H, Hirai MY, Noji M, Saito K, Masuda T, Takamiya K, Shibata D, Ohta H (2005) Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* 44: 653-668
48. Jiang M, Zhang J (2001) Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiol* 42: 1265-1273
49. Fodor J, Gullner G, Adam AL, Barna B, Komives T, Kiraly Z (1997) Local and systemic responses of antioxidants to Tobacco Mosaic Virus infection and to salicylic acid in tobacco (role in systemic acquired resistance). *Plant Physiol* 114: 1443-1451
50. Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2007) Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci* 12: 301-309

51. Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14: 787-799
52. Shibagaki N, Grossman AR (2004) Probing the function of STAS domains of the *Arabidopsis* sulfate transporters. *J Biol Chem* 279: 30791-30799
53. Rouached H, Berthomieu P, El Kassis E, Cathala N, Catherinot V, Labesse G, Davidian JC, Fourcroy P (2005) Structural and functional analysis of the C-terminal STAS (sulfate transporter and anti-sigma antagonist) domain of the *Arabidopsis thaliana* sulfate transporter SUL-TR1.2. *J Biol Chem* 280: 15976-15983
54. Shibagaki N, Grossman AR (2006) The role of the STAS domain in the function and biogenesis of a sulfate transporter as probed by random mutagenesis. *J Biol Chem* 281: 22964-22973
55. Bick JA, Setterdahl AT, Knaff DB, Chen Y, Pitcher LH, Zilinskas BA, Leustek T (2001) Regulation of the plant-type 5'-adenylyl sulfate reductase by oxidative stress. *Biochemistry* 40: 9040-9048
56. Noji M, Inoue K, Kimura N, Gouda A, Saito K (1998) Isoform-dependent differences in feedback regulation and subcellular localization of serine acetyltransferase involved in cysteine biosynthesis from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 273: 32739-32745
57. Liu F, Yoo BC, Lee JY, Pan W, Harmon AC (2006) Calcium-regulated phosphorylation of soybean serine acetyltransferase in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 281: 27405-27415
58. Droux M, Ruffet ML, Douce R, Job D (1998) Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase in higher plants – structural and kinetic properties of the free and bound enzymes. *Eur J Biochem* 255: 235-245
59. Davies JP, Yildiz FH, Grossman AR (1999) Sac3, an Snf1-like serine/threonine kinase that positively and negatively regulates the responses of *Chlamydomonas* to sulfur limitation. *Plant Cell* 11: 1179-1190
60. Kimura T, Shibagaki N, Ohkama-Ohtsu N, Hayashi H, Yoneyama T, Davies JP, Fujiwara T (2006) Arabidopsis SNRK2.3 protein kinase is involved in the regulation of sulfur-responsive gene expression and O-acetyl-L-serine accumulation under limited sulfur supply. *Soil Sci Plant Nutr* 52: 211-220

Sulfur metabolism and its regulation in plants

Grzegorz Moniuszko[✉], Agnieszka Sirko

Institute of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences; 5A Pawlinskiego St., 02-106 Warsaw, Poland

[✉]e-mail: Mongr@ibb.waw.pl

Key words: gene expression, glutathione, regulation, sulfur metabolism in plants, sulfate deficit

ABSTRACT

Sulfur, one of the vital macroelements, is present in nature in several redox forms (S^{+VI} , S^{+IV} , S^{-II} , S^0). In most organic compounds sulfur is present in the reduced form (S^{-II}), while most inorganic sulfur is oxidized, in a form of sulfate (S^{+VI}). Animals and humans can incorporate only the organic forms of sulfur, present in sulfur-containing amino acids. Plants, most bacteria and fungi are able to uptake inorganic sulfate, gradually reduce it and assimilate it into variety of organic compounds. Knowledge of the regulatory mechanisms of this process is a key factor for understanding relationships between availability of sulfur source and plant growth and development, their resistance to environmental stresses and nutritional value of edible crops. Recently, a number of research groups conducted intensive investigations on sulfur metabolism and its regulation in plants. The aim of this review is to inform the Polish reader about the new results and concepts in this field.

Receptory sprzężone z białkami G, heterotrimeryczne białka G i białka efektorowe roślin

Stanisław Kowalczyk[✉]

Anna Hetmann

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

[✉] Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; e-mail: kowalcz@uni.torun.pl

Artykuł otrzymano 19 marca 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 7 czerwca 2008 r.

Słowa kluczowe: GPCR, białka G, białka efektorowe roślin

Wykaz skrótów: ABA – kwas abscysynowy; ABI1 (ang. *ABA-insensitive1*) – fosfataza białkowa typu 2C; AtGCR1 (ang. *A. thaliana G-coupled receptor1*) – receptor sprzężony z białkiem G *A. thaliana*; AtRGS1 (ang. *A. thaliana regulator of G-protein signaling1*) – białko regulujące sygnalizację zależną od białka G *A. thaliana*; GDI (ang. *GDP dissociation inhibitor*) – inhibitor dysocjacji GDP; GPCR (ang. *G-protein-coupled receptor*) – receptor sprzężony z białkami G; HHP (ang. *heptahelical protein*) – białka z siedmioma helisami; MLO (ang. *mildew resistance locus o*) – locus o związany z odpornością na pleśń; PD1 (ang. *prephenate dehydratase1*) – dehydrataza preferenianowa1; PsiP (ang. *pollen-signalling protein*) – białko pyłku wykazujące aktywność cyklazy adenylanowej; THF1 (ang. *thylakoid formation1*) – białko błonowe plastydów; XLG (ang. *extra-large GTP-binding protein*) – ekstra-duże białko wiążące GTP

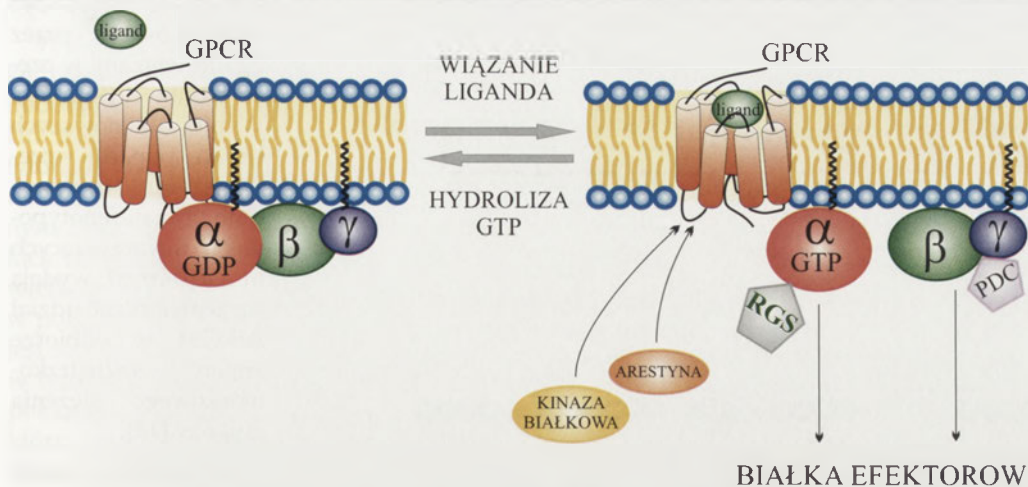
STRESZCZENIE

Nadrodzina receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR) ssaków jest jedną z największych i najbardziej zróżnicowanych grup białek. Rośliny, w przeciwieństwie do zwierząt, dysponują znacząco mniej licznym zestawem receptorów współdziałających z białkami G. Możliwość fizycznego oddziaływania z białkiem G potwierdzono tylko w przypadku AtGCR1 i AtRGS1. Także liczba poszczególnych podjednostek białka G u roślin w porównaniu z innymi eukariontami jest zdecydowanie mniejsza. Po jednym genie *Ga* i *Gβ* oraz po dwa *Gγ* zidentyfikowano u *A. thaliana* i ryżu. Nieliczne są też białka efektorowe oddziałujące z podjednostką *Ga* i dimerem *Gβγ*. Najlepiej poznanym efektorom jest fosfolipaza D (PLDα1). Potencjalnymi białkami efektorowymi są także: Atpirin1 zawierające domenę kupinową, dehydrataza preferenianowa – enzym cytoplazmatyczny uczestniczący w regulacji szlaku kwasu szikimowego oraz zlokalizowane w błonie plastydów białko THF1. Ponadto, nieliczne doniesienia sugerują możliwość oddziaływania *Ga* z kanałami jonowymi oraz fosfolipazami *A₂* i *C*, a dimeru *Gβγ* z transporterem heksoz zlokalizowanym w błonach aparatu Golgiego

WPROWADZENIE

Receptory sprzężone z białkami G (GPCR) (ang. *G-protein-coupled receptor*) tworzą u zwierząt największą i funkcjonalnie najbardziej zróżnicowaną grupę receptorów, które łączy wspólny schemat budowy. Wszystkie GPCR mają siedem odcinków transbłonowych (TMI – TMVII) połączonych trzema pętlami zewnątrzkomórkowymi (e1-e3) i trzema pętlami wewnątrzkomórkowymi (i1-i3). Zakończenie łańcucha białkowego z wolną grupą aminową znajduje się na zewnątrz, natomiast C-koniec skierowany jest do wewnątrz komórki. Odpowiednie odcinki pętli wewnątrzkomórkowych GPCR, zwykle jest to pętla i3, wiążą nieaktywny heterotrimer białka G (*Ga*-GDP/*Gβγ*). Zmiany konformacyjne towarzyszące wiązaniu liganda, przenoszone poprzez pętle wewnątrzkomórkowe na podjednostkę *Ga*-GDP, wymuszają oddysocjowanie związanego z nią GDP oraz przyłączenie, występującego w cytoplazmie w wyższym stężeniu, GTP. Wymiana GDP na GTP oraz zależne od niej zmiany konformacyjne w *Ga* rozluźniają wiązanie między *Ga*-GTP a heterodimerem *Gβγ*, umożliwiając niezależne oddziaływanie obu białek z odpowiednimi efektorami wewnątrzkomórkowymi – enzymami lub kanałami jonowymi (Ryc. 1). Oddziaływanie *Ga*-GTP z białkiem efektorowym zostaje przerwane wraz z hydrolizą związanego GTP. Aktywność GTPazowa podjednostki *Ga* może być stymulowana przez samo białko efektorowe bądź przez dodatkowe białko RGS (ang. *regulator of G-protein signaling*). Zmiany konformacyjne w *Ga*-GDP, towarzyszące odszczepieniu reszty fosforanowej, umożliwiają reasocjację *Ga* z *Gβγ* i wiązanie heterotrimeru z GPCR. W kompleksie receptora z *Ga*-GDP/*Gβγ*, dimer *Gβγ* działa jako inhibitor dysocjacji GDP (GDI) (ang. *GDP dissociation inhibitor*) hamujący spontaniczne uwalnianie GDP z *Ga*. GPCR może także podlegać samoregulacji poprzez desensytyzację (odwrażliwienie), która polega na fosforylacji przez odpowiednią kinazę białkową reszt serynowych i treoninowych położonych w pętli i3 i odcinku C-końcowym GPCR i przyłączeniu dodatkowego białka – arestyny [1,2]. Dimer *Gβγ* może wiązać fosducynę (PDC) bądź jej homologi, białka przeciwdziałające reasocjacji heterodimeru z *Ga*.

W bazach danych zdeponowano już prawie pięć tysięcy sekwencji kodujących receptory nadrodziny GPCR, podzielonej – przez różnych autorów – na pięć, sześć, a nawet siedem głównych klas [3-6, baza sekwencji GPCR <http://www.gpcr.org/7tm/>]. Najliczniejszą klasę tworzą białka podobne do rodopsyny (około 4350 sekwencji) z ponad 700 białkami kodowanymi przez genom człowieka [7]. Pozostałe klasy GPCR są mniej liczne. Klasa białek podobnych do sekretyny liczy około 200 sekwencji, białka podobne do metabotropowego receptora glutaminianergicznego – 135 sekwencji, a najmniej liczne klasy tworzą białka podobne do receptora feromonu u grzybów (24 sekwencje) i receptory cAMP u *Dictyostelium discoideum* (5 sekwencji) [4]. W sumie genom człowieka



Rycina 1. Aktywacja heterotrimerycznego białka G przez GPCR oraz mechanizmy wygaszania sygnału i regulacji aktywności podjednostek Ga i Gβγ.

zawiera około 900 genów typu GPCR [6], genom *Caenorhabditis elegans* ponad 1000, a u *Drosophila melanogaster* zidentyfikowano ponad 250 genów GPCR [5].

Nieporównywalnie mniejsza jest liczba GPCR u roślin, bowiem genom rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) zawiera od sześciu [5] do około dwudziestu genów GPCR [6,8,9]. Większą liczbę GPCR sugeruje się na nowym algorytmie, wytypowano w *A. thaliana* 394 sekwencje kodujące białka z siedmioma helisami transbłonowymi, z czego aż 54 sekwencje – wg autorów – powinny być brane pod uwagę jako potencjalne geny GPCR [10]. Niestety, badania eksperymentalne nie nadążają za poszukiwaniami *in silico*, gdyż do dzisiaj w *A. thaliana* udało się zidentyfikować tylko jeden gen (*AtGCR1*), którego przynależność do nadrodziny GPCR nie budzi wątpliwości [8]. Ponadto, poznano gen *AtRGS1* kodujący białko z siedmioma odcinkami transbłonowymi i wewnątrzkomórkową domeną RGS, które, jak pokazują najnowsze doświadczenia, wydaje się pełnić funkcję czujnika zewnątrzkomórkowego stężenia glukozy [11,12]. Nadzieja na przełamanie impasu pojawiła się w ubiegłym roku, po tym jak doniesiono, że nowo poznany gen *GCR2* *A. thaliana* koduje białko typu GPCR, będące receptorem kwasu abscysynowego (ABA) [13]. Niestety, wyniki najnowszych badań poddają w wątpliwość poprawność metodyczną powyższych badań, a ponadto dowodzą, że *GCR2* nie tylko nie jest receptorem ABA, ale w ogóle nie należy do białek nadrodziny GPCR [14,15].

Bardziej kompletna jest wiedza na temat heterotrimerycznych białek G u roślin. Wyniki przeprowadzonych już badań ujawniły, że genomy trzynastu przebadanych roślin (trzech jednoliściennych i dziesięciu dwuliściennych) zawierają po jednym genie, a tylko u grochu, soi i tytoniu znaleziono po dwa geny *Ga* [16]. Wszystkie badane rośliny, z wyjątkiem grochu i tytoniu, mają także po jednym genie *Gβ*, a po dwa geny *Gγ* znaleziono w genomach rzodkiewnika, ryżu i grochu [16,17]. Dla porównania warto przypomnieć, że genom człowieka zawiera 16 genów *Ga*, które w wyniku alternatywnego składania kodują 23 białka dzielone na 4 ro-

dziny (G_{α_s} , G_{α_i} , G_{α_q} i $G_{\alpha_{12/13}}$). Ponadto zidentyfikowano 5 genów *Gβ* i 12 genów *Gγ* [1,2].

Rozwój nowych technik badawczych, szczególnie technik opartych na klasycznym drożdżowym systemie dwuhybrydowym, ułatwia poszukiwania enzymów i białek efektorowych oddziałujących z $G\alpha$ -GTP i dimerami $G\beta\gamma$. To dzięki tym nowym technikom udało się w *A. thaliana* zidentyfikować kilka białek efektorowych, które nie mają swoich odpowiedników u zwierząt.

Z drugiej strony, wartym podkreślenia jest fakt, iż w genomach rzodkiewnika i ryżu nie znaleziono sekwencji, które by potwierdzały występowanie w roślinach cykloazy adenylanowej czy fosfolipazy $C\beta$ ($PLC\beta$) – enzymów efektorowych szczegółowo badanych u zwierząt i drożdży.

Celem niniejszej pracy jest próba podsumowania wyników dotychczasowych badań poświęconych receptorom typu GPCR, białkom G oraz aktywowanym przez nie szlakom sygnałowym u roślin. Praca jest trzecim z kolei artykułem przeglądowym poświęconym receptorom błonowym u roślin. Dwie wcześniejsze prace, opublikowane w Postępkach Biochemii, dotyczyły receptorów błonowych o aktywności kinaz histydynowo/asparaginianowych [18] oraz kinaz serynowo/treoninowych [19]. Uwadze zainteresowanego Czytelnika polecamy także artykuły przeglądowe opublikowane w ostatnich latach w czasopiśmie o zasięgu ogólnosięciowym [16,20-23].

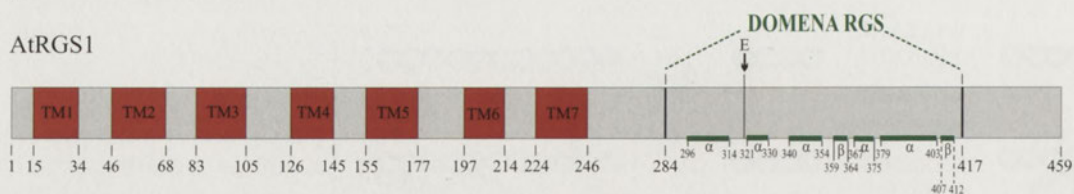
POSZUKIWANIA RECEPTORÓW GPCR, BIAŁEK G I ENZYMÓW EFEKTOROWYCH U ROŚLIN

RECEPTORY SPRZĘŻONE Z BIAŁKAMI G

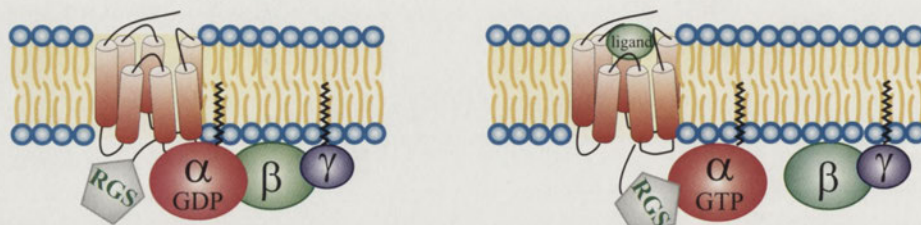
Przed jedenastu laty w genomie *A. thaliana* zidentyfikowano sekwencję kodującą 326 aminokwasowe białko z siedmioma hydrofobowymi odcinkami, którego sekwencja aminokwasowa jest w 23% identyczna z sekwencją receptora cAMP (*CAR1*) z *Dictyostelium discoideum* [24]. Dwie reszty cysteiny, położone podobnie jak u wielu GPCR w obrębie pętli e1 i e2, a także obecność kilku innych ewolucyjnie zachowanych motywów, wskazywała na przynależność białka *GCR1* (ang. *G-coupled receptor1*) do nadrodziny GPCR [25,26]. Fenotyp roślin z obniżonym poziomem transkryptu *GCR1*, przypominający fenotyp mutanta *cyr1* niewrażliwego na cytokininę, sugerował, że *GCR1* może być receptorem cytokinin. W kolejnych doświadczeniach sugestia ta nie została pozytywnie zweryfikowana [27], natomiast potwierdzono możliwość fizycznego oddziaływania *GCR1* z podjednostką $G\alpha$ [8]. Wykorzystując technikę immunostrącania oraz jedną z technik drożdżowego systemu dwuhybrydowego, określaną jako „*split ubiquitin system*”, która

A

AtRGS1



B



Rycina 2. Schemat budowy oraz proponowane mechanizmy funkcjonowania AtRGS1 jako receptora błonowego. A – region N-końcowy AtRGS1 zawiera siedem odcinków transbłonowych, natomiast w części C-końcowej położona jest zbudowana z 133 reszt aminokwasowych domena RGS z resztą kwasu glutaminowego (N₃₂₀), pośredniczącą w oddziaływaniu z G α ; B – AtRGS1 może funkcjonować jako receptor typu GPCR, aktywujący G α -GDP/G $\beta\gamma$, zawierający dodatkowo domenę RGS inaktywującą G α -GTP, bądź jest receptorem, który bezpośrednio nie oddziałuje z G α -GDP/G $\beta\gamma$, natomiast zmiany towarzyszące wiązaniu liganda (D-glukozy?) w części błonowej modyfikują aktywność jego domeny RGS. Opracowano na podstawie [11,12]; szczegóły w tekście.

umożliwia badanie oddziaływań między białkami zakotwiczonymi w błonie, ustalono, że w wiązaniu G α uczestniczą motywy położone w pętłach i2 i i3 oraz w odcinku C-końcowym GCR1 [8]. Niestety, mimo że od pierwszego doniesienia na temat GCR1 upłynęło już jedenaście lat, to nadal nie jest znany jego ligand, a wyniki sugerujące udział GCR1 w szlakach sygnałowych aktywowanych przez ABA i cukru [28], a także w szlakach aktywowanych przez światło niebieskie o niskim natężeniu [29,30] pochodzą wyłącznie z badań prowadzonych na mutantach.

Ortologiem GCR1 jest poznany w grochu gen *PsGCR1* kodujący białko zbudowane z 335 reszt aminokwasowych, którego sekwencja jest w 50% identyczna z AtGCR1. Białko *PsGCR1* oddziałuje z obydwooma występującymi tu białkami G α [17]. W ubiegłym roku, w artykule opublikowanym w *Science*, doniesiono o wyselekcjonowaniu w *A. thaliana* drugiego obok GCR1 genu z nadrodziny GPCR kodującego receptor kwasu absycynowego (ABA) [13,31]. Wyniki tych doświadczeń zostaną omówione w dalszej części pracy, mimo że najnowsze doniesienia nie potwierdzają receptornej roli AtGCR2.

Kilka lat temu w genomie *A. thaliana* poznano gen *AtRGS1* kodujący białko zbudowane z 459 reszt aminokwasowych, które w N-końcowym fragmencie ma siedem odcinków transbłonowych, a w cytoplazmatycznym fragmencie C-końcowym posiada domenę charakterystyczną dla białek RGS (ang. *regulator of G-protein signaling*) (Ryc. 2A) [11]. Obecność odcinków transbłonowych, odróżniających AtRGS1 od poznanych wcześniej u zwierząt cytoplazmatycznych białek RGS [32], sugeruje, że AtRGS1 może być zmienionym receptorem funkcjonującym w sprzężeniu z białkami G, a dodatkowo aktywującym hydrolizę GTP związanego z G α , bądź że jest receptorem, w którym oddziaływanie domeny RGS

z G α -GTP może być modyfikowane przez ligand wiązany w części błonowej (Ryc. 2B). Wyniki najnowszych badań, poparte wcześniejszymi obserwacjami zmian fenotypowych towarzyszących mutacji *Atrgs1*, wydają się potwierdzać udział AtRGS1 w odbiorze zmian zewnątrzkomórkowego stężenia glukozy [12].

W ostatnim czasie zwrócono uwagę na rodzinę HHP (ang. *heptahelical protein*) obejmującą w *A. thaliana* pięć genów, których produkty są podobne do receptorów progestyny i adyponektyny [9]. Poznany niedawno receptor progestyny, syntetycznego hormo-

nu steroidowego o aktywności zbliżonej do progesteronu, u ryby *Cynoscion nebulosus* jest rzeczywiście przedstawicielem jednej z grup receptorów GPCR [33], natomiast receptory adyponektyny (AdipoR1 i AdipoR2), mimo że mają siedem odcinków transbłonowych, to strukturalnie i funkcjonalnie nie przynależą do nadrodziny GPCR [34]. Rola białek HHP na razie nie jest znana, a wyniki dotychczasowych doświadczeń informują jedynie o warunkach ekspresji poszczególnych HHP, która, jak się okazuje, aktywowana jest przez światło i sacharozę oraz podlega regulacji przez niektóre fitohormony [9].

Genom *A. thaliana* zawiera co najmniej 15 genów homologicznych z poznany w jęczmieniu genem *MLO* (ang. *mildew resistance locus o*) kodującym białko zbudowane z siedmiu odcinków transbłonowych, które odgrywa rolę negatywnego regulatora odpowiedzi obronnych przeciw patogennemu grzybowi *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* [35]. Okazało się jednak, że *MLO* oddziałuje z kalmoduliną i syntaksyną ROR2 i przypuszczalnie uczestniczy w procesach związanych z transportem pęcherzykowym [36]. Brak funkcjonalnego związku *MLO* z białkiem G w jęczmieniu poddaje w wątpliwość przynależność *MLO-like* *A. thaliana* do nadrodziny GPCR, bowiem wszystkie białka *MLO*-podobne o zróżnicowanej wielkości (od 476 do 593 reszt aminokwasowych) w części C-końcowej mają motyw wiążący wapń, z którym oddziałuje kalmodulina [37,38]. Wydaje się więc, że białka typu *MLO* *A. thaliana*, zaliczane przez niektórych autorów do GPCR, faktycznie funkcjonują niezależnie od białek G. W tym miejscu warto przypomnieć, że u zwierząt zidentyfikowano wiele białek z siedmioma odcinkami transbłonowymi, niektóre także zawierające motyw wiążący kalmodulinę, pełniące różne funkcje niezależnie od białek G [39].

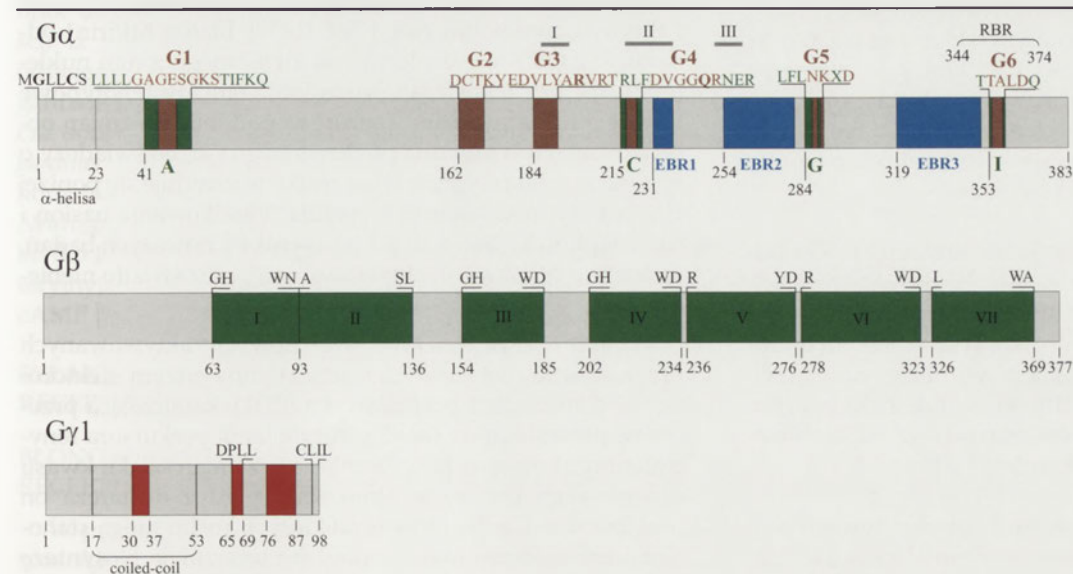
HETEROTRIMERYCZNE BIAŁKA G

W 1990 roku zidentyfikowano i sklonowano gen *GPA1* kodujący w *A. thaliana* białko Ga [40], a rok później u pomidora poznano jego ortolog – *TGA1* [41]. W następnych latach wyselekcjonowano geny *Ga* w komonicy, soi, grochu, tytoniu i ryżu [16,17,23] oraz poznano niektóre właściwości rekombinowanego białka *Ga* ryżu uzyskanego w bakteryjnym układzie ekspresyjnym [42,43]. Białka *Ga* z wszystkich trzynastu badanych dotychczas roślin mają zbliżoną wielkość (380-385 reszt aminokwasowych) i są identyczne w ponad 80%. Podobieństwo do *Ga* z innych organizmów jest stosunkowo niewielkie, bowiem poziom identyczności w tym wypadku nie przekracza 34-42% [23]. Na rycinie 3 pokazano schemat budowy polipeptydu *Ga* *A. thaliana*, który, podobnie jak białka z innych roślin, na N-końcu ma motyw *MGXXCS* z resztami glicyny i cysteiny ulegającymi mirystylacji i S-acylacji [44,45]. Pierwsze 23 reszty na N-końcu tworzą helisę α , która oddziałuje z podjednostką $G\beta$ i uczestniczy w wiązaniu z GPCR. Sekwencja aminokwasowa tego fragmentu białek *Ga* z różnych roślin jest wyraźnie zróżnicowana [44], natomiast wspólną cechą wszystkich białek *Ga* roślin, a także białek pochodzących z innych organizmów, jest obecność czterech ewolucyjnie zachowanych motywów (A,C,G,I) oraz sześciu krótszych sekwencji (G1 do G6) uczestniczących w wiązaniu nukleotydu guanidynowego (Ryc. 3) [16,39,44]. Motyw A (G_{45} AGESGKS) tworzy pętlę P rozpoznającą nukleotyd, motyw C, a szczególnie zawarta w nim sekwencja G4 (D_{218} VGGQ) gra kluczową rolę w aktywności GTPazowej, natomiast sekwencja N_{287} KFD w obrębie motywu G5 rozpoznaje guaninę. Reszta argininy (R_{190}) położona w odcinku G3 może być ADP-rybozylowana przez toksynę cholery, skutkiem czego zostaje zablokowana aktywność GTPazowa. Białko *Ga* może także utracić aktywność GTPazową w wyniku mutacji polegającej na zastąpieniu reszty glutaminy (Q_{222}) położonej w G4 przez leucynę (mutacja QL) [16]. Trzy odcinki określane jako przełączniki -I (reszty 188 do 199), -II (reszty 218 do 237) i -III (reszty 249 do 260) tworzą giętkie regiony, które zmieniają konformację w odpowiedzi na wymianę nukleotydów bądź hydrolizę GTP. Wyróżnia się też trzy regiony EBR (ang. *ef-*

ector-binding region) pośredniczące w oddziaływaniach z białkiem efektorowym. W roślinnych *Ga* sekwencje EBR1 i EBR2 wykazują wyraźną zachowawczość ewolucyjną, podczas gdy region EBR3 jest wyraźnie zróżnicowany. W części C-końcowej położony jest zbudowany z około 40 reszt aminokwasowych odcinek RBR (ang. *receptor binding region*), który pośredniczy w wiązaniu *Ga* z receptorem GPCR. W jego końcowej części brakuje reszty cysteiny, która w niektórych *Ga* zwierząt może być ADP-rybozylowana przez toksynę krztuśca, co zaburza wiązanie *Ga* z GPCR. Na uwagę zasługuje wyraźniejsze podobieństwo odcinka C-końcowego *Ga* roślin dwuliściennych z odpowiednimi odcinkami *Ga*, zwłaszcza *Gi* i *Go*, ssaków. Ten sam fragment *Ga* z roślin jednoliściennych (ryż, jęczmień, pszenica) jest wyraźnie odmienny, co może nasuwać pewne przypuszczenia o zróżnicowaniu białek receptorowych w roślinach jedno- i dwuliściennych [16]. Istotna różnica między białkami *Ga* roślin, a ich odpowiednikami u zwierząt dotyczy aktywności GTPazowej, która w roślinnych *Ga* jest bardzo niska, natomiast stosunkowo wysoka jest szybkość wymiany GDP na GTP. W konsekwencji białko *Ga* izolowane z roślin ma zwykle związany GTP [12,16]. Niska aktywność GTPazowa roślinnych *Ga* może mieć kluczowe znaczenie dla mechanizmu przenoszenia sygnału, który – jak sugerują ostatnio niektórzy autorzy – u roślin może być krańcowo odmienny od tego, jaki poznano u zwierząt [12].

Oprócz genu kodującego klasyczne białko *Ga*, genom *A. thaliana* zawiera 3, a ryżu 4 geny ekstra-dużych białek G (XLG) o nieznannej funkcji [46]. Białka XLG, dwukrotnie większe od klasycznych *Ga* (800-900 reszt aminokwasowych), mają w części C-końcowej sekwencję homologiczną z *Ga*, natomiast w części N-końcowej region bogaty w reszty cysteiny oraz motyw NLS kierujący białko do jądra.

U większości badanych roślin, w tym także w genomie rzodkiewnika i ryżu, zidentyfikowano po jednym genie $G\beta$ [16,23], a po dwa jego ortologi znaleziono tylko u tytoniu i grochu [17,44,47]. Ponadto wykazano, że ekspresja $G\beta$ zachodzi we wszystkich badanych tkankach, a chimery $G\beta$ -GFP lokalizowano w błonie plazmatycznej i jądrze ko-



Rycina 3. Schemat budowy polipeptydów *Ga*, $G\beta$ i $G\gamma 1$ *Arabidopsis thaliana*. Opracowano na podstawie [16,40,44,47,51]; szczegóły w tekście.

mórkowym [48-50]. Polipeptyd $G\beta$ *A. thaliana*, zbudowany z 377 reszt aminokwasowych (41,3 kDa), w części N-końcowej tworzy helisę α , a dalej strukturę śmigła z siedmioma „łopatkami” utworzoną przez siedem motywów WD-40 (Ryc. 3). [16,47]. C-końcowy 35 aminokwasowy odcinek tworzy „kieszkań farnezylową”, w której, po uwolnieniu z błony heterodimeru $G\beta\gamma$ w wyniku działania fosducyny, chowa się reszta farnezyliu związanego z $G\gamma$. W genomie *A. thaliana* nie znaleziono se-

kwencji arestyny, natomiast występuje pojedyncza sekwencja kodująca odpowiednik zwierzęcej fosfucyny [16].

Wykorzystując technikę drożdżowego systemu dwuhybrydowego, poznano w *A. thaliana* dwa geny *AGG1* i *AGG2*, kodujące zbudowane z 98 i 100 reszt aminokwasowych podjednostki G γ (10,8 i 11,1 kDa), posiadające w części C-końcowej motyw CLIL z resztą cysteiny ulegającej prenylacji (Ryc. 3) [51,52]. W najnowszych badaniach potwierdzono doświadczalnie możliwość przyłączenia farnezyli lub geranylgeranyli do *AGG1*, a w przypadku *AGG2* – dodatkowo reszty kwasu palmitynowego [53]. Białka G γ mają trzy, zachowane w ewolucji, motywy z sekwencją D₆₅PLL w środkowym motywie, oddziałującą z G β (Ryc. 3) [51]. Po dwa geny G γ zidentyfikowano także u grochu i ryżu [17,54]. Białko G γ 1 (10,5 kDa) ryżu jest podobne do białek z rzodkiewnika, natomiast G γ 2 (16,9 kDa) ma zbudowane z 57 reszt aminokwasowych przedłużenie na N-końcu, a w odcinku C-końcowym nie posiada motywu prenylacji [54].

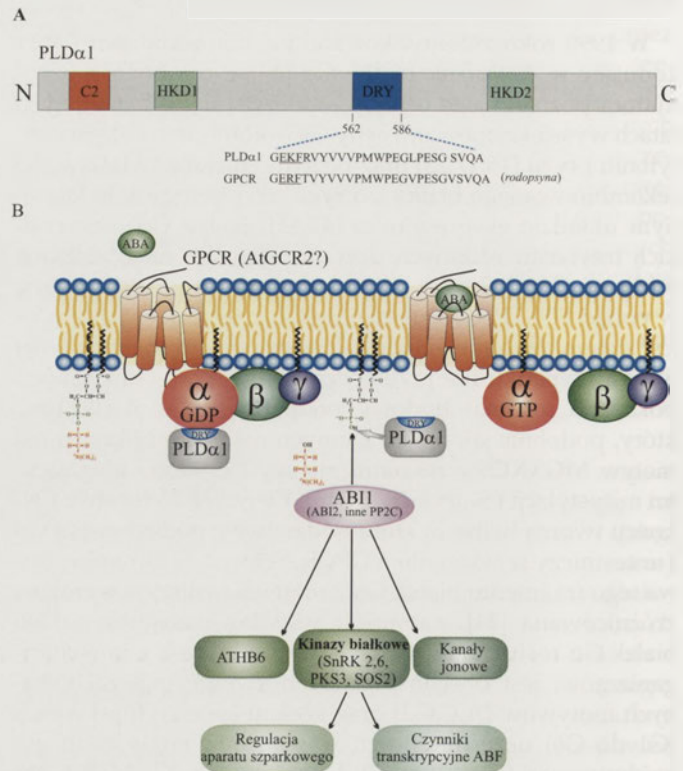
Poziom identyczności sekwencji aminokwasowej białek G roślin i ssaków jest stosunkowo niski, bowiem w przypadku Ga sięga zaledwie około 30%, 42% w przypadku G β , a w odniesieniu do G γ mieści się w przedziale od 25 do 35%. Nieco wyższy poziom podobieństwa tych białek umożliwia, dzięki odpowiednim programom komputerowym, uzyskanie przybliżonego obrazu struktury przestrzennej wszystkich trzech białek G *A. thaliana*, który, jak się okazuje, w ogólnym zarysie jest podobny do obrazu struktury białek G ssaków [16].

BIAŁKA EFEKTOROWE ROŚLIN

Już przed kilkunastoma laty wyniki niektórych doświadczeń wskazywały na fosfolipazę D jako potencjalny enzym efektorowy, którego aktywność jest regulowana przez białko G [20,23], jednakże możliwość bezpośredniego oddziaływania Ga z PLD α 1 – jedną z 12 fosfolipaz D *A. thaliana* – potwierdzono dopiero przed paru laty [55,56]. PLD α 1 zawiera motyw DRY, występujący także w wielu receptorach GPCR, z resztą lizyny zaangażowaną w oddziaływanie z Ga (Ryc. 4). Efektem oddziaływania między dwoma białkami jest stymulacja aktywności GTPazowej w Ga oraz wyraźne hamowanie aktywności fosfolipazy D, znoszone w warunkach, gdy GDP zostanie wymieniony na GTP [56]. Fosfolipaza Da1 jest jednym z elementów szlaków sygnałowych kwasu abscysynowego i w tym kontekście jej rola zostanie omówiona w dalszej części pracy.

Istnieją nieliczne doniesienia, które sugerują, że Ga oddziałuje także z fosfolipazami A₂ i C. W doświadczeniach prowadzonych na *Eschscholzia californica* wykazano, że Ga wiąże PLA₂, a jej aktywność hydrolityczna jest stymulowana przez GTP γ S – nie ulegający hydrolizie analog GTP [57]. Fosfolipaza C (PLC δ) grochu oddziałuje z Ga poprzez domenę wiążącą wapń (fn1), a efektem takiego oddziaływania jest wzrost aktywności GTPazowej [17].

Techniką drożdżowego systemu dwuhybrydowego wyselekcjonowano i zidentyfikowano AtPirin1 – kolejne białko efektorowe oddziałujące z Ga [58]. W *A. thaliana* jest to białko (31 kDa) zbudowane z 287 reszt aminokwasowych,



Rycina 4. Schemat szlaku sygnałowego aktywowanego przez receptor kwasu abscysynowego (ABA) sprzężony z białkami G. A – schemat budowy polipeptydu fosfolipazy D (PLD α 1); B – ABA wiązany przez receptor (AtGCR2?) wymusza wymianę GDP na GTP wiązanego z G α , aktywując w ten sposób PLD α 1. Powstający kwas fosfatydowy zakotwicza w błonie fosfatazę białkową ABI1, pełniącą w szlaku sygnałowym funkcję elementu negatywnego. ABI1 oraz inne fosfatazy białkowe z rodziny PP2C regulują aktywność kinaz białkowych z rodziny SnRK, a także oddziałują z innymi białkami o zróżnicowanych funkcjach. Opracowano na podstawie [55,56,70,72,73]; szczegóły w tekście.

zawierające dwa motywy kupinowe (łac. *cupa* – mała beczułka), tworzące struktury wiążące jony metali [59]. AtPirin1 oraz dwa jego homologi z *A. thaliana* podobne są do piryny – białka, które u ssaków oddziałuje z czynnikiem transkrypcyjnym NFI/CTF1 (ang. *nuclear factor1/CCAAT box transcription factor1*), wiązany przez motyw CCAAT i aktywującym polimerazę RNA II [59]. Białko AtPirin1 oddziałuje z Ga i to niezależnie od związanego z nim nukleotydu di- czy trifosforanowego [58]. Zmiany fenotypowe towarzyszące mutacjom *Atpirin1* są podobne do zmian obserwowanych u mutantu pozbawionego Ga, co świadczy o tym, że w szlaku sygnałowym białko to znajduje się poniżej Ga. AtPirin1 funkcjonuje w regulacji kiełkowania nasion i rozwoju siewki [58], a także, jak wynika z nowszych badań, w szlaku sygnałowym aktywowanym przez światło niebieskie [30].

W jednym ze szlaków sygnałowych aktywowanych przez światło niebieskie uczestniczy inny enzym efektorowy – dehydrataza preferenianowa (PD1), katalizująca przemianę preferenianu do fenylopirogrotonianu, prekursora fenyloalaniny i tyrozyny [29]. Regulacja przemian szlaku kwasu szikimowego jest szczególnie ważna, gdyż dostarcza on prekursorów lignin, które u niektórych roślin mogą stanowić do 35% suchej masy, a ponadto umożliwia biosyntezę wielu związków o kluczowych dla rośliny funkcjach regulacyjnych i ochronnych. Białko Ga oddziałuje z dehydra-

tażą preferenianową, stymulując jej aktywność w obecności GTPγS. Proponuje się, że elementami szlaku sygnałowego, aktywującego przez światło niebieskie syntezę fenyloalani-ny i tyrozyny, są GCR1, Ga i PD1, bowiem mutacje eliminujące któryś z tych elementów całkowicie blokują aktywujący wpływ światła [29].

W doświadczeniach prowadzonych na mutantach *A. thaliana* pozbawionych funkcjonalnego *Ga* zwrócono uwagę na wzrost wrażliwości zmutowanych osobników na D-glukozę, która w wyższych stężeniach hamuje kiełkowanie nasion i wzrost zielonych siewek [11,60]. Poszukując białka efektorowego funkcjonującego w tym szlaku, techniką drożdżowego systemu dwuhybrydowego wyselekcjonowano gen *THF1* (ang. *thylakoid formation1*), kodujący białko oddziałujące z *Ga* [61]. *THF1* jest białkiem zbudowanym z 300 reszt aminokwasowych, które mają jeden lub dwa odcinki transbłonowe. Występuje w błonie chloro- i amyloplastów oraz w stromulach – tubularnych strukturach łączących błony plastydów z błoną komórkową. Wykazano, że wzrost korzenia u mutantu *thf1-1* pozbawionego *THF1*, podobnie jak u mutantu *ga*, jest wyraźnie silniej hamowany przez 6% roztwór D-glukozy, a fenotyp podwójnego mutantu *ga/thf1-1* jest identyczny z *thf1-1* [61]. Na razie nie wiadomo jaką funkcję pełni *THF1*, ale biorąc pod uwagę jego lokalizację oraz lokalizację białka *RGS1* można zakładać, że *THF1* jest jednym z elementów szlaku aktywowanego przez zewnątrzkomórkowe stężenie glukozy [12].

Nieliczne doświadczenia wskazują, że *Ga* może aktywować kanały wapniowe w błonie plazmatycznej pomidora [62], a także może regulować kanały potasowe komórek mezofilowych tytoniu [63] i komórek szparkowych [64]. Należy jednakże podkreślić, że w żadnym z tych doświadczeń nie sprawdzano czy dochodzi do bezpośredniego oddziaływania białka *G* z badanymi kanałami.

Warto podkreślić, że genomy rzodkiewnika i ryżu nie zawierają sekwencji homologicznych z poznanymi wcześniej w innych organizmach błonowymi i cytoplazmatycznymi cyklazami adenylanowymi i guanylanowymi. Jednakże brak u roślin klasycznych cyklaz nie wyklucza możliwości, iż struktura pierwszorzędowa enzymów roślinnych odbiega od struktury enzymów pochodzących z innych organizmów. Sugestię taką wydaje się potwierdzać pojedyncze doniesienie o wyizolowaniu z pyłku kukurydzy i *Agapanthus umbellatus* mRNA zawierającego krótkie motywy homologiczne z cytoplazmatyczną cyklazą adenylanową *Neurospora crassa*. Ponadto wykazano, że rekombinowane białko *PSiP* (ang. *pollen-signalling protein*), uzyskane w bakteryjnym układzie ekspresyjnym rzeczywiście syntetyzuje cAMP [65].

SZLAKI SYGNAŁOWE AKTYWOWANE PRZEZ RECEPTORY SPRZĘŻONE Z BIAŁKAMI G

BŁONOWE I WEWĄTRZKOMÓRKOWE RECEPTORY KWASU ABCYSYNOWEGO

W prowadzonych od wielu lat poszukiwaniach receptorów ABA wykorzystywano głównie komórki szparkowe, najczęściej z liści bobu i komeliny oraz komórki aleuronowe ziaren zbóż. Uzyskiwane wyniki sugerowały, że receptory

ABA powinny być zlokalizowane zarówno w błonie komórkowej, jak również wewnątrz komórki, jednakże izolowane białka wiążące fitohormon na ogół nie spełniały kryteriów stawianych białkom receptorowym [66]. Wyraźny przełom nastąpił dopiero w ostatnich dwóch latach, po tym jak w *A. thaliana* zidentyfikowano najpierw dwa wewnątrzkomórkowe receptory ABA [67,68], a następnie receptor typu GPCR kodowany przez gen *GCR2* [13].

Białko *GCR2*, zbudowane z 401 reszt aminokwasowych, zlokalizowane jest w błonie komórkowej i wiąże *Ga*. Fizyczne oddziaływanie między dwoma białkami potwierdzono czterema różnymi technikami, a ponadto wykazano, że w wiązaniu *Ga* uczestniczy odcinek C-końcowy, powyżej 290 reszty aminokwasowej, *GCR2*. Rekombinowane białko uzyskane w *E. coli* wiąże tylko aktywne stereoizomery ABA, a zmiany towarzyszące wiązaniu liganda osłabiają oddziaływanie *GCR2* z *Ga*. Trzy alleliczne mutanty *gcr2*, zawierające skrócony transkrypt, wykazują wyraźne zaburzenia w indukowanym przez ABA zamykaniu aparatów szparkowych i hamowaniu otwierania szparek, a także są wyraźnie mniej wrażliwe na ABA w reakcji hamowania kiełkowania nasion i wzrostu siewek. Ponadto, u mutantów *gcr2* stwierdzono brak hamującego wpływu ABA na kanały K^+ odpowiedzialne za otwieranie szparek oraz obserwowano wyraźne obniżenie ekspresji kilku genów indukowanych przez ABA. Zmiany fenotypowe obserwowane u roślin z nadekspresją *GCR2* są także zgodne z oczekiwaniami i świadczą o zwiększonej wrażliwości na ABA [13,69]. We wszystkich doświadczeniach wykorzystujących mutanty *gcr2* obserwowano wyraźne hamowanie odpowiedzi na ABA, ale nie ich całkowity zanik, co może dowodzić komplementacji zmutowanego *GCR2* przez dwa jego homologi *GCL* (ang. *GCR-like*) obecne w genomie *A. thaliana* [13,31,69].

Wyniki powyższych badań budzą nadal duże zainteresowanie, mimo że w ostatnim czasie zostały niemalże w całości zakwestionowane, najpierw wynikami szczegółowych analiz sekwencji aminokwasowej *GCR2* [14], a później także wynikami doświadczeń [15]. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowej ujawniła wyraźne podobieństwo *GCR2* do syntetazy lantioninowej (*LanC*) prokariotów – enzymu uczestniczącego w biosyntezie cyklicznego peptydu antybakteryjnego. Ponadto, białko *LANCL1* ssaków o nieznannej roli, podobne do *GCR2*, jest białkiem tylko peryferycznie związanym z błoną. Jeszcze więcej wątpliwości wniosły wyniki najnowszych badań, w których badano trzy alleliczne mutanty *gcr2* oraz podwójnego mutantu *gcr2/gcl1* [15]. W obu przypadkach nie stwierdzono żadnych znaczących zmian w hamującym wpływie ABA na kiełkowanie nasion i rozwój siewek. Nie obserwowano także żadnych zmian w ekspresji aktywowanych przez ABA genów markerowych (*RD29A*, *KIN5*, *ABI5*, *RAD29B*, *RAB18*) [15].

Pomimo tych kontrowersji, z dużą dozą prawdopodobieństwa możemy przyjąć, opierając się głównie na wynikach wcześniejszych badań, że receptorem błonowym ABA jest rzeczywiście białko typu GPCR. Przemawiają za tym między innymi wyniki doświadczeń związanych z aktywacją przez ABA fosfolipazy *Da1* oddziałującej z białkiem *Ga* [56,70,71]. Jak już wcześniej wspomniano, *PLDa1* zawiera motyw *DRY*, niemal identyczny z sekwencją występującą

w trzeciej pętli cytoplazmatycznej u ponad 200 GPCR, w którym reszta lizyny pośredniczy w oddziaływaniu z Ga (Ryc. 4). PLDα1 oddziałuje tylko z Ga-GDP, a jego efektem jest wyraźne hamowanie aktywności fosfolipazowej. Wzrost aktywności PLDα1 w obecności Ga-GTP można zatem interpretować jako efekt rozluźnienia wiązania między dwoma białkami. W protoplastach z liści *A. thaliana* traktowanych ABA prawie dwukrotnie rośnie poziom kwasu fosfatydowego (PA) pochodzącego z hydrolizy fosfatydylocholine [70]. Powstający w błonie kwas fosfatydowy wiąże fosfatazę białkową ABI1, jeden z kluczowych elementów szlaków sygnałowych ABA. ABI1 należy do rodziny fosfataz białkowych PP2C, liczącej w *A. thaliana* 69 genów. W wiązaniu kwasu fosfatydowego przez ABI1 pośredniczy reszta argininy (R₇₃), a jego efektem jest całkowite zahamowanie aktywności fosfatazowej ABI1. Przypuszczalnie, nie bez znaczenia jest również fakt, że ABI1 zakotwiczona poprzez PA w błonie komórkowej nie migruje do jądra, gdzie przypuszczalnie defosforyluje białko/białka substratowe [70,71].

Wiele dotychczasowych badań dowodzi, że ABI1, a także kilka innych fosfataz z tej rodziny (ABI2, HAB1, HAB2, AHG3/PP2CA, AHG1), pełniących w szlakach sygnałowych ABA funkcje negatywnych elementów, oddziałuje z szeregiem białek o różnicowanej funkcji [69,70]. ABI1 wiąże czynnik transkrypcyjny ATHB6 zawierający homeodomenę, odgrywający także rolę elementu negatywnego w szlaku sygnałowym [69,70]. Fosfataza AtPP2CA oddziałuje z kanałami K⁺-AKT2 z rodziny shaker oraz AKT3 transportującym jony potasu do komórki [69,70]. Jednakże najwięcej uwagi poświęca się badaniom związanym z regulacją przez fosfatazy PP2C kinaz białkowych, zwłaszcza kinaz z rodziny SnRK, obejmującej w *A. thaliana* 38 genów. Niektóre z tych kinaz są pozytywnymi elementami szlaku regulującego zamykanie aparatów szparkowych. Taką rolę odgrywa oddziałująca z ABI1 kinaza SnRK2.6/OST1/SRK2E [72,73]. ABI2, a w mniejszym stopniu również ABI1, oddziałuje z kinazami PKS3 i SOS2 współdziałającymi z białkami sensorowymi SCaBP5 i SOS3 wiążącymi jony wapnia. Jeszcze inne kinazy fosforylują czynniki transkrypcyjne ABF [72,73].

W kontekście badań związanych z poszukiwaniem receptorów ABA, zastanawia fakt, iż odpowiedzi na fitohormon badane w przypadku GCR2 (hamowanie kiełkowania nasion i rozwoju siewek, otwieranie i hamowanie zamykania szparek) brane są także pod uwagę jako główne kryterium w doświadczeniach weryfikujących funkcję receptorową białek wewnątrzkomórkowych. Jednym z takich białek w *A. thaliana* okazała się największa podjednostka CHLH heterotrimerycznej chelatazy wprowadzającej jon magnezu do protoporfiryny IX [68]. Podjednostka CHLH (GUN5/CCH), zbudowana z 1322 reszt aminokwasowych, jest jednym z elementów retrogratywnego szlaku sygnałowego przekazującego informację z chloroplastów (plastydów) do jądra. Jak się obecnie przypuszcza, częścią sygnałową w tym szlaku jest Mg-protoporfiryna IX lub jej ester metylowy. W kontekście badań związanych z retrogratywnym przekazywaniem informacji, wyniki badań dowodzące, iż podjednostka H oprócz wiązania protoporfiryny IX wiąże także ABA,

okazują się już mniej zaskakujące. Funkcję receptorową podjednostki H chelatazy wydają się potwierdzać zmiany obserwowane u dwóch allelicznych mutantów *gun5* i *cch*. Mutant *cch* jest niewrażliwy na fitohormon w reakcjach hamowania kiełkowania nasion, wzrostu siewek, a także w indukowanych przez ABA ruchach aparatów szparkowych [68].

W trakcie badań prowadzonych na komórkach warstwy aleuronowej jęczmienia, zidentyfikowano rozpuszczalne białko ABAP1 wiążące ABA, homologiczne z białkiem FCA (ang. *flowering time control protein A*), poznanym wcześniej u późno kwitnącego mutantu *A. thaliana* [68,72,73]. Szczegółowe badania pokazały, że gen *FCA* w drodze alternatywnego składania może kodować cztery białka (α, β, γ i δ), z których największy, 747 aminokwasowy polipeptyd γ, w części N-końcowej zawiera dwa motywy RRM (ang. *RNA recognition motif*), a w odcinku C-końcowym – motyw WW, odpowiedzialny za oddziaływanie z innymi białkami. Białko FCAγ, poprzez odcinek C-końcowy, oddziałuje z białkiem FY funkcjonującym w „obróbce” końca 3'-RNA, a ponadto, przez ten sam fragment C-końcowy wiąże ABA [68]. Wydaje się więc, że FCAγ, wiążąc ABA, nie może tworzyć aktywnego heterodimeru z FA regulującego poziom transkrypty *FLC* kodującego białko represorowe hamujące kwitnienie [68,72,73].

BIAŁKO GCR1 JAKO ELEMENT SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH AKTYWOWANYCH PRZEZ ABA, CUKRY I ŚWIATŁO NIEBIESKIE

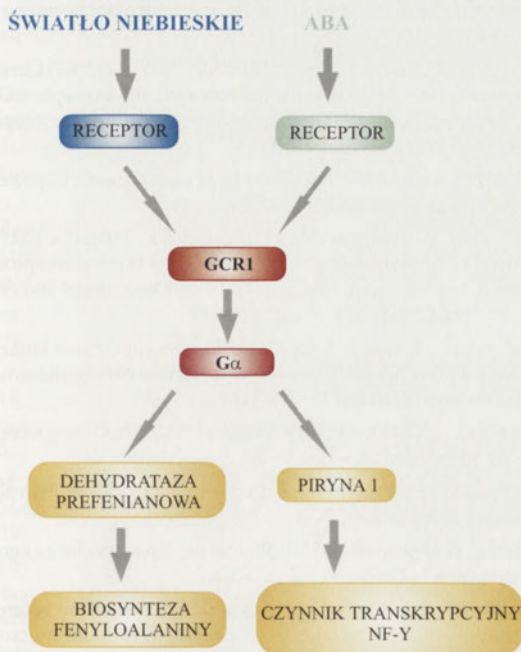
GCR1 jest jedynym genem *A. thaliana*, którego przynależność do nadrodziny GPCR nie budzi dzisiaj wątpliwości [8,24]. Po wykluczeniu funkcji receptorowej *GCR1* w sygnalizacji cytokininowej [27], jego rolę zaczęto wiązać z regulacją cyklu komórkowego, szczególnie po tym jak się okazało, że mutacja w genie *Ga* ogranicza podziały komórkowe [74]. Nadekspresja *GCR1*, a także *Ga*, w komórkach tytoniu przyspiesza wbudowywanie do DNA znakowanej tymidyny, a w przypadku *A. thaliana* powoduje skrócenie bądź wyeliminowanie stanu spoczynkowego nasion oraz przyspieszenie zakwitania [75,76]. Ponadto, w doświadczeniach prowadzonych na komórkach tytoniu BY2 dowiedziono, że *GCR1* i *Ga* aktywują fosfolipazę C podnosząc poziom 1,4,5-trifosfoinozytolu [76]. Możliwość oddziaływania *Ga* z fosfolipazą Cδ grochu (PI-PLC), swoistą względem fosfatydyloinozytolu, potwierdzono także w badaniach wykorzystujących technikę drożdżowego systemu dwuhybrydowego [17].

W świetle wyników najnowszych badań, rola *GCR1* okazała się jednak bardziej złożona i wciąż jeszcze bardzo niejasna. W doświadczeniach poświęconych badaniom wpływu glukozy i ABA na kiełkowanie nasion, wzrost korzenia i siewki, wykazano, że mutacja w *Ga* podnosi wrażliwość osobników pozbawionych *Ga* na hamujące działanie obu czynników [58,60]. Jeszcze wyraźniejsze objawy nadwrażliwości przejawiają osobniki z mutacją w *Gβ*, co wskazuje, iż obydwie podjednostki funkcjonują w tym samym szlaku [28]. Zmiany fenotypowe towarzyszące mutacji *gcr1*, podwójnej mutacji *gcr1ga* lub *gcr1gβ*, a także potrójnej mutacji *gcr1gagβ* pokazały, że w represji kiełkowania przez glukozę i ABA wszystkie trzy białka

funkcjonują w tym samym szlaku sygnałowym [8,28]. Inaczej jest w przypadku regulacji ruchów aparatu szparkowego. Mutacja w *Ga* prowadzi do zaniku wrażliwości na ABA w reakcji hamowania przez fitohormon otwierania aparatu szparkowego [64], a także do zaniku wrażliwości na sfingozyno-1-fosforan [77], natomiast mutacja w *GCR1* podnosi wrażliwość na ABA i sfingozyno-1-fosforan. W świetle tych wyników należy sądzić, iż w regulacji ruchów aparatu szparkowego w szlaku zależnym od *Ga* białko *GCR1* pełni funkcję elementu represyjnego [8,28].

Jeszcze inną rolę *GCR1* odkryto w badaniach poświęconych regulacji syntezy fenyloalaniny przez światło niebieskie [29]. Okazało się bowiem, że *Ga* oddziałuje z dehydratazą preferenową (PD1), cytoplazmatycznym enzymem funkcjonującym w szlaku biosyntezy fenyloalaniny [29]. Światło niebieskie stymuluje aktywność PD1 i podnosi poziom fenylopirogronianu – bezpośredniego prekursora fenyloalaniny. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych na mutantach *gcr1*, *ga* i *pd1* wydają się potwierdzać udział wszystkich trzech białek w szlaku sygnałowym odpowiedzialnym za regulację przez światło niebieskie biosyntezy fenyloalaniny (Ryc. 5).

Jak już wcześniej wspomniano, jednym z białek efektorowych oddziałujących z *Ga* jest białko *AtPirin1* z rodziny białek kupinowych wiążących żelazo, homologiczne z poznaną u człowieka piryną, oddziałującą z czynnikiem transkrypcyjnym wiązany przez sekwencje CCAAT [58]. Motyw CAAAT u roślin jest jednym z elementów *cis*, ważnym w odpowiedziach roślin na światło niebieskie o niskim natężeniu [58]. Wyniki najnowszych doświadczeń dowodzą, że *GCR1*, *Ga*, *AtPirin1* oraz heterotrimeryczny czynnik transkrypcyjny Y funkcjonują w szlaku sygnałowym regulującym ekspresję genu *Lhcb* aktywowanym przez światło niebieskie i ABA (Ryc. 5) [30].



Rycina 5. Hipotetyczny udział białka *GCR1* w szlakach sygnałowych aktywowanych przez światło niebieskie i kwas absycynowy. Opracowano na podstawie [8,28-30,58]; szczegóły w tekście.

BIAŁKO RGS1 – CZUJNIK ZEWNĄTRZKÓRKOWEGO STĘŻENIA GLUKOZY

Poznany w *A. thaliana* *AtRGS1* koduje białko zbudowane z 459 reszt aminokwasowych, zawierające siedem helis transbłonowych w odcinku N-końcowym oraz domenę RGS, charakterystyczną dla białek stymulujących aktywność GTPazową białka *Gα*, w części C-końcowej (Ryc. 2) [11]. Białka RGS zwierząt, oprócz domeny RGS, mają inne motywy mogące pośredniczyć w oddziaływaniach typu białko-białko, lecz żadne z nich nie zawiera domeny transbłonowej [1,12]. Gen *AtRGS1* wprowadzony do drożdży z mutacją *sst2*, komplementuje drożdżowe białko RGS, przywracając normalną wrażliwość drożdży na feromon [11]. W doświadczeniach wykorzystujących bakteryjny układ ekspresyjny potwierdzono możliwość wiązania odcinka C-końcowego *AtRGS1* przez rekombinowane białko *Gα*, szczególnie efektywne w obecności tetrafluorku glinu, stabilizującego strukturę aktywnej GTPazy [11]. Siewki *A. thaliana* z mutacją eliminującą *Gα* rosną w ciemności wolniej, gdyż uległy zahamowaniu podziały komórek. Wolniej niż rośliny dzikie rosną także osobniki z nadekspresją *RGS1*. Mutacja eliminująca *RGS1* przyspiesza wzrost wydłużeniowy hypokotyla, podobnie jak mutacja typu QL w *Gα*, z zahamowaną aktywnością GTPazową. Tak więc brak *AtRGS1* wydłuża czas działania *Gα*-GTP, a w efekcie w ciemności ulega przyspieszeniu wzrost wydłużeniowy, a na świetle rośnie częstotliwość podziałów komórek merystemu wierzchołkowego korzenia i pędu [11]. Reasumując, można więc stwierdzić, że *AtRGS1* inaktywuje *Gα*-GTP.

Wykazano także, że mutant *Atrgs1* jest mniej wrażliwy na wyższe stężenie glukozy, hamujące kiełkowanie nasion i rozwój siewek, a także wykazuje obniżoną wrażliwość na ABA, podczas gdy siewki z nadekspresją *RGS1* są nadwrażliwe na glukozę i ABA [78,79]. Ponadto u osobników z nadekspresją *RGS1* obserwowano wzmożoną ekspresję genów związanych z biosyntezą ABA oraz wzrost poziomu fitohormonu [79,80].

Wyniki najnowszych doświadczeń potwierdzają możliwość bezpośredniego oddziaływania *AtRGS1* z *Gα*-GTP, które ulega zaburzeniu po zastąpieniu w *RGS1* reszty glutaminianu (E_{320}) przez lizynę (Ryc. 2). Co ważniejsze, wykazano, że D-glukoza w stężeniu 6% stymuluje tworzenie aktywnego kompleksu *AtRGS1*-*Gα* [12]. Analizując subkomórkową lokalizację tworzących się kompleksów, można przypuszczać, że w szlaku sygnałowym poniżej *RGS1* i *Gα* funkcjonuje wspomniane wcześniej białko THF1 oddziałujące z *Gα*. THF1, zlokalizowane w błonie chloro- i amyloplastów, odgrywa pewną, jeszcze nieokreśloną rolę, między innymi w rozwoju tylakoidów [12,61]. Udział białka G w sygnalizacji cukrowcowej mogą także potwierdzać zmiany fenotypowe towarzyszące mutacji w genie *SGB1* *A. thaliana*, kodującym zlokalizowany w aparacie Golgiego transporter heksoz. Mutanta *sgb1-2* wyselekcjonowano jako mutanta supresorowego w stosunku do mutacji w *Gβ* w odpowiedziach roślin na wyższe stężenie glukozy [81].

UWAGI KOŃCOWE

Zmiany fenotypowe towarzyszące mutacjom w genach kodujących podjednostki białka G sugerują możliwość udziału GPCR i białek G także w szlakach innych fitohormonów, w szlakach aktywowanych przez fitochromy – receptory światła czerwonego, a także w szlakach regulujących odpowiedzi roślin na działanie biotycznych i abiotycznych czynników stresowych. Badany od kilku lat karłowaty mutant *d1* ryżu pozbawiony $G\alpha$ wykazuje mniejszą wrażliwość na niskie stężenia GA_3 , podczas gdy fitohormon w stężeniu powyżej $1 \mu M$ przywraca fenotyp roślin linii dzikiej [22,82]. Także nasiona *A. thaliana* z mutacją w $G\alpha$ są około 100-krotnie mniej wrażliwe na giberelinę (GA) [60,83], natomiast nasiona z mutacją QL charakteryzują się ekspresją genu α -amylazy nawet w warunkach braku gibereliny [82]. Odkrycie w ostatnich dwóch latach, najpierw w ryżu, a później w rzodkiewniku, wewnątrzkomórkowych receptorów gibereliny, skłania do krytycznej oceny wcześniejszych wyników. Zmiany fenotypowe obserwowane u mutantu *A. thaliana* pozbawionego wszystkich trzech genów *AtGID1a, b* i *c* mogą świadczyć o tym, że kodowane przez nie wewnątrzkomórkowe białka są jedynymi receptorami gibereliny [84]. Podobnie jest w przypadku auksyn. Po odkryciu wewnątrzkomórkowych receptorów IAA zaczyna się przypuszczać, że indukowane przez auksyny podziały komórkowe nie są bezpośrednio zależne od białka $G\alpha$, które miałyby jedynie modulować wrażliwość rośliny na fitohormon [85]. Receptorem brasinosteroidów (BR) jest błonowa serynowo-/treoninowa kinaza białkowa BRI/BAK [19], ale zmiany towarzyszące mutacjom w *GCR1*, a także w $G\alpha$ i $G\beta$ sugerują, że szlaki sygnałowe brasinosteroidów są w jakiś sposób powiązane ze szlakami zależnymi od białek G [60,83,86].

Przed kilkunastu laty dowodzono udziału białka G w fitochromowym szlaku sygnałowym aktywowanym przez światło czerwone. Wyniki nowszych badaniach, wykorzystujących rośliny z nadekspresją $G\alpha$ sugerują, że białko G odgrywa pewną rolę w jednym z odgałęzień szlaku, regulującym wzrost wydłużeniowy siewki [22]. Jednakże w innych doświadczeniach opartych na wykorzystaniu mutantów pozbawionych funkcjonalnych białek $G\alpha$ i $G\beta$ całkowicie wykluczono udział białek G w fitochromowym szlaku sygnałowym regulującym wzrost hypokotyła [87].

Od wielu lat próbuje się także szukać związków między białkami G, a odpowiedziami roślin na stres wywołany różnymi czynnikami biotycznymi i abiotycznymi. Wyniki niektórych badań zwracają uwagę na możliwość udziału białek G w reakcjach obronnych przeciw patogenom, w tym m. in. w regulacji biosyntezy fitoaleksyn i alkaloidów, czy też w produkcji aktywnych form tlenu [22,23,88]. Publikowane obecnie prace [89-92] skłaniają do przypuszczeń, że ten kierunek badań będzie w najbliższym latach rozwijał się najszybciej.

PIŚMIENNICTWO

- McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS (2005) G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* 62: 551-577
- Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm HE (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocrine Rev* 24: 765-781
- Davies MN, Gloriam DE, Secker A, Freitas AA, Mendao M, Timmis J, Flower DR (2007) Proteomic applications of automated GPCR classification. *Proteomics* 7: 2800-2814
- Strope PK, Moriyama EN (2007) Simple alignment-free methods for protein classification: a case study from G-protein-coupled receptors. *Genomics* 89:602-612
- Fredriksson R, Schiöth HB (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol* 67: 1414-1425
- Ono Y, Fujibuchi W, Suwa M (2005) Automatic gene collection system for genome-scale overview of G-protein coupled receptors in Eukaryotes. *Gene* 364: 63-73
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, Schiöth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63: 1256-1272
- Pandey S, Assmann SM (2004) The *Arabidopsis* putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein α subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell* 16: 1616-1632
- Hsieh M-H, Goodman HM (2005) A novel gene family in *Arabidopsis* encoding putative heptahelical transmembrane proteins homologous to human adiponectin receptors and prostaglandin receptors. *J Exp Bot* 56: 3137-3147
- Moriyama EN, Strope PK, Opiyo SO, Chen Z, Jones AM (2006) Mining the *Arabidopsis thaliana* genome for highly-divergent seven transmembrane receptors. *Genome Biol* 7: R96-R96.1-R96.9
- Chen J-G, Willard FS, Huang J, Liang J, Chasse SA, Jones AM, Siderovski DP (2003) A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. *Science* 301: 1728-1731
- Johnston CA, Taylor JP, Gao Y, Kimple AJ, Grigston JC, Chen J-G, Siderovski DP, Jones AM, Willard FS (2007) GTPase acceleration as the rate-limiting step in *Arabidopsis* G protein-coupled sugar signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 17317-17322
- Liu X, Yue Y, Li B, Nie Y, Li W, Wu W-H, Ma L (2007) A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* 315: 1712-1716
- Johnston CA, Temple BR, Chen J-G, Gao Y, Moriyama EN, Jones AM, Siderovski DP, Willard FC (2007) Comment on "A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid". *Science* 318: 914c
- Gao Y, Zeng Q, Guo J, Cheng J, Ellis BE, Chen J-G (2007) Genetic characterization reveals no role for the reported ABA receptor, GCR2, in ABA control of seed germination and early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant J* 52: 1001-1013
- Temple BRS, Jones AM (2007) The plant heterotrimeric G-protein complex. *Annu Rev Plant Biol* 58: 249-266
- Misra S, Wu Y, Venkataraman G, Sopory SK, Tuteja N (2007) Heterotrimeric G-protein complex and G-protein-coupled receptor from a legume (*Pisum sativum*): role in salinity and heat stress and cross-talk with phospholipase C. *Plant J* 51: 656-669
- Kowalczyk S, Hetmann A (2003) Roślinne receptorowe kinazy histydynowe i wielostopniowy przepływ fosforanu do regulatorów odpowiedzi. *Postepy Biochem* 49: 298-318
- Jakubowska A, Ostrowski M, Kowalczyk S (2007) Kinazy receptorowe roślin. *Postepy Biochem* 53: 133-142
- Assmann SM (2005) G proteins go green: A plant G protein signaling FAQ sheet. *Science* 310: 71-73
- Jones AM, Assmann SM (2004) Plants: the latest model system for G-protein research. *EMBO Rep* 5: 572-578
- Perfus-Barbeoch L, Jones AM, Assmann SM (2004) Plant heterotrimeric G protein function: insights from *Arabidopsis* and rice mutants. *Curr Opin Plant Biol* 7: 719-731
- Assmann SM (2002) Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. *Plant Cell Suppl*: S355-S373

24. Josefsson L-G, Rask L (1997) Cloning of a putative G-protein-coupled receptor from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 249: 415-420
25. Plakidou-Dymock S, Dymock D, Hooley R (1998) A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. *Curr Biol* 8: 315-324
26. Josefsson L-G (1999) Evidence for kinship between diverse G-protein coupled receptors. *Gene* 239: 333-340
27. Humphrey TV, Botella JR (2001) Re-evaluation of the cytokinin receptor role of the *Arabidopsis* gene GCR1. *J Plant Physiol* 158: 645-653
28. Pandey S, Chen J-G, Jones AM, Assmann SM (2006) G-protein complex mutants are hypersensitive to abscisic acid regulation of germination and postgermination development. *Plant Physiol* 141: 243-256
29. Warpeha KM, Lateef SS, Lapik Y, Anderson M, Lee B-S, Kaufman LS (2006) G-protein-coupled receptor 1, G-protein $G\alpha$ -subunit 1, and prephenate dehydratase 1 are required for blue light-induced production of phenylalanine in etiolated *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 140: 844-855
30. Warpeha KM, Upadhyay S, Yeh J, Adamiak J, Hawkins SI, Lapik YR, Anderson MB, Kaufman LS (2007) The GCR1, GPA1, PRN1, NF-Y signal chain mediates both blue light and abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143: 1590-1600
31. Grill E, Christmann A (2007) A plant receptor with a big family. *Science* 315: 1676-1677
32. Ross EM, Wilkie TM (2000) GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* 69: 795-827
33. Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M, Thomas P (2003) Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2231-2236
34. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423: 762-769
35. Devoto A, Piffanelli P, Nilsson I, Wallin E, Panstruga R, Von Heijne G, Schulze-Lefert P (1999) Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the MLO family in plants. *J Biol Chem* 274: 34993-35004
36. Kim MC, Panstruga R, Elliott C, Müller J, Devoto A, Yoon HW, Park HC, Cho MJ, Schulze-Lefert P (2002) Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defense against mildew in barley. *Nature* 416: 447-450
37. Devoto A, Hartmann HA, Piffanelli P, Elliott C, Simmons C, Taramino G, Goh C-S, Cohen FE, Emerson BC, Schulze-Lefert P, Panstruga R (2003) Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-transmembrane MLO family. *J Mol Evol* 56: 77-88
38. Chen Z, Hartmann HA, Wu M-J, Friedman EJ, Chen J-G, Pulley M, Schulze-Lefert P, Panstruga R, Jones AM (2006) Expression analysis of the *AtMLO* gene family encoding plant-specific seven-transmembrane domain proteins. *Plant Mol Biol* 60: 583-597
39. Brzostowski JA, Kimmel AR (2001) Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. *Trends Biochem Sci* 26: 291-297
40. Ma H, Yanofsky MF, Meyerowitz EM (1990) Molecular cloning and characterization of *GPA1*, a G protein α subunit gene from *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3821-3825
41. Ma H, Yanofsky MF, Huang H (1991) Isolation and sequence analysis of *THA1* cDNAs encoding a tomato G protein α subunit. *Gene* 107: 189-195
42. Seo HS, Choi CH, Lee SY, Cho MJ, Bahk JD (1997) Biochemical characteristics of a rice (*Oryza sativa* L., IR36) G-protein α -subunit expressed in *Escherichia coli*. *Biochem J* 324: 273-281
43. Iwasaki Y, Kato T, Kaidoh T, Ishikawa A, Asahi T (1997) Characterization of the putative α subunit of a heterotrimeric G protein in rice. *Plant Mol Biol* 34: 563-572
44. Ando S, Takumi S, Ueda Y, Ueda T, Mori N, Nakamura C (2000) *Nicotiana tabacum* cDNA encoding α and β subunits of a heterotrimeric GTP-binding protein isolated from hairy root tissues. *Genes Genet Syst* 75: 211-221
45. Adjobo-Hermans MJW, Goedhart J, Gadella TWJ (2006) Plant G protein heterotrimers require dual lipidation motifs of $G\alpha$ and $G\beta$ and do not dissociate upon activation. *J Cell Sci* 119: 5087-5097
46. Ding L, Pandey S, Assmann SM (2008) *Arabidopsis* extra-large G proteins (XLGs) regulate root morphogenesis. *Plant J* 53: 248-263
47. Kaydamov C, Tewes A, Adler K, Manteuffel R (2000) Molecular characterization of cDNAs encoding G protein α and β subunit and study of their temporal and spatial expression patterns in *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. *Biochim Biophys Acta* 1491: 143-160
48. Anderson DJ, Botella JR (2007) Expression analysis and subcellular localization of the *Arabidopsis thaliana* G-protein β -subunit AGB1. *Plant Cell Rep* 26: 1469-1480
49. Peskan T, Oelmüller R (2000) Heterotrimeric G-protein β -subunits is localized in the plasma membrane and nuclei of tobacco leaves. *Plant Mol Biol* 42: 915-922
50. Obrdlík P, Neuhaus G, Merkle T (2000) Plant heterotrimeric G protein β subunit is associated with membranes via protein interaction involving coiled-coil formation. *FEBS Lett* 476: 208-212
51. Mason MG, Botella JR (2000) Completing the heterotrimer: isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* G protein γ -subunit cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14784-14788
52. Mason MG, Botella JR (2001) Isolation of a novel G-protein γ -subunit from *Arabidopsis thaliana* and its interaction with $G\beta 1$. *Biochem Biophys Acta* 1520: 147-153
53. Zeng Q, Wang X, Running MP (2007) Dual lipid modification of *Arabidopsis* $G\gamma$ -subunits is required for efficient plasma membrane targeting. *Plant Physiol* 143: 1119-1131
54. Kato C, Mizutani T, Tamaki H, Kumagai H, Kamiya T, Hirobe A, Fujisawa Y, Kato H, Iwasaki Y (2004) Characterization of heterotrimeric G protein complexes in rice plasma membrane. *Plant J* 38: 320-331
55. Lein W, Saalbach G (2001) Cloning and direct G-protein regulation of phospholipase D from tobacco. *Biochim Biophys Acta* 1530: 172-183
56. Zhao J, Wang X (2004) *Arabidopsis* phospholipase Da1 interacts with the heterotrimeric G-protein α -subunit through a motif analogous to the DRY motif in G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 279: 1794-1800
57. Heinze M, Steighardt J, Gesell A, Schwartze W, Roos W (2007) Regulatory interaction of the $G\alpha$ protein with phospholipase A_2 in the plasma membrane of *Eschscholzia californica*. *Plant J* 52: 1041-1051
58. Lapik YR, Kaufman LS (2003) The *Arabidopsis* cupin domain protein AtPirin1 interacts with the G protein α -subunit GPA1 and regulates seed germination and early seedling development. *Plant Cell* 15: 1578-1590
59. Dunwell JM, Purvis A, Khuri S (2004) Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry* 65: 7-17
60. Ullah H, Chen J-G, Wang S, Jones AM (2002) Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol* 129: 897-907
61. Huang J, Taylor P, Chen J-G, Uhrig JF, Schnell DJ, Nakagawa T, Korth KL, Jones AM (2006) The plastid protein THYLAKOID FORMATION 1 and the plasma membrane G-protein GPA1 interact in a novel sugar-signaling mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1226-1238
62. Aharon GS, Gelli A, Snedden WA, Blumwald E (1998) Activation of a plant plasma membrane Ca^{2+} channel by TG $\alpha 1$, a heterotrimeric G protein α -subunit homologue. *FEBS Lett* 424: 17-21
63. Saalbach G, Natura G, Lein W, Buschmann P, Dahse I, Rohrbeck M, Nagy F (1999) The α -subunit of a heterotrimeric G-protein from tobacco, NiGPA1, functions in K^+ channel regulation in mesophyll cells. *J Exp Bot* 50: 53-61
64. Wang X-Q, Ullah H, Jones AM, Assmann SM (2001) G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* 292: 2070-2072

65. Moutinho A, Hussey PJ, Trewavas AJ, Malhó R (2001) cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10481-10486
66. Jakubowska A, Kowalczyk S (2000) Kwas abscysynowy – percepcja i transdukcja sygnału. *Post Biol Kom* 27: 633-656
67. Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* 439: 290-294
68. Shen Y-Y, Wang X-F, Wu F-Q, Du S-Y, Cao Z, Shang Y, Wang X-L, Peng C-C, Yu X-C, Zhu S-Y, Fan R-C, Xu Y-H, Zhang D-P (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443: 823-826
69. Liu X, Yue Y, Li W, Ma L (2007) Response to comment on "A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid". *Science* 318: 914d
70. Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X (2007) Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 9508-9513
71. Mishra G, Zhang W, Deng F, Zhao J, Wang X (2006) A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science* 312: 264-266
72. Hirayama T, Shinozaki K (2007) Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci* 12: 343-351
73. Wang X-F, Zhang D-P (2008) Abscisic acid receptors: multiple signal-perception sites. *Ann Bot* 101: 311-317
74. Ullah H, Chen J-G, Young JC, Im K-H, Sussman MR, Jones AM (2001) Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis*. *Science* 292: 2066-2069
75. Colucci G, Apone F, Alyeshmerni N, Chalmers D, Chrispeels MJ (2002) *GRC1*, the putative *Arabidopsis* G protein-coupled receptor gene is cell cycle-regulated, and its overexpression abolishes seed dormancy and shortens time to flowering. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4736-4741
76. Apone F, Alyeshmerni N, Wiens K, Chalmers D, Chrispeels MJ, Colucci G (2003) The G-protein-coupled receptor *GCR1* regulates DNA synthesis through activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Plant Physiol* 133: 571-579
77. Worrall D, Ng CK-Y, Hetherington AM (2003) Sphingolipids, new players in plant signaling. *Trends Plant Sci* 8: 317-320
78. Chen J-G, Jones AM (2004) *AtRGS1* function in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Enzymol* 389: 338-350
79. Chen Y, Ji F, Xie H, Liang J, Zhang J (2006) The regulator of G-protein signaling proteins involved in sugar and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol* 140: 302-310
80. Chen Y, Ji F, Xie H, Liang J (2006) Overexpression of the regulator of G-protein signalling protein enhances ABA-mediated inhibition of root elongation and drought tolerance in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 57: 2101-2110
81. Wang HX, Weerasinghe RR, Perdue TD, Cakmakci NG, Taylor JP, Marzluff WF, Jones AM (2006) A Golgi-localized hexose transporter is involved in heterotrimeric G protein-mediated early development in *Arabidopsis*. *Mol Biol Cell* 17: 4257-4269
82. Iwasaki Y, Fujisawa Y, Kato H (2003) Function of heterotrimeric G protein in gibberellin signaling. *J Plant Growth Regul* 22: 126-133
83. Chen J-G, Pandey S, Huang J, Alonso JM, Ecker JR, Assmann SM, Jones AM (2004) *GCR1* can act independently of heterotrimeric G-protein in response to brassinosteroids and gibberellins in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol* 135: 907-915
84. Iuchi S, Suzuki H, Kim Y-C, Iuchi A, Kuromori T, Ueguchi-Tanaka M, Asami T, Yamaguchi I, Matsuoka M, Kobayashi M, Nakajima M (2007) Multiple loss-of-function of *Arabidopsis* gibberellin receptor *AtGID1s* completely shuts down a gibberellin signal. *Plant J* 50: 958-966
85. Ullah H, Chen J-G, Temple B, Boyes DC, Alonso JM, Davis KR, Ecker JR, Jones AM (2003) The β -subunit of the *Arabidopsis* G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. *Plant Cell* 15: 393-409
86. Wang L, Xu Y-Y, Ma Q-B, Li D, Xu Z-H, Chong K (2006) Heterotrimeric G protein α subunit is involved in rice brassinosteroid response. *Cell Res* 16: 916-922
87. Jones AM, Ecker JR, Chen J-G (2003) A reevaluation of the role of the heterotrimeric G protein in coupling light responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131: 1623-1627
88. Viehweger K, Schwartze W, Schumann B, Lein W, Roos W (2006) The Ga protein controls a pH-dependent signal path to the induction of phytoalexin biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *Plant Cell* 18: 1510-1523
89. Llorente F, Alonso-Blanco C, Sánchez-Rodríguez C, Jorda L, Molina A (2005) *ERECTA* receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J* 43: 165-180
90. Trusov Y, Rookes JE, Chakravorty D, Armour D, Schenk PM, Botella JR (2006) Heterotrimeric G proteins facilitate *Arabidopsis* resistance to necrotrophic pathogens and are involved in jasmonate signaling. *Plant Physiol* 140: 210-220
91. Booker FL, Burkey KO, Overmyer K, Jones AM (2004) Differential responses of G-protein *Arabidopsis thaliana* mutants to ozone. *New Phytol* 162: 633-641
92. Joo JH, Wang S, Chen JG, Jones AM, Fedoroff NV (2005) Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein α and β subunits in the *Arabidopsis* oxidative stress response to ozone. *Plant Cell* 17: 957-970

G-protein-coupled receptors, heterotrimeric G-proteins and protein effectors in plants

Stanisław Kowalczyk[✉], Anna Hetmann

Department of Biochemistry, Institute of General and Molecular Biology, Nicolaus Copernicus University, 9 Gagarina St., 87-100 Torun, Poland

[✉]e-mail: kowalcz@uni.torun.pl

Key words: plant GPCRs, G-proteins, plant effectors

ABSTRACT

The superfamily of G-protein-coupled receptors (GPCRs) is one of the largest and most diverse family of proteins in mammals. Plants, in contrast to animals, have a greatly simplified repertoire of GPCRs. To date, only *AtGCR1* and *AtRGS1* have been shown to physically interact with a plant G-protein. Also, the number of G-protein complex components in plants is dramatically less than in other Eukaryotes. Only one prototypical Ga subunit, one $\text{G}\beta$ and two $\text{G}\gamma$ subunits have been identified in *A. thaliana* and rice. Similarly, there are few known downstream effectors that physically interact with either the plant Ga subunit or the $\text{G}\beta\gamma$ dimer. The best-characterized effector is phospholipase D (*PLD α 1*). Besides, the potential Ga effectors are: cupin-domain protein designated as *Atpirin1*, prephenate dehydratase – a cytosolic enzyme involved in regulation of the shikimate pathway, and *THF1* protein located in plastid membranes. Indirect evidences suggest that Ga may interact with ion channels and phospholipases A₂ and C, whereas $\text{G}\beta\gamma$ dimer supposedly interacts with a Golgi-localized hexose transporter.

Regulacja ekspresji genów w komórce bakteryjnej przy udziale białek z rodziny Fur

STRESZCZENIE

Niemal wszystkie bakterie potrzebują do wzrostu żelaza. Do tego celu wykorzystują one specyficzne mechanizmy pobierania ze środowiska oraz transportowania do wnętrza komórki ten cenny pierwiastek. Z drugiej strony, nadmiar żelaza jest toksyczny dla komórki, głównie ze względu na udział w wytwarzaniu wolnych rodników. Ponieważ do tej pory nie zidentyfikowano mechanizmów usuwania żelaza poza komórkę bakteryjną, uważa się, że regulacja komórkowego stężenia tego metalu odbywa się poprzez kontrolę transportu oraz odpowiedni poziom syntezy białek koordynujących i magazynujących żelazo. Większość genów zaangażowanych w utrzymanie homeostazy żelaza w komórce bakteryjnej wydaje się pozostawać pod kontrolą głównego czynnika regulacyjnego czyli represora Fur. W pracy tej przedstawiono strukturę białek z rodziny Fur oraz funkcję pełnioną przez te białka w utrzymaniu odpowiedniego poziomu żelaza oraz regulacji ekspresji genów w komórce bakteryjnej.

WPROWADZENIE

Żelazo jest czwartym pod względem częstości występowania pierwiastkiem chemicznym w przyrodzie. W warunkach naturalnych przeważa forma utleniona żelaza, głównie w postaci wodorotlenku żelaza (FeIII). Jest ona jednak bardzo słabo rozpuszczalna w roztworach o pH 7.0, przez co potencjalnie niedostępna dla organizmów żywych. Forma zredukowana żelaza (FeII) jest relatywnie dobrze rozpuszczalna w warunkach fizjologicznych, natomiast w środowisku tlenowym praktycznie nieobecna. W zależności od otoczenia chemicznego w jakim się znajdują, jony żelaza zdolne są do przyjmowania różnych stanów spinyowych zarówno w formie zredukowanej, jak i utlenionej. Również ich potencjał oksydoredukcyjny może ulegać zmianie w szerokim zakresie, przyjmując wartości od -300 do +700 mV. Powszechna dostępność żelaza oraz jego specyficzne własności sprawiły, że stało się ono elementem składowym szeregu białek już na bardzo wczesnych etapach formowania się życia, gdy na Ziemi panowały warunki beztlenowe [1]. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, bytujące w środowisku wysoce ubogim w żelazo, uniezależniły swój metabolizm od jego obecności, opierając istotne procesy komórkowe o jony manganu [2,3]. Z wyjątkiem jeszcze kilku wewnątrzkomórkowych patogenów, takich jak *Borrelia burgdorferi* oraz *Treponema pallidum*, u których stwierdzono niestychanie niską zawartość żelaza, pierwiastek ten jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania każdej żywej komórki, odgrywając istotną rolę w takich procesach, jak: fotosynteza, asymilacja N₂, metanogeneza, cykl kwasów trójkarboksylowych, przyswajanie i produkcja wodoru, transport elektronów w łańcuchu oddechowym oraz biosynteza DNA. Z tego względu bakterie wytworzyły wiele złożonych systemów pobierania żelaza ze środowiska zewnętrznego oraz jego transportu do wnętrza komórki [4].

Mimo iż żelazo stanowi grupę prostetyczną wielu białek komórkowych, to jego nadmiar jest dla komórki szkodliwy. Żelazo w warunkach tlenowych prowadzi do generowania reaktywnych form tlenu i azotu, niszczących błony biologiczne oraz powodujących uszkodzenia DNA, stąd jego stężenie w komórce musi znajdować się pod precyzyjnym nadzorem. Ponieważ do tej pory nie zidentyfikowano mechanizmów usuwania żelaza poza komórkę bakteryjną, uważa się, że regulacja komórkowego stężenia tego metalu odbywa się poprzez kontrolę transportu oraz odpowiedni poziom syntezy białek koordynujących i magazynujących żelazo. W odróżnieniu od komórek eukariotycznych, które kontrolują ten proces na etapie translacji poprzez wiązanie się białek regulatorowych do mRNA [5], bakterie wykształciły mechanizmy kontroli ekspresji genów na poziomie transkrypcji, oparte o dwa białka, Fur (ang. *ferric uptake regulator*) oraz DtxR (ang. *diphtheria toxin repressor*), występujące, odpowiednio, u bakterii gramujemnych i gramododatnich z wysoką zawartością GC w genomie oraz u bakterii gramododatnich o niskiej zawartości GC.

Marcin Szafran

Teresa Olczak

Zakład Biochemii, Wydział Biotechnologii,
Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

© Zakład Biochemii, Wydział Biotechnologii,
Uniwersytet Wrocławski, ul. Tamka 2, 50-137
Wrocław; tel.: (071) 375 26 12, faks: (071) 375 26
08, e-mail: Teresa.Olczak@biotech.uni.wroc.pl

Artykuł otrzymano 13 maj 2008 r.
Artykuł zaakceptowano 4 września 2008 r.

Słowa kluczowe: białko wiążące DNA, represor Fur, sRNA, żelazo

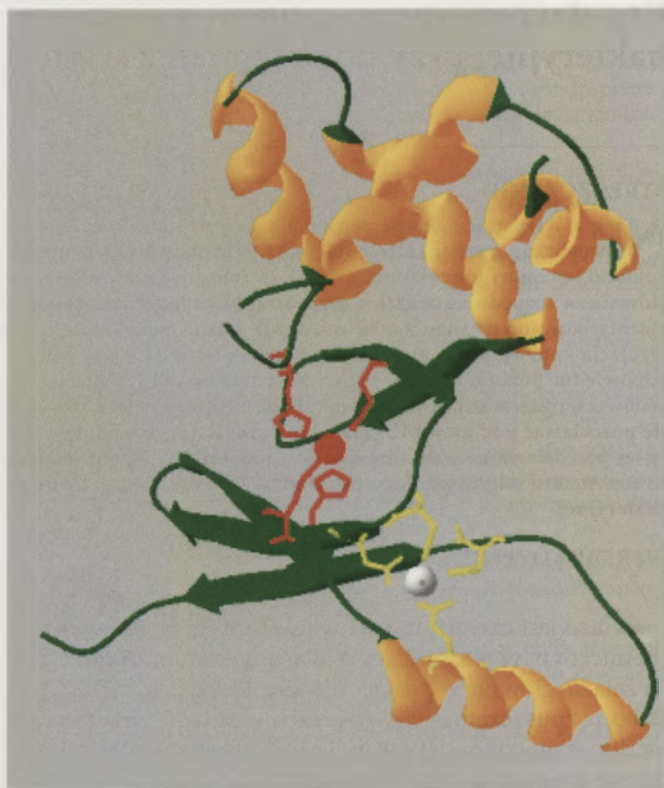
Po raz pierwszy białko Fur zostało opisane w roku 1981 u mutantów bakterii *Escherichia coli*, u których produkcja niektórych białek (szlaków produkcji sideroforów oraz biosyntezy specyficznych receptorów występujących w błonie zewnętrznej) była fundamentalna i niezależna od obecności metalu w pożywce w porównaniu z komórkami posiadającymi niezmutowany gen *fur* [6]. Mutanty te otrzymały nazwę *fur* (ang. *ferric uptake regulation*). Odkrycie to przyczyniło się do dalszych badań mających na celu zrozumienie regulacji transportu żelaza u bakterii. Nieco później gen *fur* został zmapowany, sklonowany i zsekwencjonowany, a jego produkt białkowy oczyszczony w celu poznania jego właściwości [7-9]. Od tego czasu represory homologiczne do Fur z *E. coli* odkryte zostały u wielu bakterii gramujemnych, m.in. u *Yersinia pestis* [10], *Salmonella typhimurium* [11], *Vibrio cholerae* [12], *Pseudomonas aeruginosa* [13], *Helicobacter pylori* [14], *Campylobacter jejuni* [15]. Białka podobne do Fur znalezione także u bakterii gramododatnich *Bacillus subtilis* [16] oraz *Staphylococcus epidermidis* [17].

Bakterie posiadają geny, których ekspresja jest zależna od poziomu żelaza lub innych metali w komórce bakteryjnej oraz geny, których ekspresja podlega regulacji przy udziale białka Fur lub innych białek z tej rodziny, m.in. Zur, Mur, Nur [18]. Białkami należącymi do rodziny białek Fur, które regulują ekspresję genów w zależności od warunków oksydacyjnych oraz dostępności hemu w komórce bakteryjnej, są PerR oraz Irr, które zidentyfikowano m.in. u bakterii z rodzaju *Bacillus*, *Campylobacter* oraz *Bradyrhizobium* [18]. W warunkach fizjologicznych białko PerR, oprócz obecnego również u innych przedstawicieli rodziny Fur cynku strukturalnego, posiada miejsce wiązania dla jonu manganu lub żelaza. Możliwość koordynacji jednego z dwóch jonów powoduje, że PerR występuje w komórce w jednej z dwóch form, odpowiednio, PerR:Zn,Mn oraz PerR:Zn,Fe, przy czym każda z tych form wykazuje inną wrażliwość na powstające w stresie tlenowym wolne rodniki. Obecnie uważa się, że pierwotnie białko Fur miało charakter dwufunkcyjny, stopniowo ewoluując z wytworzeniem dwóch odrębnych białek o wyższym stopniu specjalizacji, jak ma to miejsce, między innymi, w przypadku bakterii *C. jejuni*, gdzie białko Fur reguluje procesy transportu i magazynowania żelaza, a białko PerR – ekspresję genów biorących udział w odpowiedzi komórki na warunki oksydacyjne.

Stosując metodę mikromacierzy, wykazano, że w komórce *E. coli* znajduje się ponad 90 genów, których ekspresja regulowana jest przez białko Fur [19]. Podobny poziom regulacji stwierdzono m.in. u bakterii z rodzaju *Campylobacter* i *Yersinia* [20,21]. W przypadku mikroorganizmów chorobotwórczych, dla których zmiany poziomu żelaza w otoczeniu są sygnałem, że znalazły się one w organizmie gospodarza, białka z rodziny Fur i DtxR pełnią dodatkową funkcję, kontrolując ekspresję tzw. genów wirulencji, których produkty determinują przystosowanie się bakterii do nowych warunków bytowania wewnątrz organizmu gospodarza [20-23].

STRUKTURA BIAŁEK Z RODZINY FUR

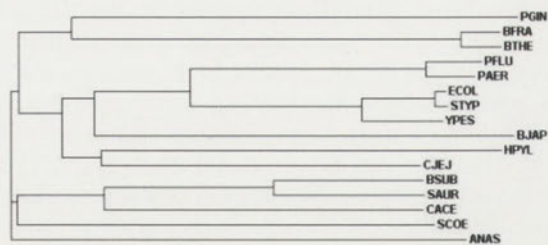
Najlepiej scharakteryzowanym i opisanym pod względem struktury jest obecnie białko z bakterii *P. aeruginosa*



Rycina 1. Struktura białka Fur z bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (kod PDB: 1MZB) [24] wykonana za pomocą programu SwissPDB-Viewer. Kolorem czerwonym zaznaczono reszty aminokwasowe biorące udział w koordynacji strukturalnego jonu cynku. Lokalizacja jonu na granicy domeny C- i N- końcowej sugeruje rolę tego jonu w oddziaływaniach pomiędzy domenami. Kolorem żółtym zaznaczono reszty tworzące miejsce regulatorowe w warunkach *in vivo* zajęte przez jon żelaza Fe^{2+} .

(FurPA; kod PDB: 1MZB) [24] oraz struktura domeny wiążącej DNA z *E. coli* (FurEC; kod PDB: 2FU4) [25]. Białko Fur z *P. aeruginosa* jest polipeptydem o masie 15,2 kDa, występującym w komórce jako homodimer i tylko w takiej formie zdolne jest do pełnienia swojej funkcji regulatora transkrypcji. Każda z podjednostek monomeru zbudowana jest z dwóch wyraźnych domen (Ryc. 1). Domena N-końcowa białka Fur z *P. aeruginosa* (reszty 1-83) odpowiedzialna jest za rozpoznawanie i wiązanie się do DNA. Zbudowana jest ona z 4 helis α C H1-H4), tworzących charakterystyczny motyw WH (ang. *winged helix*), po którym następuje sekwencja dwóch antyrównoległych włókien β (S1-S2). Domena C-końcowa (reszty 84-135) odgrywa rolę w formowaniu się funkcjonalnego dimeru Fur. Tworzona jest ona przez 3 antyrównoległe włókna β (S3-S5), które dodatkowo nakryte są pojedynczą helisą α (H5) (Ryc. 1). Formowanie dimeru Fur oparte jest na oddziaływaniu hydrofobowym i hydrofilowym wytworzonym pomiędzy włóknami S3, S4, S5 z odpowiadającymi im włóknami drugiego monomeru, tworząc tym samym regularną strukturę zbudowaną z 6 włókien β . Cała struktura dodatkowo stabilizowana jest przez reszty Asp103 oraz Arg109, zlokalizowane na ostatniej helisie (H5) i tworzące mostki solne odpowiednio z resztami Arg109' i Asp103' drugiego monomeru. Ich mutacja w przypadku bakterii *P. aeruginosa* powodowała obniżenie zdolności represora do wiązania się do DNA [26]. Reszty te nie są jednak silnie zachowane w obrębie rodziny białek Fur, sugerując przede wszystkim rolę oddziaływań hydrofobowych, jako

BSUB ---MENR---IDRIKQKLSHSSYLTPQREATVRVLENEEDHLSAEDVYLLVKE--KS 51
 SAUR ---MEER---LMRVKQQLQSSSYKLTPOREATVRVLIENEKDHLSAEDVYLVKVD--KA 51
 CACE ---MAKLSPLEIEKLNKMLKDKKYLTPORRAVLDIIIDNEGQRLTVEE LYDLVKL--EC 55
 PFLU -----MVEN--SELRKAGLKVILPRVKILQMLDSTEQRHMSAEDVYKALME--AG 46
 PAER -----MVEN--SELRKAGLKVILPRVKILQMLD SAEQRHMSAEDVYKALME--AG 46
 ECOL -----MTDNNNTALKKAGLKVILPRKILEVLQEPDMHVSVAEDLYKRLID--MG 47
 STYP -----MTDNNNTALKKAGLKVILPRKILEVLQEPDMHVSVAEDLYKRLID--MG 47
 YPES -----MTDNNKALKKAGLKVILPRKILEVLQNPACHVSAEDLYKILID--IG 47
 BJAP MTLAKPSSASKASGIEARCAATGRRHTEQRRV IARVLAEAVD--HPDVEE LYRRCVA--VD 57
 HPYL -MKRLETLESILERLRMSIKKLNKSKQREEVVSVLYRSGT--HLSPEE ITHSIRQ--KD 56
 CJEJ MLIENVEYDVLLERFKKILRQGGGLKYTKQREVLLKTLYHSDT--HYTPESLYMEIKQAEPD 59
 BFRA -METQNVKDVTRVQIFTEYLMANGHRKTPERYALDITIYSIDG--HFDIDMLYSQMMN--QEN 57
 BTHE MME TQNVKDVTRVQIFTEYLTANGHRKTPERYALLETIYSIDG--HFDIDMLYSRMMN--QEN 58
 SCOE -----MVSTDWKSLRQRQYRLTPQRQLVLEAVD--TLEHATPDDILGEVRK--TA 47
 ANAS -----MRAIR--TRSQERLNLNLQTIQK--GISAQD IYVELRN--RN 36
 PGIN --MIVTSLLEDLRSRLRAYVSENLRHTEPEYSILEVAYNLK--IFTPDDLFDLTRE--NG 55



(B)

BSUB PEIGLATVYRITLELLTELKVVDKINFGDGVSRDLRKEGAHFHHHLVCMFQAVDDEIEG 111
 SAUR PEIGLATVYRITLELLAELKVVDKINFGDGVSRDLRKEGAKHFHHHLVCMCGRVDDEIDE 111
 CACE PEIGLATVYRITVQLDELGVLSKLDLNDGLSRVELVHENEPHOHHLIQTACGKVTVEVQG 115
 PFLU EDVGLATVYRIVLTQFEAAGLVVRHNFDDGGHAVFELADG---GHDDHVMVNESGEVIEFFD 103
 PAER EDVGLATVYRIVLTQFEAAGLVVRHNFDDGGHAVFELADG---GHDDHVMVQVDTSEVIEFMD 103
 ECOL EEIGLATVYRIVLNQFDDAGIVTRHNFEGGKSVFELTQQ---HHHDHLICLDGCKVIEFSD 104
 STYP EEIGLATVYRIVLNQFDDAGIVTRHNFEGGKSVFELTQQ---HHHDHLICLDGCKVIEFSD 104
 YPES EEIGLATVYRIVLNQFDDAGIVTRHNFEGGKSVFELTQQ---HHHDHLICLDGCKVIEFSN 104
 BJAP DKISISTVYRITVKLFEDAGIERHDFREGRARVETMRD---SHHDHLINLRDCKVIEFTS 114
 HPYL KNTSISVYRILNLFLEKENFICVLETSKSGRRVEIAAK---EHHDHIIICLHCCKVIEFAD 113
 CJEJ LNVGLATVYRITLLEEAENVTISISFGSAGKVELANK---PHDDHMIKCKGKVIIEFEM 116
 BFRA FRVSRATLYNTIILLINARLVIKHQFGTS--SQYEKSYN--RETHHHQICQCGKVTVEFQN 114
 BTHE FRVSRATLYNTIILLINARLVIKHQFGTS--SQYEKSYN--RETHHHQICQCGKVTVEFQN 115
 SCOE SGINISTVYRITLELLEELGLVSHAHLGHGAPTFLADR---HHHHLVLRDITNVLEADL 104
 ANAS QSHGLATVYRISLEALKLEGLVQVRTLPNGEALVSLAQQ---DKHHLTLCQCGVSIPIHQ 92
 PGIN LPVSLSTVYRITLLEERCGLVLRLLPSPETKYQLMASFA--EQCPILLFCTEAQFSTYYR 113

BSUB DLLL-DVEEIERDVKFKIKDRLITFHGICH--RNGKETE----- 149
 SAUR DLLP-EVENRVENEFNKILDRITLTFHGVCE--TQAKGKG----- 149
 CACE DLLD-ELEDCEIENKYHFLIKNHSVKFYGIS--EGRKKL----- 151
 PFLU EEIE-KLQKAIVEKHGVELVDHNLVLY-----VRKKK----- 134
 PAER AEIE-KRQEIIVRERGVELVDHNLVLY-----VRKKK----- 134
 ECOL DSIE-ARQREIAAKHGIRLTNHSLYLYGHCAEGDREDEHAHEGK----- 148
 STYP DSIE-ARQREIAAKHGIRLTNHSLYLYGHCAEGDREDEHAHDDATK----- 150
 YPES ESIE-SLQREIARQHGKIKLTNHSLYLYGHGETGNCREDESASHSKR----- 148
 BJAP EEIE-KLQAEIARKLGVKLVDRLELYCVP---LDDDKPTS----- 151
 HPYL PEIE-NRQNEVVKKYQAKLISHDMKHFVWCK--EQESEC----- 150
 CJEJ PIIE-ROQALIAKEHGKLTGELMQLYGVG--DENNQKAKVKI----- 157
 BFRA EALQ-NAIENTKLS-KPQLSHYSLYIYGIQSKCDRANKRKRKRVNNMKKEK--- 162
 BTHE EELQ-HAIENTKLS-RPQLSHYSLYIYGLQSKCDRANKRKRKRVNNMKKEK--- 163
 SCOE SVAA-DFTAKLRQFGFDDTMKHFALFGRVESCSLKSGSTIDS----- 145
 ANAS CPVH-NLEEQLQTAHKFKIYFTLEFVGLGKQMMHASEI----- 132
 PGIN RNVKSLIADKDLRPPRSYRQATIIICLYGIDKCRKKSALKKAAADKAAPKPKK 166

(A)

Rycina 2. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych (A) oraz drzewo filogenetyczne (B) białek z rodziny Fur pochodzących z wybranych gatunków bakterii, wykonane za pomocą programu ClustalW. Kolorem czerwonym zaznaczono najbardziej zachowane w ewolucji aminokwasy i/lub aminokwasy kluczowe dla funkcjonowania represora, kolorem żółtym zaznaczono aminokwasy zachowane w ewolucji w stopniu umiarkowanym. *Bacillus subtilis* (P54574), *Staphylococcus aureus* JH9 (A5IT26), *Clostridium acetobutylicum* (A97IF9), *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (Q4KIH4), *Pseudomonas aeruginosa* (Q03456), *Escherichia coli* K12 (P0A9A9), *Salmonella typhimurium* (Q7CQY3), *Yersinia pestis* (P33086), *Bradyrhizobium japonicum* (O85206), *Helicobacter pylori* (O25671), *Campylobacter jejuni* 81116 (P48796), *Bacteroides fragilis* (Q64QR6), *Bacteroides thetaiotaomicron* (Q8A6N3), *Streptomyces coelicolor* (Q9K4F8), *Anabaena* sp. PCC 7120 (Q8YU81), *Porphyromonas gingivalis* (Q9KJC2).

głównego czynnika stabilizującego dimer, w tym wysoce zachowanej reszty Phe119. W rodzinie *Enterobacteriaceae* reszta Phe zastąpiona jest również hydrofobową resztą Ile (Ryc. 2). Dimeryzacja sprzyja stabilizacji regionu C-końcowego, jednocześnie w przypadku bakterii *E. coli* powoduje ona zmiany konformacyjne w rejonie oddziaływania z DNA. W porównaniu z białkiem FurPA, FurEC posiada analogiczne 4 helisy α jedne w formie monomerycznej, a tworzenie funkcjonalnego dimeru powoduje interkalację początkowej helisy odpowiadającej helisie H1 u *P. aeruginosa*, przy czym motyw WH pozostaje nadal zachowany [25].

Pojedynczy monomer Fur posiada w swojej strukturze dwa miejsca koordynacji jonów dwuwartościowych. Jedno z miejsc obsadzone jest przez bardzo silnie wiązany jon Zn^{2+} , nazywany cynkiem strukturalnym. Struktura miejsca koordynującego jon cynku nie jest zachowana w obrębie rodziny białek Fur i może różnić się znacznie pomiędzy poszczególnymi gatunkami bakterii. FurPA wiąże jon cynku przy udziale reszt zlokalizowanych w obu domenach (His32, Glu80, His89, Glu100) [26]. Pomimo obecności reszt, które wiążą cynk strukturalny u *P. aeruginosa*, występujących także u innych gatunków bakterii (m.in. *E. coli*), model wiązania Zn^{2+} jest u tych bakterii inny i opiera się o koordynację jonu, między innymi, przez reszty Cys92 i Cys95. W przypadku *E. coli* włączenie jonu cynku w strukturę biał-

ka, połączone z redukcją mostka disiarczowego pomiędzy obiema cysteinami, jest konieczne do dimeryzacji podjednostek *in vitro* [25]. Pohl i wsp. [24] zasugerowali rolę jonu cynku w procesie przenoszenia sygnału z domeny C-końcowej do domeny wiążącej DNA podczas aktywacji represora. Niektóre białka z rodziny Fur są jednak pozbawione cynku strukturalnego, jak ma to miejsce w przypadku białka Fur z *Bradyrhizobium japonicum* [27], stąd rola tego jonu nie jest nadal do końca wyjaśniona. Dużo lepiej poznana jest natomiast rola drugiego miejsca wiążącego metal, którym w warunkach fizjologicznych są jony Fe^{2+} . Wiązanie żelaza przez białko Fur powoduje jego aktywację oraz indukuje zmiany w konformacji, umożliwiające wiązanie się białka Fur do DNA. Uważa się, że związanie metalu zmienia wzajemną orientację podjednostek, stabilizując represor w stanie o wysokim powinowactwie do kwasu nukleinowego. Wykazano, że *in vitro* białko Fur może być aktywowane również przez inne metale dwuwartościowe, w tym jony Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} oraz Ni^{2+} , jak również w pewnym stopniu przez jony żelaza Fe^{3+} [28,29]. Ich poziom w komórce jest jednak zbyt niski, aby mogły one zastępować jony żelaza Fe^{2+} w jego funkcji. W niektórych przypadkach wiązanie metalu nie jest niezbędne do aktywacji represora, co wykazały badania nad białkiem Fur z *Helicobacter pylori* [30]. W oparciu o strukturę białka Fur uzyskaną dla *P. aeruginosa* zidentyfikowano miejsce koordynacji jonu aktywującego, które

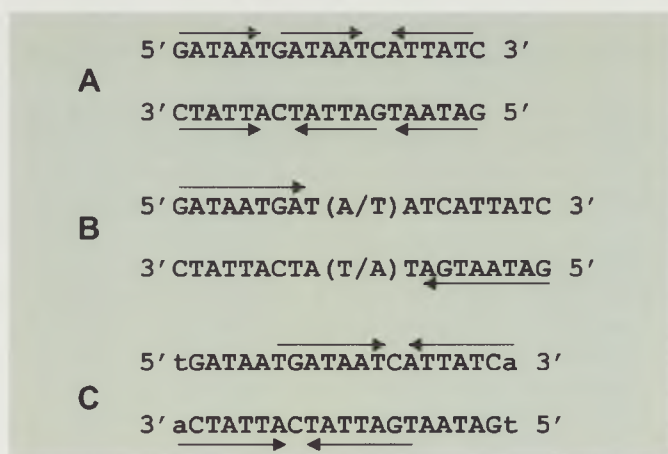
tworzone jest przez 4 reszty aminokwasowe (His86, Asp88, Glu107, His124) oraz strukturalną cząsteczkę H₂O. Obecność tych reszt u większości gatunków (Ryc. 2), w tym także u bakterii *E. coli*, sugeruje podobny mechanizm wiązania. Jednak nie wszystkie gatunki zachowały w ewolucji reszty odpowiedzialne za koordynację *in vivo* jonu żelaza. Bakterie z gatunku *Porphyromonas gingivalis* oraz *Bacteroides* utraciły wszystkie 4 wyżej wspomniane reszty (Ryc. 2), sugerując tym samym występowanie jeszcze jednego, dodatkowego mechanizmu wiązania jonu i aktywacji represora, bądź też jego działanie niezależnie od obecności jonów żelaza, na zasadzie podobnej do działania Fur u bakterii *H. pylori*.

REGULACJA POZIOMU ŻELAZA PRZY UDZIALE BIAŁEK FUR

Najlepiej wyjaśnionym mechanizmem funkcjonowania Fur jest regulacja na poziomie transkrypcyjnym. W warunkach dużej dostępności żelaza represor Fur wiąże jon Fe²⁺ i podlega zmianom konformacyjnym, które umożliwiają oddziaływanie z DNA. Oddziaływanie białka Fur z DNA zachodzi przy udziale reszt aminokwasowych zlokalizowanych na helisie H4 w przypadku *P. aeruginosa* lub odpowiadającej jej helisie H3 u *E. coli*. Kluczowa dla tego procesu jest obecność reszty tyrozyny w pozycji 55 w przypadku FurPA. Jest to najsilniej zachowana ewolucyjnie reszta obecna we wszystkich analizowanych gatunkach, wchodząca w skład zachowanej w ewolucji sekwencji Thr-Val-Tyr-Arg (Ryc. 2). Reszta Tyr55 kontaktuje się bezpośrednio z dwiema następującymi po sobie resztami tyminy w sekwencji nukleotydowej GATTAT, będącej elementem składowym sekwencji konsensusowej dla miejsca wiążącego dla Fur (ang. *Fur box*), sugerując ich zasadniczą rolę w procesie rozpoznawania i wiązania się represora do DNA [31]. Wiązanie Fur-Fe²⁺ do specyficznej sekwencji nukleotydowej w rejonie promotorowym nie pozwala na przyłączenie się polimerazy RNA, co hamuje transkrypcję genów znajdujących się pod kontrolą danego promotora. Region rozpoznawany przez represor Fur w większości przypadków zlokalizowany jest w rejo-

nie pomiędzy kluczowymi dla formowania się kompleksu transkrypcyjnego regionami -10 oraz -35. W ten sposób represor Fur hamuje ekspresję genów kodujących białka bezpośrednio związane z transportem żelaza lub hemu, jak receptory występujące w błonie zewnętrznej czy enzymy syntezy sideroforów, gdy poziom tego pierwiastka w komórce jest już wystarczający. Wiele prac potwierdziło także wiązanie białka Fur do własnego promotora, powodujące autoregulację genu *fur* [32]. W przypadku bakterii *C. jejuni* gen *fur* znajduje się pod kontrolą 2 promotorów [33]. Większość prokariotycznych białek oddziałujących z DNA poprzez motyw HTH (ang. *helix-turn-helix*) rozpoznaje nukleotydowe sekwencje palindromowe o długości około 12 par zasad (Ryc. 3). Badania nad takimi sekwencjami nukleotydowymi u bakterii *E. coli* doprowadziły do ustalenia rejonu wiązania represora Fur stanowiącego 19-nukleotydowe odwrócone powtórzenie GATAATGATAATCATTATC [34]. Znaczenie później zauważono, że sekwencja ta może być także interpretowana jako potrójnie powtórzony heksamer GATAAT w konfiguracji „głowa-głowa-ogon”. W przeprowadzonych badaniach z wykorzystaniem syntetycznych oligonukleotydów wykazano wiązanie białka Fur do sekwencji nukleotydowych zawierających przynajmniej trzy takie 6-nukleotydowe motywy [35]. Wyniki te zasugerowały, iż to właśnie sekwencja GATAAT jest jednostką rozpoznawaną przez represor. Ostatnia hipoteza dotycząca oddziaływania Fur z DNA powstała w oparciu o analizę sekwencji nukleotydowych rozpoznawanych przez represor Fur z *B. subtilis* oraz struktury krystaliczne białka Fur z *P. aeruginosa* i białka DtxR z *Corynebacterium diphtheriae* (kod PDB: 1DDN), pełniącego funkcję podobną do białka Fur w bakteriach gramdodatnich [36]. Represor DtxR, podobnie jak Fur, funkcjonuje jako dimer i oddziałuje z rozpoznawaną sekwencją nukleotydową po związaniu jonu żelaza. Model ten zakłada, że pierwotnie rozpoznana 19-nukleotydowa sekwencja w rzeczywistości stanowi dwa zachodzące na siebie odwrócone powtórzenia, z których każdy wiązany jest przez dimer Fur [37]. W rzeczywistości motyw rozpoznawany przez dimer Fur składa się jedynie z dwóch z pierwotnie sugerowanych trzech heksamerów, tworząc tym samym motyw 7-1-7 (tGATAAT-nATTATCa). W ten sposób w obrębie promotora wiązane są dwa dimery Fur, każdy rozpoznający jeden z dwóch nachodzących na siebie motywów 7-1-7 (Ryc. 3).

Niektóre badania dodatkowo modyfikują obecnie obowiązujący model wiązania się białka Fur do promotora. Wykazano, że inkubacja *in vitro* represora z fragmentem promotora będącego pod kontrolą Fur, powoduje jego ochronę przed działaniem DNazy I na znacznie większym odcinku niż wskazywałaby na to wielkość dimeru. Wielkość ta była różna w zależności od analizowanego fragmentu i mogła oscylować w przedziale od 31 par zasad dla modelu proponowanego przez Baichoo i Helmann [37], do nawet 100 par zasad w przypadku promotora dla genów syntezy aerobaktyny [38]. Autorzy tej hipotezy zaproponowali mechanizm działania oparty na wiązaniu się białka Fur w rejonie sekwencji nukleotydowej, tworzącej klasyczny „Fur box”, do której białko wykazuje największe powinowactwo. Promuje to jednocześnie wiązanie się kolejnych cząsteczek represora w rejonach sąsiadujących o zdecydowanie niższym powinowactwie. W efekcie prowadzi to do oligomeryzacji kilku dimerów Fur i zablokowania znacznie większego fragmen-



Rycina 3. Modele wiązania się represora Fur do DNA. Kluczowe dla wiązania się białka Fur są powtórzone heksamery GATAAT w dowolnej konfiguracji (A). Model, w którym białko Fur rozpoznaje nukleotydowe sekwencje palindromowe o długości 9 par zasad po obu stronach helisy (B). Model zaproponowany przez Baichoo i Helmann [37] (C). Kluczowy dla rozpoznania promotora jest motyw 7-1-7 obecny na obu niciach DNA i częściowo na siebie nachodzący. Według tego modelu represor Fur wiąże się tylko w obrębie jednej nici, rozpoznając motyw 7-1-7. W obrębie promotora dochodzi zatem do wiązania się dwóch dimerów Fur.

tu promotora przez utworzenie struktury wokół DNA podobnej do spirali zbudowanej z kolejno ułożonych po sobie dimerów Fur. Podobny mechanizm wykazano również w przypadku autoregulacji ekspresji genu *fur* u bakterii *H. pylori* [39]. W tym przypadku Fur reguluje transkrypcję własnego genu poprzez wiązanie się do więcej niż jednego miejsca w obrębie promotora. U niektórych bakterii wykazano obecność podobnych fragmentów wiążących Fur w rejonie promotora, ale o niskim powinowactwie, a wiązanie Fur zachodziło przy stężeniach mikromolarnych [32,40-42] w porównaniu ze stężeniami nanomolarnymi w przypadku miejsc wiążących o wysokim powinowactwie. Mechanizm ten wyjaśnia stosunkowo dużą jak na białko regulatorowe ilość kopii białka Fur, która w fazie stacjonarnej sięga 10000 cząsteczek przypadających na jedną komórkę [43]. Powszechność białka Fur w cytoplazmie bakterii podyktowana jest również znaczną liczbą genów znajdujących się pod jego wpływem (>90), jak również potencjalną rolą tego białka jako czynnika buforującego poziom jonów żelaza. Ze względu na stałą powinowactwa represora do jonów Fe²⁺, wynoszącą ok. 10 μM [19], która oscyluje w okolicach fizjologicznego stężenia wolnego żelaza w komórce, funkcja ta wydaje się być bardzo prawdopodobna.

Znane są również przykłady negatywnej regulacji pośredniej zachodzącej przy udziale białka Fur [4]. W takich wypadkach represor Fur hamuje ekspresję innego promotora, który z kolei wpływa na geny transportu żelaza do komórki. Przykładami tego typu czynników pozostających pod kontrolą Fur są regulatory syntezy i wykorzystania sideroforów AraC oraz alternatywne czynniki sigma polimerazy RNA, umożliwiające transkrypcję wąskiej grupy genów. Połączenie mechanizmu negatywnej regulacji pośredniej i bezpośredniej przez represor Fur zaobserwowano w przypadku systemu kontroli pobierania przez komórki *E. coli* żelaza kompleksowanego przez cząsteczki kwasu cytrynowego. Taka forma jest powszechnie obecna w osoczu i wykorzystywana przez patogenne szczepy *E. coli* jako potencjalne źródło żelaza. Geny *fecABCDE* tworzące jeden operon i kodujące białka systemu transportującego cytrynian żelaza do cytoplazmy znajdują się pod kontrolą specyficznego dla nich czynnika sigma Fecl należącego do typu 4 dużej rodziny czynników sigma70. Zdolność wiązania się Fecl do promotora i formowanie kompleksu transkrypcyjnego warunkowane jest poziomem żelaza ze względu na obecność sekwencji nukleotydowej rozpoznawanej przez represor Fur w obrębie promotora. Dodatkowo, ekspresja samego białka Fecl kontrolowana jest również przez represor Fur sprawiając, że kluczowy dla regulacji poziomu żelaza wewnątrz komórki proces jego transportu jest podwójnie kontrolowany [44].

Niektóre bakterie nie są zdolne do syntezy hemu ze względu na brak pełnego szlaku biosyntezy tej cząsteczki. Dlatego też oprócz żelaza muszą one pobierać ze środowiska zewnętrznego pierścien porfirynewy. Mechanizm przyswajania żelaza oraz protoporfiryny IX w postaci hemu zidentyfikowany został u bakterii *Porphyromonas gingivalis*. Ekspresja genów *hmuYR*, których produkty białkowe odpowiedzialne są za wiązanie i transport hemu do wnętrza komórki bakteryjnej, podobnie jak w przypadku poszczególnych elementów szlaku przyswajania żelaza u *E. coli*, jest

zależna od poziomu żelaza w komórce bakteryjnej [45]. Nie wiadomo jednak czy regulacja ekspresji tych genów jest zależna od białka Fur, gdyż w regionie promotora nie znaleziono typowej sekwencji nukleotydowej rozpoznawanej przez białko Fur.

Białko Fur wydaje się być zaangażowane w regulację dużej liczby genów nie tylko bezpośrednio związanych z pozyskiwaniem żelaza. Zaobserwowano jego wpływ także na takie procesy komórkowe, jak odpowiedź na niskie pH środowiska, obrona przed reaktywnymi formami tlenu, chemotaksja, bioluminescencja czy produkcja toksyn i innych czynników wirulencji. Przykładami produktów ekspresji takich genów są: dysmutaza ponadtlenkowa SodA i SodB u *E. coli* [46], białka tolerancji na obniżone pH u *Salmonella typhimurium* [47], bakteryjne ferrytyny Bfr i Ftn oraz akonitaza AcnA z *E. coli* [48]. W żadnym z tych przypadków nie zidentyfikowano sekwencji nukleotydowej rozpoznawanej przez Fur w rejonach promotorowych. W ostatnich latach ukazało się wiele prac dotyczących mechanizmu pozytywnej regulacji niektórych genów przez kompleks Fur-Fe²⁺. Udowodniono, że ten typ regulacji jest uzależniony od funkcji małych cząsteczek RNA (sRNA) [46,49]. Najdokładniej scharakteryzowanym sRNA tego typu jest RyhB z bakterii *E. coli* [50,51]. Podobne cząsteczki odkryto również u szeregu innych gatunków, m.in. u *Vibrio cholerae* [22], *Shigella flexneri* [52], *Anabaena* sp. [53]. Analiza ekspresji genów u *E. coli* wykonana przy zastosowaniu mikromacierzy wykazała, że RyhB wpływa na poziom 18 transkryptów kodujących 56 białek [54]. Ostatnio zidentyfikowanym odpowiednikiem cząsteczki RyhB u bakterii *Neisseria meningitidis* jest NrrF [55]. Cząsteczka ta nie wykazuje homologii w sekwencji nukleotydowej w stosunku do RyhB, pełniąc jednak analogiczne do niej funkcje. U *P. aeruginosa* gen kodujący funkcjonalny homolog cząsteczki RyhB uległ w toku ewolucji podwojeniu. PrrF1 i PrrF2 występują w genomie *P. aeruginosa* tandemowo powtórzone i są w ponad 95% homologiczne do siebie. Dodatkowo, każdy gen poprzedzony jest odrębnym promotorem, w którym obecny jest region rozpoznawany przez białko Fur [56]. Ortolog i paralog cząsteczki RyhB, czyli RfrA i RfrB, wykryto również u bakterii z rodzaju *Salmonella* [57].

W rejonie promotora poprzedzającego gen kodujący cząsteczki RyhB obecny jest region „Fur box”. W ten sposób poziom ekspresji tego genu jest regulowany bezpośrednio przez białko Fur i zależny od aktualnego poziomu żelaza w komórce. RyhB działa na poziomie potranskrypcyjnym poprzez wiązanie się do mRNA w rejonie sekwencji nukleotydowej rozpoznawanej przez rybosom (RBS, ang. *ribosome binding site*) oraz obniżanie stabilności transkryptów niektórych genów, takich jak: *sodB*, *sdhC*, *fumA*, *bfr*, których produkty wykorzystują żelazo jako kofaktor. Wstrzymanie produkcji sRNA przez Fur prowadzi do spadku szybkości degradacji transkryptów, co w efekcie obserwowane jest jako pozytywna regulacja, pośrednio spowodowana działaniem białka Fur (Ryc. 4). Hamujący efekt sRNA na docelowy mRNA zachodzi przy udziale zależnego od białek opiekuńczych oddziaływania między sRNA i mRNA [58]. Hfq to małe (11,2 kDa) białko o właściwościach białka opiekuńczego, występujące w postaci heksamery [59], które po raz pierwszy odkryto jako czynnik wymagany do replikacji



Rycina 4. Schemat regulacji poziomu żelaza w komórce bakteryjnej przy udziale białka Fur. sRNA, mały RNA; RyhB, mały RNA występujący w bakteriiach *E. coli*; fnr, transkrypt ferrytyny.

faga Q β w bakteriiach *E. coli*. Jego rola polega na stabilizacji kompleksu mRNA-sRNA poprzez ułatwienie przyjęcia określonej struktury przestrzennej poszczególnych cząsteczek RNA oraz ułatwienie parowania nukleotydów pomiędzy nimi, które w wielu przypadkach nie są w 100% komplementarne [60]. Formowanie trójskładnikowego kompleksu RyhB-mRNA-Hfq prowadzi w efekcie końcowym do degradacji mRNA przy udziale RNazy E [61,62]. RNaza E jest kluczową endorybonukleazą zaangażowaną w procesowanie i degradowanie komórkowego mRNA. Razem z kilkoma innymi białkami tworzy ona kompleks zwany degradosomem [63]. Za formowanie kompleksu odpowiedzialny jest region C-końcowy RNazy E. Badania nad mutantami pozbawionymi tego regionu wykazują obniżenie efektywności degradacji kompleksów mRNA, sugerując, że cały proces jest wieloetapowy i zależy od wzajemnego współdziałania poszczególnych składników [61].

Pomimo wykorzystywania żelaza jako kofaktora przez niektóre enzymy związane ze szlakiem syntezy nukleotydów, takich jak reduktaza rybonukleotydów oraz dehydrataza dihydroksykwasów, ekspresja ich genów wydaje się być niezależna od białka Fur [64]. W stanach niedoboru żelaza w środowisku synergistyczne działanie białka Fur oraz RyhB jest kluczowe zarówno dla pozyskania tego pierwiastka z otoczenia, jak również skierowania jego zapasów w stronę najbardziej istotnych szlaków metabolicznych poprzez zahamowanie ekspresji genów kodujących mniej istotne białka, również korzystających z komórkowych zapasów żelaza. Szereg badań uwidacznia także rolę RyhB według zbliżonego mechanizmu w indukcji czynników wirulencji u wielu bakterii, w tym u *V. cholerae*. Mutanty RyhB tej bakterii wykazywały obniżoną zdolność do formowania biofilmu oraz chemotaksji, chociaż dodanie żelaza do hodowli powodowało przywrócenie fenotypu charakterystycznego dla stanu wirulencji. Pokazuje to, że co prawda RyhB nie

jest niezbędny do indukcji markerów wirulencji, jednak w stanach niedoboru żelaza, jakie mają miejsce właśnie w organizmie gospodarza, kieruje jego zapasy w kierunku procesów tworzenia biofilmu i chemotaksji [22].

W ostatnim czasie pojawiły się doniesienia o bezpośrednim działaniu białka Fur jako aktywatora transkrypcji. Mechanizm ten był niezależny od cząsteczki RyhB i zidentyfikowany został u bakterii *N. meningitidis*. Wykazano, że do efektywnej transkrypcji genów *norB*, *pan1* oraz *nuoA* konieczna jest obecność sekwencji rozpoznawanej przez białko Fur w rejonie promotora poprzedzającego te geny [65]. Podobny efekt zaobserwowano w *Mycobacterium tuberculosis* w przypadku białka IdeR, należącego do rodziny białek Fur, które zdolne było do aktywacji genu *bfr*, kodującego bakterioferrytynę [66]. Niewiele wiadomo o podobnych mechanizmach u innych gatunków bakterii, stąd trudno określić konkretną rolę białka Fur w procesie aktywacji bakteryjnej polimerazy RNA (RNAP), tym bardziej, że zarówno Fur z *N. meningitidis*, jak również z *Mycobacterium* są w istotnym stopniu homologiczne z pozostałymi przedstawicielami rodziny i nie posiadają w swojej strukturze domeny potencjalnie zaangażowanej w aktywację RNAP.

PODSUMOWANIE

Zdolność pozyskiwania żelaza jest jednym z podstawowych elementów warunkujących patogenność mikroorganizmów. Ograniczona dostępność żelaza jest dla licznych bakterii chorobotwórczych sygnałem, iż znalazły się w organizmie gospodarza. Konieczność kontroli szerokiej gamy genów związanych z przyswajaniem, magazynowaniem i dystrybucją żelaza, indukcją czynników wirulencji oraz ochroną przed reaktywnymi formami tlenu przez tylko jedno białko, wymusza na komórce wypracowanie mechanizmów pozwalających na modulowanie aktywności represora Fur. Liczne doniesienia pojawiające się w prasie naukowej pozwalają określić funkcję białka Fur jako nadrzędnego czynnika regulującego procesy transkrypcji. Pomimo stosunkowo wysokiej homologii pomiędzy poszczególnymi przedstawicielami białek z rodziny Fur, mechanizmy działania u poszczególnych gatunków wydają się być różne i dostosowane do wymogów stawianych organizmowi przez środowisko. Również w obrębie tego samego gatunku białko Fur może działać według różnych modeli, pozwalając tym samym na bardzo precyzyjną kontrolę i zróżnicowanie poziomu ekspresji poszczególnych genów. Udowodniono, że szczegółowe poznanie podstawowych mechanizmów zachodzących w żywych organizmach, a zwłaszcza tych, które są wykorzystywane przez bakterie chorobotwórcze, umożliwia opracowanie testów diagnostycznych oraz metod zapobiegania chorobom oraz ich leczenia.

PIŚMIENNICTWO

1. Beinert H, Holm RH, Muncke E (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277: 653-659
2. Weinberg ED (1997) The *Lactobacillus* anomaly: total iron abstinence. *Perspect Biol Med* 40: 578-583
3. Imbert M, Blondeau R (1998) On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. *Curr Microbiol* 37: 64-66
4. Siudeja K, Olczak T (2005) Mechanisms and regulation of iron and heme utilization in Gram-negative bacteria. *Postepy Biochem* 51: 198-208

5. Schneider BD, Leibold EA (2000) Regulation of mammalian iron homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3: 267-273
6. Hantke K (1981) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet* 182: 288-292
7. Bagg A, Neilands JB (1985) Mapping of a mutation affecting regulation of iron uptake systems in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 161: 450-453
8. Hantke K (1984) Cloning of the repressor protein gene of iron-regulated systems in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* 197: 337-341
9. Schaffer S, Hantke K, Braun V (1985) Nucleotide sequence of the iron regulatory gene *fur*. *Mol Gen Genet* 200: 110-113
10. Staggs TM, Perry RD (1991) Identification and cloning of a regulatory gene in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* 173: 417-425
11. Ernst JF, Bennett RL, Rothfield LI (1978) Constitutive expression of the iron-enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 135: 928-934
12. Litwin CM, Boyko SA, Calderwood SB (1992) Cloning, sequencing, and transcriptional regulation of the *Vibrio cholerae fur* gene. *J Bacteriol* 174: 1897-1903
13. Prince RW, Cox CD, Vasil ML (1993) Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa fur* gene. *J Bacteriol* 175: 2589-2598
14. Bereswill S, Lichte F, Vey T, Fassbinder F, Kist M (1998) Cloning and characterization of the *fur* gene from *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* 159: 193-200
15. Wooldridge KG, Williams PH, Ketley JM (1994) Iron-responsive genetic regulation in *Campylobacter jejuni*: cloning and characterization of a *fur* homolog. *J Bacteriol* 176: 5852-5856
16. Bsat N, Herbig A, Casillas-Martinez L, Setlow P, Helmann JD (1998) *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol Microbiol* 29: 189-198
17. Heidrich C, Hantke K, Bierbaum G, Sahl HG (1996) Identification and analysis of a gene encoding a Fur-like protein of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* 140: 253-259
18. Lee JW, Helmann JD (2007) Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* 20: 485-499
19. Bagg A, Neilands JB (1987) Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron(II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26: 5471-5477
20. Palyada K, Threadgill D, Stintzi A (2004) Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 186: 4714-4729
21. Gao H, Zhou D, Li Y, Guo Z, Han Y, Song Y, Zhai J, Du Z, Wang X, Lu J, Yang R (2008) The iron-responsive Fur regulon in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* 190: 3063-3075
22. Mey AR, Craig SA, Payne SM (2005) Characterization of *Vibrio cholerae* RyhB; the RyhB regulon and role of *ryhB* in biofilm formation. *Infect Immun* 73: 5706-5719
23. Oglesby AG, Farrow III JM, Lee JH, Tomaras AP, Greenberg EP, Pesci EC, Vasil ML (2008) The influence of iron on *Pseudomonas aeruginosa* physiology. A regulatory link between iron and quorum sensing. *J Biol Chem* 283: 15558-15567
24. Pohl E, Haller JC, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Garman E, Vasil ML (2003) Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* 47: 903-915
25. Pecqueur L, D'Autréaux B, Dupuy J, Nicolet Y, Jacquamet L, Brutscher B, Michaud-Soret I, Bersch B (2006) Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J Biol Chem* 281: 21286-21295
26. Barton HA, Johnson Z, Cox CD, Vasil AI, Vasil ML (1996) Ferric uptake regulator mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with distinct alterations in the iron-dependent repression of exotoxin A and siderophores in aerobic and microaerobic environments. *Mol Microbiol* 21: 1001-1017
27. Friedman YE, O'Brian MR (2004) The ferric uptake regulator (Fur) protein from *Bradyrhizobium japonicum* is an iron-responsive transcriptional repressor *in vitro*. *J Biol Chem* 279: 32100-32105
28. Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML (1995) Role of the ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* in the regulation of siderophores and exotoxin A expression: purification and activity on iron-regulated promoters. *J Bacteriol* 177: 7194-7201
29. Millis SA, Marletta MA (2005) Metal binding characteristics and role of iron oxidation in the ferric uptake regulator from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 44: 13553-13559
30. Delany I, Pacheco ABF, Spohn G, Rappuoli R, Scarlato V (2001) Iron-dependent transcription of the *frpB* gene of *Helicobacter pylori* is controlled by the Fur repressor protein. *J Bacteriol* 183: 4932-4937
31. Tiss A, Barre O, Michaud-Soret I, Forest E (2005) Characterization of the DNA-binding site in the ferric uptake regulator protein from *Escherichia coli* by UV crosslinking and mass spectrometry. *FEBS Lett* 579: 5454-5460
32. Sala C, Forti F, Florio ED, Canneva F, Milano A, Riccardi G, Ghisotti D (2003) *Mycobacterium tuberculosis* FurA autoregulates its own expression. *J Bacteriol* 185: 5357-5362
33. van Vliet AH, Rock JD, Madeleine LN, Ketley JM (2000) The iron-responsive regulator Fur of *Campylobacter jejuni* is expressed from two separate promoters. *FEMS Microbiol Lett* 188: 115-118
34. de Lorenzo V, Giovannini F, Herrero M, Neilands JB (1988) Metal ion regulation of gene expression. Fur repressor-operator interaction at the promoter region of the aerobactin system of pColV-K30. *J Mol Biol* 203: 875-884
35. Escolar L, Perez-Martin J, de Lorenzo V (1998) Binding of the *fur* (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol* 283: 537-547
36. White A, Ding X, van der Spek JC, Murphy JR, Ringe D (1998) Structure of a metal-ion-activated diphtheria toxin repressor/tox operator complex. *Nature* 394: 502-506
37. Baichoo N, Helmann JD (2002) Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* 184: 5826-5832
38. Escolar L, Perez-Martin J, de Lorenzo V (2000) Evidence of unusually long operator for the Fur repressor in the aerobactin promoter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275: 24709-24714
39. Delany I, Spohn G, Pacheco AF, Ieva R, Alaimo C, Rappuoli R, Scarlato V (2002) Autoregulation of *Helicobacter pylori* Fur revealed by functional analysis of the iron-binding site. *Mol Microbiol* 46: 1107-1122
40. Lee HJ, Bang SH, Lee KH, Park SJ (2007) Positive regulation of *fur* gene expression via direct interaction of Fur in a pathogenic bacterium, *Vibrio vulnificus*. *J Bacteriol* 189: 2629-2636
41. Delany I, Ieva R, Alaimo C, Rappuoli R, Scarlato V (2003) The iron-responsive regulator Fur is transcriptionally autoregulated and not essential in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 185: 6032-6041
42. Delany L, Spohn G, Rappuoli R, Scarlato V (2003) An anti-repression Fur operator upstream of the promoter is required for iron-mediated transcriptional autoregulation in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 50: 1329-1338
43. Zheng M, Doan B, Schneider TD, Storz G (1999) OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J Bacteriol* 181: 4639-4643
44. Braun V, Mahren S, Sauter A (2006) Gene regulation by transmembrane signalling. *Biometals* 19: 103-113
45. Olczak T, Simpson W, Liu X, Genco CA (2005) Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Rev* 29: 119-144
46. Dubrac S, Touati D (2000) Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J Bacteriol* 182: 3802-3808
47. Hall HK, Foster JW (1996) The role of *fur* in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J Bacteriol* 178: 5683-5691
48. Tang Y, Guest JR (1999) Direct evidence for mRNA binding and post-transcriptional regulation by *Escherichia coli* aconitases. *Microbiology* 145: 3069-307940
49. Dubrac S, Touati D (2002) Fur-mediated transcriptional and posttranscriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* 148: 147-156

50. Masse E, Gottesman S (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4620-4625
51. Zhang Y, Sun S, Wu T, Wang J, Liu C, Chen L, Zhu X, Zhao Y, Zhang Z, Shi B, Lu H, Chen R (2006) Identifying Hfq-binding small RNA targets in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 950-955
52. Oglesby AG, Murphy ER, Iyer VR, Payne SM (2005) Fur regulates acid resistance in *Shigella flexneri* via RyhB and *ydeP*. *Mol Microbiol* 58: 1354-1367
53. Hernandez JA, Muro-Pastor AM, Flores E, Bes MT, Paleato ML, Fillat MF (2006) Identification of a *furA* cis antisense RNA in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *J Mol Biol* 355: 325-334
54. Masse E, Vanderpool CK, Gottesman S (2005) Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187: 6962-6971
55. Mellin JR, Goswami S, Grogan S, Tjaden B, Genco CA (2007) A novel Fur- and iron-regulated small RNA, NrrF, is required for indirect Fur-mediated regulation of *siltA* and *sdhC* gene in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 189: 3686-3694
56. Wilderman JP, Sowa NA, FitzGerald DJ, FitzGerald PC, Gottesman S, Ochsner UA, Vasil ML (2004) Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9792-9797
57. Ellermeier JR, Schlauch JM (2008) Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. *J Bacteriol* 190: 476-486
58. Vecerek B, Moll I, Afonyushkin T, Kaberdin V, Blasi U (2003) Interaction of the RNA chaperone Hfq with mRNAs: direct and indirect roles of Hfq in iron metabolism of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 50: 897-909
59. Arluison V, Derreumaux P, Allemand F, Folichon M, Hajnsdorf E, Regnier P (2002) Structural modelling of the Sm-like protein Hfq from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 320: 705-712
60. Geissmann TA, Touati D (2004) Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J* 23: 396-405
61. Masse E, Escorcía E, Gottesman S (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 17: 2374-2383
62. Vecerek B, Moll I, Blasi U (2007) Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *EMBO J* 26: 965-975
63. Morita T, Maki K, Aiba H (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by noncoding RNAs. *Genes Dev* 19: 2176-2186
64. Jacques JF, Jang S, Prevost K, Desnoyers G, Desmarais M, Imlay J, Masse E (2006) RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 62: 1181-1190
65. Delany I, Rappuoli R, Scarlato V (2004) Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 52: 1081-1090
66. Gold B, Rodriguez GM, Marras SA, Pentecost M, Smith I (2001) The *Mycobacterium tuberculosis* IdeR is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages. *Mol Microbiol* 42: 851-856

Regulation of gene expression in the bacterial cell by Fur family proteins

Marcin Szafran, Teresa Olczak

Laboratory of Biochemistry, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, 2 Tamka St., 50-137 Wrocław, Poland

e-mail: Teresa.olczak@biotech.uni.wroc.pl

Keywords: DNA-binding protein, Fur repressor, iron, sRNA

ABSTRACT

Bacteria require iron for growth. To acquire environmental iron and transport it into the bacterial cell, they evolved sophisticated mechanisms. However, an excess of iron may be toxic for the cell, mostly by its involvement in the generation of reactive species. To date, no mechanisms of excretion of iron outside the bacterial cell were found, thus cellular iron level regulation is performed by control of its transport and appropriate synthesis of iron-coordinating and iron-storage proteins. The majority of genes engaged in iron homeostasis in the bacterial cell are under a global regulator, repressor Fur. In this work, structure and function of proteins comprising Fur family and their involvement in iron level regulation is presented.

Fluorescencyjne metody badania oligomeryzacji receptorów związanych z białkami G

STRESZCZENIE

Metody fluorescencyjne opierające się na zjawisku rezonansowego przeniesienia energii na odległość, stanowią obecnie szeroko stosowane narzędzie do badania procesów biologicznych, m.in. oddziaływań białek, w tym receptorów związanych z białkami G. Dzięki rozwojowi inżynierii molekularnej możliwe stało się badanie zjawiska oligomeryzacji receptorów w żywych komórkach, poprzez sprzęganie ich z białkami fluorescencyjnymi. Obecnie uważa się, że poznanie fizycznych oddziaływań receptorów może mieć ogromne znaczenie w opracowywaniu czynników terapeutycznych, ingerujących w subtelnie regulowany przekaz informacji w poprzek błony komórkowej. Niniejsze opracowanie omawia techniki fluorescencyjne stosowane w badaniach oligomeryzacji receptorów błonowych. Badania porównawcze wskazują, że nawet stosunkowo prosta technika, jaką jest stacjonarna spektroskopia fluorescencji, pozwala na wyciągnięcie wniosków dotyczących oddziaływania receptorów. Natomiast metody bardziej zaawansowane, jak mikroskopia konfokalna i mikroskopia czasów życia fluorescencji, nie tylko dostarczają precyzyjnych informacji ilościowych, ale pozwalają też na określenie lokalizacji wewnątrzkomórkowej badanych cząsteczek.

WPROWADZENIE

Receptory związane z białkami G (GPCRs, ang. *G-Protein Coupled Receptor*) należą do wielkiej rodziny białek błonowych, które mimo strukturalnego podobieństwa stanowią najbardziej zróżnicowaną funkcjonalnie grupę receptorów wiążącą rozmaite hormony, neurotransmitery i chemokiny. Receptory te poprzez oddziaływanie ze specyficznymi trimericznymi białkami G, sklasyfikowanymi w cztery podrodziny (G_s , G_i , G_q i G_{12}), przekazują sygnały dochodzące do komórek na rozmaite enzymy efektorowe, takie jak m. in. cykloaza adenylova czy fosfolipaza C, stymulując bądź hamując ich aktywność, co wpływa na wytworzenie we wnętrzu komórki przekazników drugiego rzędu. Zainicjowane w ten sposób kaskady zdarzeń biochemicznych wpływają na metabolizm komórkowy oraz na ekspresję genów [1]. Od tego, jak funkcjonują GPCRs zależy, w jaki sposób sygnały dochodzące do komórek zostaną przez nie odebrane. Dlatego też zaburzenia w funkcjonowaniu GPCRs często prowadzą do poważnych schorzeń. W ośrodkowym układzie nerwowym prawidłowe funkcjonowanie układów receptorowych ma szczególnie istotne znaczenie – neurony i inne komórki mózgu komunikują się ze sobą za pomocą neurotransmiterów i neuromodulatorów, z których ogromna większość działa poprzez GPCRs [2]. W obrębie ligandów tych receptorów znajduje się większość leków stosowanych w terapii schorzeń neuropsychiatrycznych, podobnie – właśnie w tej grupie związków poszukuje się nowych substancji o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym, najlepiej takich, których selektywność działania byłaby największa.

Ostatnio pojawiły się doniesienia, że GPCRs mogą ze sobą oddziaływać i tworzyć homo- bądź heterooligomery w błonie komórkowej [1,3,4]. Jako heterooligomery¹ – receptory te mogą funkcjonować nieco inaczej niż wtedy, gdy działają niezależnie od siebie, dlatego też możliwe jest wystąpienie dodatkowego – bardzo specyficznego – poziomu regulacji fizjologicznej i farmakologicznej. Zwłaszcza, że pary receptorów mogące tworzyć heterooligomery, nie zawsze są zlokalizowane na tych samych komórkach – stosując związki działające specyficznie na poziomie heterooligomerów, można potencjalnie bardzo selektywnie regulować procesy przekazywania sygnału. Przykładowo, dla receptorów opioidowych δ i κ zlokalizowanych w rdzeniu kręgowym i tam tworzących heterooligomery, wykazano odmienną wrażliwość na specyficzne ligandy [5], co może mieć znaczenie w poszukiwaniu selektywnych leków przeciwbólowych. Z kolei dla opracowania nowych strategii leczenia choroby Parkinsona wielkie znaczenie może mieć specyficzność działania pewnych związków na poziomie heterooligomerów receptorów dopaminowych D_2 - D_3 [6]. Niedawno wykazano, że jednoczesna stymulacja receptorów dopaminowych D_1 i D_2 (nasilająca tworzenie heterooligomerów tych receptorów) prowadzi do aktywacji fosfolipazy

¹W świetle ostatnich opracowań, kwestią nierozstrzygniętą pozostaje czy receptory tworzą w błonie komórkowej heterodimery, czy też bardziej skomplikowany układ heterooligomerów, tzw. mozaikę receptorów [3].

Katarzyna Grymek^{1,2}

Magdalena Gąska¹

Sylwia Łukasiewicz³

Andrzej Górecki³

Marta Dziedzicka-Wasylewska^{1,3,✉}

¹Zakład Farmakologii, Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk, Kraków,

²Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej, Kraków

³Zakład Biochemii Fizycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

✉ Zakład Biochemii Fizycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; tel.: (012) 662 33 72, e-mail: wasyl@mol.uj.edu.pl

Artykuł otrzymano 12 grudnia 2007 r.

Artykuł zaakceptowano 15 kwietnia 2008 r.

Słowa kluczowe: GPCR, oligomeryzacja receptorów, FRET, białka fluorescencyjne, metody fluorescencyjne

Wykaz skrótów: BRET (ang. *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) – bioluminescencyjne rezonansowe przeniesienie energii na odległość; CFP (ang. *Cyan Fluorescent Protein*) – jasnoniebieskie białko fluorescencyjne; FLM (ang. *Fluorescence Lifetime Microscopy*) – mikroskopia czasów życia fluorescencji; FP (ang. *Fluorescent Protein*) – białko fluorescencyjne; FRAP (ang. *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) – przywracanie fluorescencji po fotowycieplaniu; FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) – Försterowskie rezonansowe przeniesienie energii na odległość; GPCR(s) (ang. *G-Protein Coupled Receptor(s)*) – receptor(y) sprzężone z białkami G; TCSPC (ang. *Time-Correlated Single Photon Counting*) – zależne od czasu zliczanie pojedynczych fotonów; YFP (ang. *Yellow Fluorescent Protein*) – żółte białko fluorescencyjne

Podziękowania: Pragniemy zadedykować to opracowanie pamięci Profesora Zygmunta Wasylewska, którego głęboka wiedza z zakresu spektroskopii fluorescencji i jej zastosowań w badaniach biochemicznych jest dla nas nieustającą inspiracją

C i wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, a nie regulacji poziomu cyklicznego AMP, co ma miejsce podczas oddzielnej stymulacji tych receptorów [7]. Działanie farmakologiczne na poziomie heterooligomerów D₁-D₂ może zapewniać selektywność efektów terapeutycznych, gdyż receptory te są zlokalizowane razem tylko na niewielkiej części mózgowych komórek nerwowych. Selektywność tę bardzo trudno osiągnąć w obrębie ligandów receptorów dopaminowych działających na ich monomery, ze względu na udział tych receptorów w regulacji wielu procesów w mózgu.

Oddziaływania między różnymi receptorami, nie tylko w obrębie tej samej klasy, ale także pomiędzy receptorami należącymi do odległych strukturalnie rodzin (jak np. receptora NMDA czy GABA_A, będących kanałami jonowymi o budowie podjednostkowej, z receptorami dopaminowymi, odpowiednio D₁ i D₂), występują dość powszechnie, choć mechanizm regulacji i znaczenie funkcjonalne tych oddziaływań wciąż pozostają nieznanne. Wiąże się to z faktem, że badania białek błonowych, w tym receptorów GPCRs, zakotwiczone w mozaice białkowo-lipidowej, która nawet u najprostszych organizmów jest złożoną i dynamiczną strukturą, stanowią duże wyzwanie. Istnieje kilka metod badawczych, które potwierdzają zachodzenie oligomeryzacji receptorów GPCRs, m. in. immunoprecypitacja, Western blot (wymagające zastosowania lizy komórek i użycia przeciwciał) oraz metody wykorzystujące rezonansowe przeniesienie energii na odległość (RET, ang. *Resonance Energy Transfer*). Jedynie wykorzystanie tego ostatniego zjawiska umożliwia prowadzenie badań w układzie natywnym i monitorowanie oligomeryzacji GPCRs w żywych komórkach, zapewniając równocześnie wysoką rozdzielczość czasową i przestrzenną. Niniejsza praca traktuje o trzech głównych wariantach tej techniki wykorzystujących zjawisko fluorescencji: stacjonarnej spektroskopii fluorescencji, mikroskopii konfokalnej oraz mikroskopii czasów życia fluorescencji. Wiele aspektów przedstawiono na przykładzie badań oligomeryzacji receptorów dopaminowych, gdyż receptory te znajdują się w obszarze zainteresowań Autorów niniejszego opracowania.

REZONANSOWE PRZENIESIENIE ENERGII

Rezonansowe przeniesienie energii na odległość, to zjawisko przekazu energii wzbudzenia między cząsteczkami donora i akceptora w procesie bezpromienistym, odbywającym się na zasadzie rezonansu, poprzez sprzężenie typu dipol-dipol. Warunkiem koniecznym do wystąpienia zjawiska RET jest częściowe nakładanie się widma emisji donora z widmem absorpcji akceptora. Od wyboru donora energii zależy z jakim zjawiskiem mamy do czynienia. W przypadku, gdy jest nim lucyferyna – substrat, który w wyniku utleniania (katalizowanego przez enzym lucyferazę) generuje światło – mówimy o zjawisku bioluminescencyjnego rezonansowego przeniesienia energii na odległość (BRET, ang. *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) [4]. Natomiast, gdy funkcję donora pełni fluorofor wzbudzany światłem o odpowiedniej długości fali, mamy do czynienia z Försterowskim rezonansowym przeniesieniem energii (FRET, ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) [8]. W obu przypadkach akceptorem energii wzbudzenia jest chromofor – najczę-

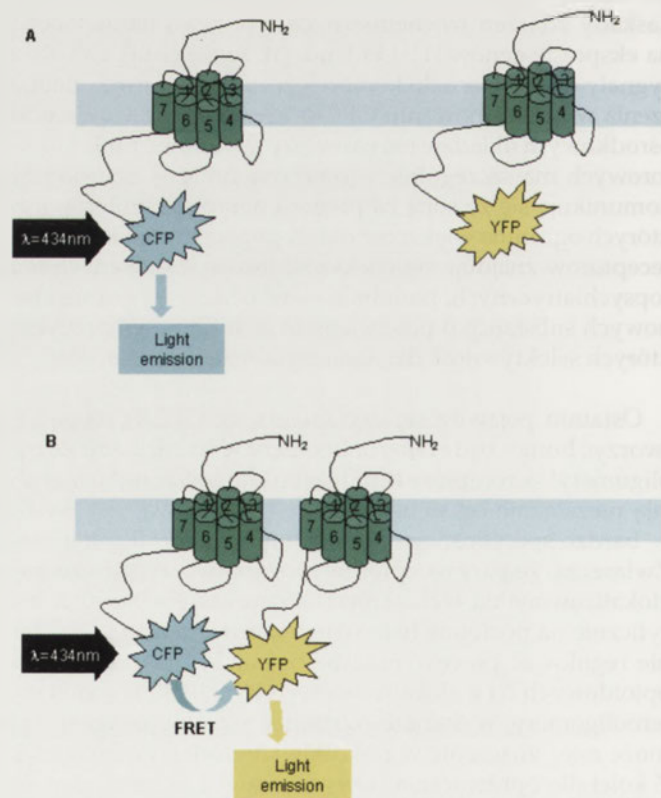
ściej będący także fluoroforem. Wydajność przekazu energii (E) jest silnie zależna od odległości pomiędzy donorem i akceptorem (r) i w metodzie FRET opisuje ją zależność:

$$E = \frac{R_0^6}{r^6 + R_0^6} \quad (1)$$

gdzie parametr R_0 – zwany odległością Förstera, jest wielkością charakterystyczną dla danej pary donor-akceptor, równą odległości, przy której wydajność transferu energii wynosi 50%. Wielkość ta zależy od takich czynników, jak: wydajność kwantowa fluorescencji donora (Q_D), wzajemna orientacja dipoli przejścia dla donora i akceptora (zależność tę określa współczynnik κ), współczynnika załamania światła (n), jak również od stopnia nakładania widma emisji donora i absorpcji akceptora określaną poprzez znormalizowaną całkę nakładania widm (J). Odległość Förstera określana jest równaniem:

$$R_0 = 9,79 \cdot 10^3 \sqrt{\frac{\kappa^2 Q_D J}{n^4}} [\text{Å}] \quad (2)$$

Pomiary przeniesienia energii umożliwiają śledzenie wielu zjawisk manifestujących się zmianą odległości pomiędzy donorem a akceptorem energii. Stąd też technika ta doskonale nadaje się do badania oddziaływań między cząsteczkami. Zwykle w takich doświadczeniach donor i akceptor fluorescencji ułożone są na dwóch różnych molekułach, co schematycznie przedstawiono na rycinie 1. Coraz



Rycina 1. Schemat eksperymentu FRET badania zjawiska oligomeryzacji GPCRs. Receptory sprzężone z białkami fluorescencyjnymi CFP i YFP. Wzbudzenie donora (CFP) światłem o długości fali 434 nm: (A) GPCRs nie oddziałują ze sobą – zjawisko FRET nie zachodzi, jedynie CFP emituje światło (niebieskie); (B) GPCRs oligomeryzują ze sobą – zjawisko FRET zachodzi, intensywność fluorescencji CFP maleje, pojawia się światło emitowane przez YFP.

powszechniej w tego typu doświadczeniach jako fluorofory wykorzystywane są białka fluorescencyjne, w szczególności gdy pomiary wykonywane są w żywych komórkach.

BIAŁKA FLUORESCENCYJNE W BADANIACH OLIGOMERYZACJI GPCR

Historia białek fluorescencyjnych (FP, ang. *Fluorescent Protein*) rozpoczęła się od odkrycia i wyizolowania z meduzy *Aequorea Victoria* zielonego białka fluorescencyjnego (GFP, ang. *Green Fluorescent Protein*), które po wzbudzeniu światłem fioletowym emituje zielone światło fluorescencji [9]. Poprzez wprowadzenie mutacji uzyskano szereg nowych wariantów tego białka. Licząc obecnie siedem klas, rodzinę FP stanowią białka o przesuniętych maksimach absorpcji i emisji fluorescencji [10]. Jako narzędzie badawcze wprowadzono nie tylko odmiany emitujące fluorescencję w innym zakresie widma, jak niebiesko świecące BFP (ang. *Blue Fluorescent Protein*) czy żółte YFP (ang. *Yellow Fluorescent Protein*), ale również stworzono warianty tych białek o lepszych własnościach spektralnych, w tym jasnoniebieskie ECFP (ang. *Enhanced Cyan Fluorescent Protein*), które posiada wyższą wydajność fluorescencji oraz większą fotostabilność [10]. Udało się ponadto wyizolować z koralowca *Discosoma* białko DsRed (ang. *Red Fluorescent Protein*), którego widmo emisji jest przesunięte w kierunku fal dłuższych [11]. Ponadto, z fluorescencyjnych koralowców emitujących jasnoniebieskie światło, *Acropora sp.*, i pomarańczowo świecących *Fungia concinna* zebranych w pobliżu wysp Okinawa, uzyskano odpowiednio białka nazwane MiCy (jap. *Midori-ishi*, ang. *Cyan*) oraz mKO (jap. *Kusabira*, ang. *Orange*) [12].

Metody inżynierii genetycznej umożliwiają tworzenie białek fuzyjnych, składających się z FP i badanego białka, które ulegają syntezie w wybranym układzie żywym, takim jak np. eukariotyczna linia komórkowa HEK293. Dzięki spontanicznemu przybieraniu własności fluorescencyjnych przez FP możliwe jest określenie lokalizacji badanych molekuł w komórce. Ponadto, własności spektralne białek fluorescencyjnych, w szczególności zakresy absorpcji i emisji poszczególnych wariantów GFP, umożliwiają ich wykorzystanie jako par donor-akceptor w metodzie FRET. Daje to możliwość badania homo- i heterooligomeryzacji receptorów, a także ich oddziaływania z białkami G (Ryc. 2 i 3). Przy doborze pary fluoroforów trzeba pamiętać, że białka te powinny ulegać wydajnej syntezie w komórce, nie wywołując równocześnie efektów toksycznych [12-14]. W badaniach FRET szczególnie istotna jest wysoka wydajność kwantowa donora i duży współczynnik absorpcji akceptora, a sygnał emisji fluorescencji powinien być znacznie większy od autofluorescencji komórek [10], dlatego też jedną z powszechniej wykorzystywanych par donor-akceptor jest para ECFP-EYFP (ang. *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*).

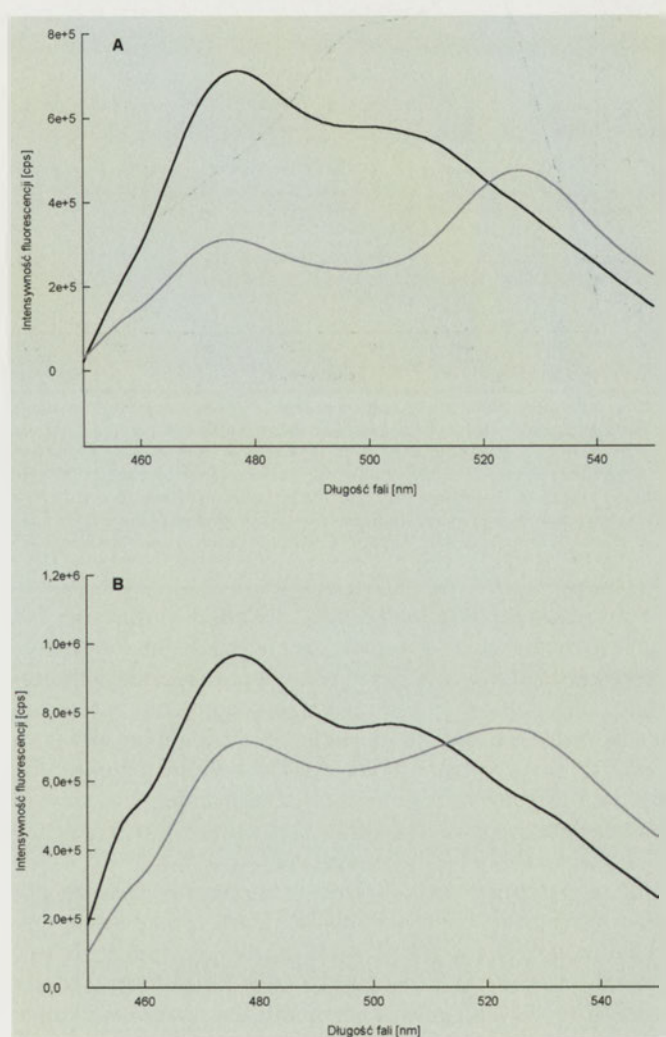
METODY FLUORESCENCYJNE Z WYKORZYSTANIEM ZJAWISKA FRET

STACJONARNA SPEKTROSKOPIA FLUORESCENCJI

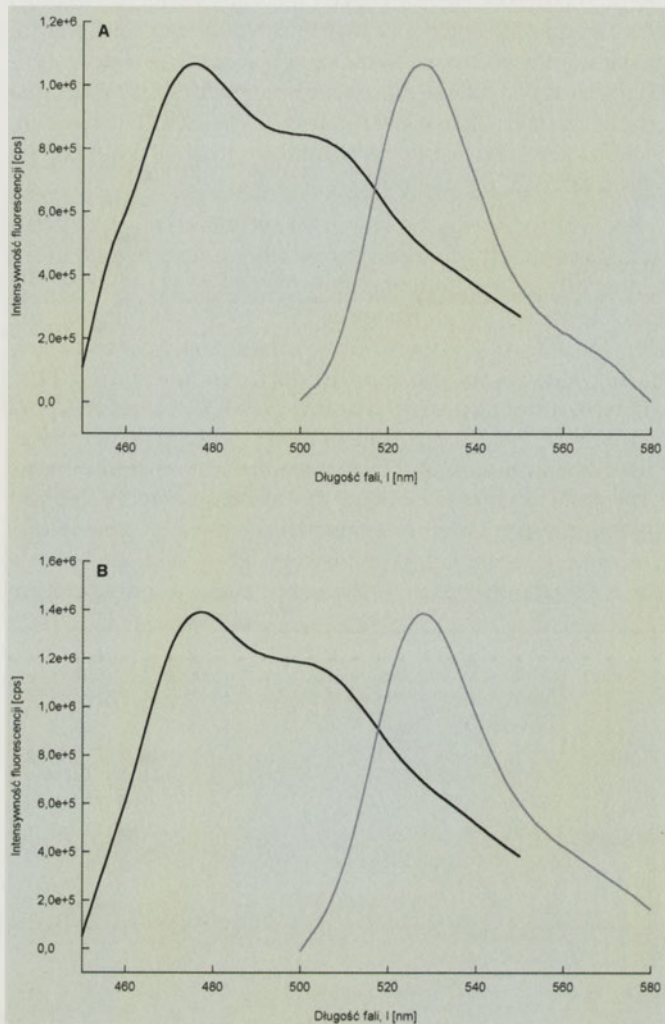
Relatywnie prostą metodą pozwalającą na badanie oddziaływań między cząsteczkami z wykorzystaniem zjawiska FRET, jest stacjonarna spektroskopia fluorescencji, w której dokonuje się porównania widm dla układu donor-ak-

ceptor i układów zawierających jedynie cząsteczki samego donora bądź akceptora. O występowaniu transferu energii pomiędzy fluoroforami świadczy pojawienie się fluorescencji charakterystycznej dla akceptora podczas wzbudzenia jedynie donora. Zjawisko to ma tym większe natężenie im większy jest spadek intensywności fluorescencji donora po wprowadzeniu do układu akceptora.

Specyficzność zastosowanej metody ilustruje przykład badania oddziaływań receptorów dopaminowych D_1 i D_2 z odpowiednimi podjednostkami α białek G [1]. Po uprzednim skonstruowaniu następujących białek fuzyjnych: D_1 -YFP, D_2 -YFP, α -CFP, α -CFP, potwierdzono doświadczalnie oddziaływanie receptorów dopaminowych D_1 i D_2 z odpowiednimi podjednostkami α białek G, co przedstawia rycina 2. W tym przypadku pomiary wykonane zostały w zawieszinie komórek. Zgodnie z teoretycznymi założeniami, otrzymane wyniki wskazują na oddziaływanie receptora dopaminowego D_1 z podjednostką α (Ryc. 2A szara krzywa) oraz receptora dopaminowego D_2 z podjednostką α (Ryc. 2B szara krzywa). Przy wzbudzeniu donora, którym



Rycina 2. Widma fluorescencji zawiesiny komórek HEK293, w których zachodzi synteza białek fuzyjnych: receptorów dopaminowych D_1 , D_2 oraz podjednostek α oraz α białek G. (A) Komórki HEK293 kotransfekowane plazmidami kodującymi białka fuzyjne: D_2 -YFP i α -CFP – krzywa szara; D_1 -YFP i α -CFP – krzywa czarna; (B) Komórki HEK293 kotransfekowane plazmidami kodującymi białka fuzyjne: D_2 -YFP i α -CFP – krzywa szara; D_1 -YFP i α -CFP – krzywa czarna. Wzbudzenie fluorescencji przy 434 nm (CFP).



Rycina 3. Widma fluorescencji dla mieszaniny dwóch populacji komórek HEK293, w każdej z nich obecne jest tylko jedno białko fuzyjne. (A) Komórki HEK293 transfekowane plazmidem kodującymi białko fuzyjne D_1 -YFP zmieszane z populacją komórek transfekowanych plazmidem kodującym α_5 -CFP. (B) Komórki HEK293 transfekowane plazmidem kodującymi białko fuzyjne D_2 -YFP zmieszane z populacją komórek transfekowanych plazmidem kodującym α_5 -CFP. Linia czarna, wzbudzenie przy 434 nm (CFP); linia szara, wzbudzenie przy 475 nm (YFP).

w tym układzie było białko CFP, światłem o długości fali 434 nm, można zaobserwować zmniejszenie intensywności fluorescencji donora (CFP) i pojawienie się emisji fluorescencji akceptora (YFP). Ponieważ akceptor nie był wzbudzany bezpośrednio, to pojawienie się jego fluorescencji świadczy o wzbudzeniu akceptora w wyniku przekazania energii, ilustrując tym samym oddziaływanie wyznakowanych molekuł.

W tego typu doświadczeniach konieczne staje się potwierdzenie, czy obserwowany FRET jest rzeczywiście wynikiem oddziaływania badanych cząstek, czy też może być efektem np. przypadkowego zbliżenia fluoroforów. Dlatego też kontrolą takiego eksperymentu jest przeprowadzenie analogicznego doświadczenia dla układu, w którym obecne są te same fluorofory, jednakże sprzężone z białkami, które nie oddziałują ze sobą. Rycina 2A przedstawia widma fluorescencji dla układu, w którym znajduje się zarówno receptor D_1 , jak i podjednostka α_5 i w takim przypadku nie dochodzi do przeniesienia energii po wzbudzeniu donora

(CFP) – obecne jest maksimum emisji przy 475nm, natomiast nie pojawia się maksimum przy 535nm, które świadczyłoby o emisji fluorescencji przez akceptor (YFP). Z kolei z porównania widm na rycinie 2B można wnioskować, że faktycznie receptor dopaminowy D_2 oddziałuje z podjednostką α_5 (maksimum emisji przy 535 nm; krzywa szara), a nie oddziałuje z podjednostką α_5 (krzywa czarna).

Kolejną ważną kontrolę stanowi układ, w którym obydwa fluorofory przyłączone do białek oddziałujących ze sobą obecne są w badanej próbce, ale nie w tej samej komórce (jak to miało miejsce wyżej), lecz każdy z nich ulega syntezie w oddzielnej populacji komórek (które zostały zmieszane ze sobą bezpośrednio przed pomiarem). Widma przedstawione na rycinie 3 wskazują, iż zjawisko FRET nie zachodzi w zawieszynie dwóch populacji komórek, z których jedna posiada podjednostkę α_5 -CFP, druga zaś receptor dopaminowy D_1 -YFP (Ryc. 3A), ani w sytuacji obecności w osobnych populacjach komórek receptora D_2 -YFP i podjednostki α_5 -CFP (Ryc. 3B). Przy wzbudzeniu światłem o długości fali 434 nm w widmie obserwuje się maksimum emisji charakterystyczne jedynie dla CFP (mimo że w badanej próbce obecne były oba białka fluorescencyjne). Podobnie, dla wzbudzenia falą 475 nm można zaobserwować jedynie fluorescencję charakterystyczną dla YFP (Ryc. 3, krzywe czarne). Pomimo iż doświadczenia te jedynie potwierdzają znany fakt oddziaływania receptorów dopaminowych z właściwymi typami białek G, stanowią one doskonały przykład, pokazujący specyficzną zastosowanej metody badawczej.

Ponieważ w komórkach transfekowanych genami badanych białek uzyskuje się znacznie wyższą ekspresję niż w tkance natywnej, tego typu podejście badawcze bywa krytykowane. W warunkach takiej nadekspresji zjawisko FRET może zachodzić ze względu na niefizjologiczne zagęszczenie białek. Przytoczony powyżej przykład pokazuje jednak, że zjawisko to rzeczywiście monitoruje fizjologiczne oddziaływanie, gdyż w tym samym układzie ekspresyjnym przy takim samym „zagęszczeniu” dochodzi do fizycznego kontaktu molekuł tylko dla specyficznie oddziałujących białek.

Mimo niewątpliwiej zalety jaką jest łatwość wykonania pomiarów prowadzonych w zawieszynie komórek, w przypadku niskiej intensywności fluorescencji donora czy też akceptora czułość metody spektrofotometrycznej może być zbyt mała, aby zaobserwować różnicę w emisji donora w układzie z akceptorem i bez niego. Czynnikiem wpływającym na intensywność fluorescencji jest stężenie fluorofora w próbce, podczas gdy w pomiarach z komórkami transfekowanymi przejściowo nie zawsze możliwe jest dokładne określenie ilości donora i akceptora, silnie zależne od wydajności transfekcji oraz poziomu ekspresji genu białka receptorowego sprzęgniętego z FP.

MIKROSKOPIA KONFOKALNA

Mikroskop konfokalny pozwala na obserwację struktury komórki poprzez zogniskowanie wiązki laserowej o odpowiedniej długości fali w niewielkiej objętości pojedynczej warstwy preparatu, a następnie detekcję fluorescencji z tego

obszaru. Uzyskany w ten sposób obraz cechuje się wyższą rozdzielczością i lepszym kontrastem w porównaniu z obrazem otrzymanym w tradycyjnym mikroskopie fluorescencyjnym. Dodatkową zaletą mikroskopu konfokalnego jest możliwość rejestrowania obrazów cienkich warstw preparatu na różnej głębokości, a uzyskane przekroje optyczne pozwalają w efekcie na stworzenie trójwymiarowej projekcji badanego obiektu.

Wysoka jakość uzyskiwanych obrazów w połączeniu z możliwościami projekcji 3D stanowiły dotychczas główne zalety mikroskopu konfokalnego. Jednakże w ostatnich latach nastąpił olbrzymi postęp w dziedzinie mikroskopii konfokalnej i obecnie, w połączeniu z zaawansowanymi technikami analitycznymi, możliwa jest nie tylko wizualizacja molekuł w pojedynczej komórce, ale również pomiar odległości między oddziałującymi cząsteczkami, czy też ocena ruchliwości wyznakowanych białek w obrębie komórki. Techniki te opierają się głównie na możliwościach przeprowadzenia fotowysbielania (ang. *photobleaching*), czyli destrukcji fluoroforów przy pomocy wiązki światła laserowego o dużej intensywności absorbowanej przez ten fluorofor. Do technik, które najczęściej wykorzystuje się przy tego typu pomiarach z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego, należą m.in. FRAP (ang. *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) i FLIP (ang. *Fluorescence Loss In Photobleaching*) oraz, wspomniany wyżej, FRET [16-18].

Do oceny wydajności transferu energii przy użyciu mikroskopu konfokalnego, podobnie jak w przypadku stacjonarnej spektroskopii fluorescencyjnej, konieczne jest określenie intensywności fluorescencji donora w obecności i nieobecności akceptora. Mimo to pomiar wykonywany jest na pojedynczym preparacie zawierającym zarówno donora, jak i akceptor fluorescencji. Po określeniu intensywności fluorescencji donora w preparacie (D_{pre}), doprowadza się do fotowysbielania akceptora, po czym ponownie mierzy się intensywność fluorescencji donora (D_{post}). W tym przypadku, jeśli tylko zjawisko FRET zachodzi, intensywność fluorescencji donora powinna być większa, a wydajność transferu energii (E) określić można korzystając z zależności:

$$E = \frac{D_{post} - D_{pre}}{D_{post}} \quad (3)$$

Liczne opracowania wskazują jednak na pewne ograniczenia mikroskopii konfokalnej, wynikające m.in. z problemu fotobłaknięcia fluorofora, efektów fototoksycznych w komórce, czy autofluorescencji komórek [18-20]. Z kolei fluktuacje termiczne próbki i obiektu mogą stanowić źródło błędów przy pomiarach ilościowych. Mimo że skaningowy mikroskop konfokalny pozwala na badanie cienkich przekrojów preparatu i zapewnia wysoką jakość otrzymanego obrazu, to przy tego typu pomiarach nakładanie się widm emisyjnych CFP i YFP staje się problemem technicznym znacznie utrudniającym interpretację wyników (tzw. efekt *spectral bleed-through*). Przy wzbudzeniu białka CFP (donora), wzbudza się także akceptor YFP, w konsekwencji fluorescencja akceptora (YFP) może być nie tylko wynikiem FRET, ale też bezpośredniego wzbudzenia YFP. Dodatkowo, niewielka część fluorescencji zbieranej w zakresie emisji akceptora pochodzi od emisji donora (tzw. efekt *cross-talk*).

Wysokie stężenie akceptora skutkować może jeszcze jednym niekorzystnym efektem – tzw. efektem filtra wewnętrznego, gdzie chromofor ten, absorbując promieniowanie charakterystyczne dla akceptora, zmniejsza obserwowane dla niego natężenie emisji fluorescencji [20].

Jednakże – mimo różnych zastrzeżeń – mikroskopia konfokalna jest obecnie szeroko stosowana nie tylko w celu wizualizacji białek, ale również w badaniach ich oligomeryzacji. Zwłaszcza, że technika ta umożliwia obrazowanie zarówno na utrwalonych preparatach komórek oraz tkanek wyznakowanych znacznikami fluorescencyjnymi, jak i obserwacje przyżyciowe. Odpowiednio dobrane zestawy filtrów pozwalają ograniczać niekorzystne efekty, ponadto przy interpretacji otrzymanych wyników stosuje się odpowiednie modele matematyczne i algorytmy „rozplątujące” sygnał od poszczególnych fluoroforów [21]. Wykorzystanie do wzbudzeń promieniowania z bliskiej podczerwieni, jak to ma miejsce w przypadku metody wzbudzenia wielofotonowego, pozwala na zmniejszenie szkodliwego wpływu promieniowania na komórki w porównaniu z klasyczną metodą jednofotonową opartą o promieniowanie UV [17].

MIKROSKOPIA CZASÓW ŻYCIA FLUORESCENCJI

Mikroskopia czasów życia fluorescencji FLM (ang. *Fluorescence Lifetime Microscopy*) jest niezwykle czułą metodą, która pozwala badać oddziaływania między cząsteczkami zachodzące w pojedynczych, żywych komórkach. Fluorescencja znaczników charakteryzowana jest nie tylko przez intensywność emisji fluorescencji, ale również przez charakterystyczny czas jej życia. Jest on definiowany jako czas, w którym intensywność fluorescencji zmniejsza się e -krotnie (ok. 2,72 razy) i dla większości związków wykorzystywanych w badaniach biologicznych jest rzędu nanosekund [22]. Czas życia fluorescencji nie zależy od stężenia fluorofora oraz długości drogi optycznej, co stanowi niewątpliwą zaletę w porównaniu z metodami opartymi na pomiarach intensywności fluorescencji [22]. Z drugiej strony, czas ten ulega skróceniu, gdy w jego otoczeniu znajdzie się akceptor fluorescencji, dlatego też poprzez pomiar zmian czasu życia fluorescencji donora w obecności akceptora można śledzić proces przeniesienia energii.

Czasy życia fluorescencji można mierzyć w oparciu o technikę fazową, polegającą na wzbudzaniu próbki światłem ciągłym o modulowanej intensywności, lub też techniką pojedynczego zliczania fotonów TCSPC (ang. *Time-Correlated Single Photon Counting*). W drugiej z wymienionych technik, po wzbudzeniu fluorescencji impulsową wiązką światła (obecnie często jest to impulsowa dioda laserowa), rejestruje się zanik fluorescencji w czasie, $I(t)$. Zanik taki ma charakter mono- lub multi-ekspotencjalny, opisany zależnością:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad (4)$$

gdzie: α_i – składowa amplituda dla czasu $t=0$, τ_i – składowa czasu życia fluorescencji.

Na podstawie uzyskanych wyników obliczany jest średni czas życia fluorescencji:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum \alpha_i \tau_i^2}{\sum \alpha_i \tau_i} \quad (5)$$

Wydajność FRET liczona ze średnich czasów życia donora w nieobecności (τ_D) oraz w obecności akceptora (τ_{DA}) wynosi:

$$\langle E \rangle = 1 - \frac{\langle \tau_{DA} \rangle}{\langle \tau_D \rangle} \quad (6)$$

Pomiary FRET przy użyciu metody TCSPC pozwalają na obserwację oddziaływań receptorów w pojedynczych komórkach. Wykorzystując pomiary czasów życia fluorescencji, potwierdzono heterooligomeryzację receptorów dopaminowych w komórkach HEK293 kotransfekowanych plazmidami D₁-YFP oraz D₂-CFP [23] oraz homo- i heterooligomeryzację receptorów: adenozynowego A_{2A} oraz serotoninowego 5HT_{1A} [24], a co równie ważne – pokazano i oszacowano wpływ niektórych ligandów na ten proces.

Interpretacja zmian czasów życia fluorescencji donora, jako obraz zmian efektywności zjawiska FRET towarzyszącego tworzeniu oligomerów receptorów sprzężonych z białkami fluorescencyjnymi po związaniu liganda, spotyka się czasami z pewną krytyką. Postuluje się bowiem niekiedy, że obserwowane efekty mogą być wynikiem zmian konformacyjnych zachodzących w obrębie białka fuzyjnego receptor-FP, a pochodzenie tych zmian może być dwojakiego rodzaju. Po pierwsze, zmiany konformacyjne zachodzące w obrębie receptora po związaniu liganda, mogą propagować na białko fluorescencyjne, powodując zmianę wydajności kwantowej jego fluorescencji. Tym samym obserwowana zmiana czasu życia fluorescencji donora może być niezależna od bliskiej obecności akceptora. Po drugie, te same zmiany konformacyjne mogą powodować zmianę odległości pary donor-akceptor i także prowadzić do zmiany czasu życia fluorescencji donora, niezależnie od stopnia oligomeryzacji receptorów.

Badając wpływ ligandów na proces oligomeryzacji receptorów, należy zatem najpierw przeprowadzić pomiar czasu życia fluorescencji donora w ich obecności, bez akceptora. Gdy uzyskane wartości są równe tym, które mierzy się dla donora bez obecności liganda, oznacza to, iż obserwowana zmiana czasu życia fluorescencji donora w obecności akceptora nie jest spowodowana zmianami wydajności kwantowej donora wywołanymi przez przyłączenie się liganda do receptora, a jest wynikiem wpływu liganda na proces oligomeryzacji receptorów.

Druga ewentualność niepoprawnej interpretacji uzyskiwanych wyników byłaby możliwa, gdyby zmiany konformacyjne zachodzące w obrębie C-końcowej pętli receptora, do której przyłączone jest FP, były wystarczająco duże, aby zmienić wydajność przeniesienia energii. I tak np. dla pary receptorów dopaminowych D₁-D₂ wyznaczono wydajność przeniesienia energii na 3,73% [23] – biorąc pod uwagę tę wartość oraz znając odległość Förstera dla pary ECFP-EYFP (4,9 nm) i korzystając z zależności 1, można oszacować, iż odległość donor-akceptor w nieobecności liganda wynosiłaby 8,42 nm.

W tym przypadku spodziewaną zmianę przeniesienia energii (ΔE) wywołaną zmianą konformacyjną można z kolei oszacować, korzystając ze wzoru:

$$\Delta E = \frac{6r^5}{[1 + (r/R)^6]^2 R_0^6} \Delta r \quad (7)$$

Szacowana zmiana ΔE bezpośrednio zależy od wielkości zmian konformacyjnych, które dla szeregu receptorów wynoszą typowo ok. 0,1 nm i nie stwierdzono, aby były większe niż 0,2 nm [25,26]. Przyjmując wartość maksymalną, obliczona zmiana przeniesienia energii towarzysząca temu procesowi wynosiłaby 0,51%. Jest to wartość znacznie mniejsza niż uzyskiwana zwykle w badaniach oligomeryzacji receptorów, dlatego też można sądzić, iż to nie zmiany konformacyjne w obrębie receptorów po związaniu ligandów są źródłem obserwowanych zmian wydajności przeniesienia energii.

Mikroskopia czasów życia fluorescencji jest zatem bardzo cennym narzędziem badawczym, aczkolwiek wymaga użycia kosztownej i zaawansowanej technicznie aparatury. Pomimo całej gamy zalet wyżej wymienionej techniki, należy jednak pamiętać, iż metoda ta wykorzystywana do pomiarów *in vivo* wymaga niezwykle restrykcyjnych warunków, m.in. stałej temperatury i stabilnego źródła światła.

PODSUMOWANIE

Wszystkie trzy przedstawione techniki stosowane w pomiarach zjawiska FRET są wysoce precyzyjne, trzeba jednak być świadomym słabszych stron każdej z nich i eliminować je poprzez odpowiedni dobór warunków doświadczenia. Mikroskopia czasów życia fluorescencji wydaje się najbardziej wiarygodna w badaniach wydajności FRET, przede wszystkim z powodu niezależności czasu życia fluorescencji od stężenia fluoroforów, co znacznie ułatwia analizę uzyskanych rezultatów. Należy jednak zauważyć, że w wielu przypadkach zarówno stacjonarna spektroskopia fluorescencji, mikroskopia czasów życia fluorescencji, jak i mikroskopia konfokalna uzupełniają się i przy uważnym zaplanowaniu doświadczeń – potwierdzają wyniki uzyskane za pomocą każdej z tych metod z osobna. Należy zaznaczyć, że opisane badania mogą być prowadzone w układach modelowych *in vitro*, ale często stanowią uzupełnienie, a niejednokrotnie i wyjaśnienie wyników uzyskanych innymi technikami stosowanymi *ex vivo* lub *in vivo*.

Badania oligomeryzacji receptorów prowadzone *in vitro* mają jeszcze dodatkową zaletę – sprzęgając badane receptory z białkami fluorescencyjnymi, można równocześnie dokonywać mutacji punktowych w obrębie tych receptorów. Mutacje te można wprowadzać w celu identyfikacji reszt aminokwasowych biorących udział w samym procesie oligomeryzacji, albo też wprowadzać zmiany w tych miejscach, które znane są jako tzw. polimorfizmy receptorów (tym samym określić osobnicze różnice w funkcjonowaniu receptorów). Ponieważ często określone polimorfizmy zależne są od większej podatności na występowanie danego schorzenia (jak np. polimorfizmy w obrębie części kodującej receptor dopaminowy D₂ – z podatnością na schizofrenię czy uzależnienia [27]) lub odmienną wrażliwością na terapię, dlatego też wydaje się, że badanie wpływu tych polimorfizmów na oligomeryzację receptorów może pomóc w zrozumieniu mechanizmów tych zjawisk. W efekcie może przyczynić się wkrótce do opracowania nowoczesnych, bardzo specyficznych czynników terapeutycznych, które będą działać poprzez stymulację bądź hamowanie po-

wstawania heterooligomerów w obrębie określonych receptorów błonowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Milligan G (2008) A day in the life of a G protein-coupled receptor: the contribution to function of G protein-coupled receptor dimerization. *Br J Pharmacol* 153: 216-229
2. Kroeger KM, Pflieger KD, Eidne KA (2004) G-protein coupled receptor oligomerization in neuroendocrine pathways. *Front Neuroendocrinol* 24: 254-278
3. Fuxe K, Marcellino D, Rivera A, Diaz-Cabiale Z, Filip M, Gago B, Roberts DC, Langel U, Genedani S, Ferraro L, de la Calle A, Narvaez J, Tanganelli S, Woods A, Agnati LF (2008) Receptor-receptor interactions within receptor mosaics. Impact on neuropsychopharmacology. *Brain Res Rev* 58: 415-52
4. Pflieger KD, Eidne KA (2005) Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem J* 385: 625-637
5. Waldhoer M, Fong J, Jones RM, Lunzer MM, Sharma Sk, Kostenis E, Portoghese PS, Whistler JL (2005) A heterodimer-selective agonist shows *in vivo* relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9050-9055
6. Scarselli M, Novi F, Schallmach E, Liu R, Baragli A, Colzi A, Griffon N, Corsini GU, Sokoloff P, Levenson R, Vogel Z, Maggio R (2001) D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *J Biol Chem* 276: 30308-30314
7. Lee SP, So CH, Rashid AJ, Varghese G, Cheng R, Lança AJ, O'Dowd BF, George SR (2004) Dopamine D1 and D2 receptor co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem* 279: 35671-35678
8. Milligan G (2004) Applications of bioluminescence – and fluorescence resonance energy transfer to drug discovery at G protein-coupled receptors. *Eur J Pharmacol* 51: 397-405
9. Shimomura O (1995) A short story of Aequorin. *Biol Bull* 189: 1-5
10. Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2: 905-909
11. Eriksson MG, Moon DL, Yue DT (2003) Ds-Red as a potential FRET partner with CFP and GFP. *Biophys J* 85: 599-611
12. Karasawa S, Araki T, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A (2004) Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *Biochem J* 381: 307-312
13. Elsliger MA, Wachter RM, Hanson GT, Kallio K, Remington SJ (1999) Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. *Biochemistry* 38: 5296-5301
14. Griesbeck O, Baird GS, Campbell RE, Zacharias DA, Tsien RY (2001) Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. *Mechanism and Applications. J Biol Chem* 276: 29188-29194
15. Jayaraman S, Haggis P, Wachter RM, Remington SJ, Verkman AS (2000) Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor. *J Biol Chem* 275: 6047-6050
16. Marullo S, Bouvier M (2007) Resonance energy transfer approaches in molecular pharmacology and beyond. *Trends Pharmacol Sci* 28: 362-365
17. Duncan R (2006) Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to quantify protein-protein interactions inside cells. *Biochem Soc Trans* 34: 679-682
18. Dobrucki JW (2004) Confocal Microscopy: Quantitative Analytical Capabilities. *Methods Cell Biol* 75: 41-72
19. Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Ann Rev Biochem* 76: 509-538
20. Piston DW, Rizzo MA, Springer G, Segawa K (2005) Quantitative imaging of fluorescent protein FRET. *Microsc Microanal* 11: 270-271
21. Berney C, Danuser G (2003) FRET or No FRET: A Quantitative Comparison. *Biophys J* 84: 3992-4010
22. Lakowicz JR (1999) Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd edition, Plenum Press, New York
23. Dziedzicka-Wasylewska M, Faron-Górecka A, Andrecka J, Polit A, Kuśmider M, Wasylewski Z (2004) Fluorescence studies reveal heterodimerization of dopamine D1 and D2 receptors in the plasma membrane. *Biochemistry* 45: 8751-8759
24. Łukasiewicz S, Błasiak E, Faron-Górecka A, Polit A, Tworzydło M, Górecki A, Wasylewski Z, Dziedzicka-Wasylewska M (2007) Fluorescence studies of homooligomerization of adenosine A_{2A} and serotonin 5HT_{1A} receptors reveal the specificity of receptor interactions in the plasma membrane. *Pharmacological Reports* 59: 379-392
25. Garnier S, Kim S, Shafer AM, Ratnala VR, Fung JJ, Zare RN, Kobilka B (2007) Structure and conformational changes in the C-terminal domain of the beta2-adrenoceptor: insights from fluorescence resonance energy transfer studies. *J Biol Chem* 282: 12895-13905
26. Hoffman C, Gaietta G, Bünemann M, Adams SR, Oberdorff-Maass S, Behr B, Vilaradaga JP, Tsien RY, Ellisman MH, Lohse MJ (2005) A FRET-based approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods* 2: 171-176
27. Wong AHC, Buckle CE, Van Tol HHM (2000) Polymorphisms in dopamine receptors: what do they tell us? *Eur J Pharmacol* 410: 183-203

Fluorescence studies of G-protein coupled receptors oligomerization

Katarzyna Grymek^{1,2}, Magdalena Gaska¹, Sylwia Łukasiewicz³, Andrzej Górecki³, Marta Dziedzicka-Wasylewska^{1,3,*}

¹Department of Pharmacology, Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences, 12 Smętna St., 31-343 Krakow, Poland

²Faculty of Physics and Applied Computer Science, University of Science and Technology, 30 Mickiewicza Al., 30-059 Krakow, Poland

³Department of Physical Biochemistry, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, 7 Gronostajowa St., 30-387 Krakow, Poland

*e-mail: wasyl@mol.uj.edu.pl

Key words: GPCR, receptor oligomerization, FRET, fluorescent protein, fluorescence methods

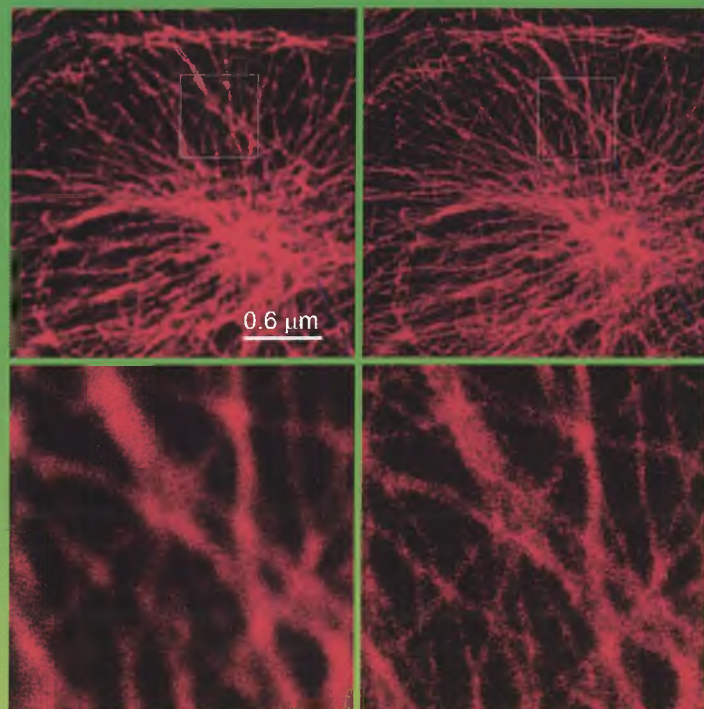
ABSTRACT

Fluorescence methods based on the resonance energy transfer phenomenon are currently extensively used to study biological processes, particularly interactions of G-protein coupled receptors. The development of molecular engineering has made it feasible to produce fluorescently tagged fusion proteins, which constitute a model system for studies of receptors oligomerization. It is widely accepted, that physical interactions between receptors might be of great importance for development of potential therapeutic factors, which influence signal transduction across the membrane. Here, we report on a variety of fluorescence approaches commonly used to investigate receptors oligomerization. Comparative studies reveal that even a relatively simple method, such as steady-state fluorescence spectroscopy could be useful in verifying receptor interactions. However, more sophisticated techniques as confocal microscopy and fluorescence lifetime microscopy not only provide quantifiable data of high relevance but also allow observations of dynamic processes in complex biological systems.

Kilkuletnie starania o pozyskanie środków finansowych z funduszy strukturalnych UE w okresie 2004-2006 zakończyły się wielkim sukcesem **Centrum Zaawansowanych Technologii „Biotechnologii, Informatyki Stosowanej i Medycyny - Kampus Ochota”**. W ramach projektu **Wyposażenie Laboratorium Obrazowania Biologicznego i Medycznego**, koordynowanego przez Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, a realizowanego wspólnie z Akademią Medyczną i Uniwersytetem Warszawskim, zrealizowane zostaną inwestycje aparaturowe o wartości ponad 15 milionów złotych. Jest to największy tego typu projekt realizowany w ramach SPO WKP 1.4 w Polsce.

konwencjonalny mikroskop
konfokalny

mikroskop konfokalny
z systemem STED



mikrotubule w komórce nabłonkowej wyznakowane przeciwciałami skoniugowanymi z barwnikiem Atto 647

W ramach projektu zostanie m.in. zakupiony nowoczesny mikroskop konfokalny wyposażony w unikatową technikę STED (ang. *stimulated emission-depletion*) (Leica), pozwalającą na obserwacje z rozdzielczością 90 nm, tzn. 2.5 raza lepszą niż tzw. limit Abbego - wartość od ponad 100 lat uznawana za nieprzekraczalną. Ten przełomowy wynalazek jest dziełem niemieckiego naukowca, Prof. Stefana Hella, pioniera mikroskopii „superrozdzielczej”. Urządzenie, które zostanie zakupione przez Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, jest jednym z pierwszych na świecie. Mikroskop będzie przystosowany do prowadzenia badań przyżyciowych, obrazowania grubych preparatów ($> 200 \mu\text{m}$) oraz badań z zastosowaniem technik FRET i FRAP.

W ramach projektu zostaną również zakupione:

- zestaw do badań metodą Tomografii Rezonansu Magnetycznego: pierwszy w Polsce system MRI wykorzystujący 32-kanalową technologię RF
- mikroskop elektronowy transmisyjny z systemem umożliwiającym obrazowanie rozkładu pierwiastków w preparacie biologicznym
- stanowisko umożliwiające archiwizację danych obrazowych w formie cyfrowej oraz zaawansowane przetwarzanie informacji wizualnej w rozproszonym systemie gridowym



UNIA DLA PRZEDSIĘBIORCZYCH

PROGRAM KONKURENCYJNOŚĆ



Projekt współfinansowany przez
UNIĘ EUROPEJSKĄ
ze środków
Europejskiego Funduszu
Rozwoju Regionalnego

bim
CZT
KAMPUS - OCHOTA

<http://rcin.org.pl>

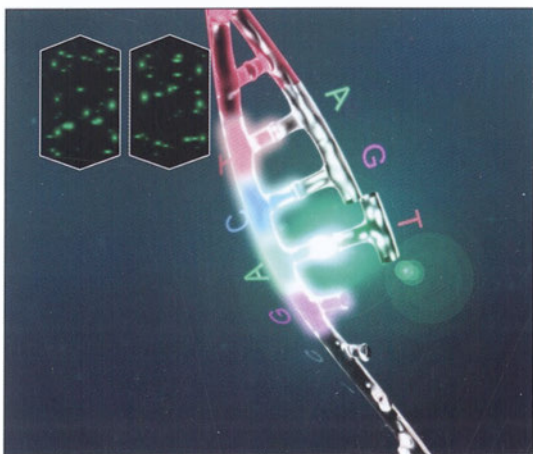


www.roche-applied-science.com



System Genome Sequencer FLX

Dłuższe odczyty sekwencjonowania to więcej aplikacji



Sekwencjonowanie poprzez syntezę: używając enzymatycznej reakcji, gdy pojedynczy nukleotyd zostaje wbudowany generowany jest sygnał świetlny. Setki tysięcy pojedynczych fragmentów DNA jest sekwencjonowanych jednocześnie.

Rok 2005, premiera systemu Genome Sequencer 20

- Długość odczytu: 100 par zasad
- 20 milionów par zasad w mniej niż 5 godzin

Rok 2007, premiera systemu Genome Sequencer FLX

- Długość odczytu: 250–300 par zasad
- 100 milionów par zasad w mniej niż 8 godzin

Rok 2008, udoskonalenie odczynników do systemu Genome Sequencer FLX

- Długość odczytu: >400 par zasad
- 1 miliard par zasad w mniej niż 24 godziny

Więcej aplikacji to więcej publikacji

Udowodnione działanie na podstawie rosnącej listy aplikacji oraz ponad 200 dostępnych publikacji.

Dowiedz się więcej na stronie www.genome-sequencing.com

Usługa sekwencjonowania z użyciem aparatu Genome Sequencer FLX jest już dostępna w Polsce. Więcej szczegółów na stronie www.oligo.pl lub telefonicznie 022 592 24 19.

454
SEQUENCING

For life science research only. Not for use in diagnostic procedures.

454 and 454 SEQUENCING are trademarks of Roche.

© 2008 Roche Diagnostics GmbH. All rights reserved

<http://rcin.org.pl>

Roche Diagnostics Polska sp. z o.o.
01-531 Warszawa
Ul. Wybrzeże Gdynskie 6B
Tel. 022 481-55-67
Fax 022 481-55-92
biologia.molekularna@roche.com

