

POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2006
TOM 52
NUMER 4

Wędrowniki receptorów jonotropowych
Pierwsza dekada ery genomicznej
Ścieżki sygnalizacyjne czynników wzrostu TGF- β



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

www.postepybiochemii.pl

<http://rcm.org.pl>

NucliSENS™ System

Przełom w ekstrakcji kwasów nukleinowych



NucliSENS™
— easyMAG



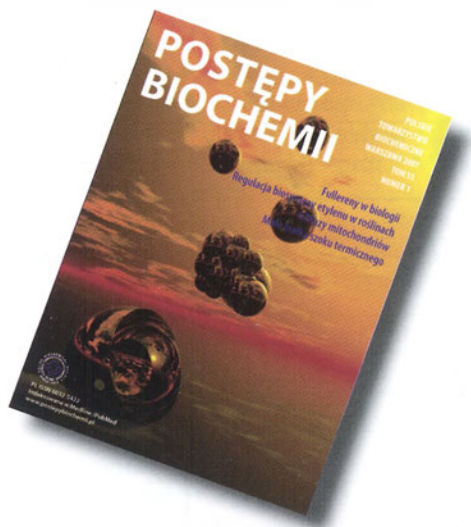
NucliSENS™
— miniMAG

Ekstrakcja NucliSENS

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



B I O M É R I E U X



W NASTĘPNYM NUMERZE:

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Regulacja biosyntezy etylenu w roślinach

Kamil Frankowski, Jacek Kęsy, Jan Kopcewicz

GTPazy mitochondriów

Patrycja Pawlikowska, Arkadiusz Orzechowski

Małe białka szoku termicznego

Ewa Laskowska

SPROSTOWANIE

W artykule „Receptory opioidowe i ich selektywne ligandy peptydowe”, opublikowanym w Postęпах Biochemii, tom 52, zeszyt 3 (2006), na stronie 313, w nazwisku jednego z autorów, Pana Jakuba Fichny, wkraść się błąd, za co redakcja serdecznie przeprosza.

Rysunek na okładce:

Front cover image „Synapse” by David K. Anderson, <http://www.kankada.com/>, with permission.

WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

Rozstrzygnięcie konkursu DOKTORATY 2005	339
Wiadomości krajowe pod red. Teresy Wesołowskiej	344
100-lecie Journal of Biological Chemistry Włodzimierz Zagórski-Ostoją, Tadeusz Chojnacki	349

TEMAT NUMERU – SZLAKI PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW W KOMÓRCIE

Wędrowniki receptorów jonotropowych – do synapsy i z powrotem Dorota Nowicka	351
Ścieżki sygnalizacyjne rodziny transformujących czynników wzrostowych typu β Małgorzata Zimowska	360
Szlaki sygnałowe hormonu wzrostu Sławomir Zych, Iwona Szatkowska, Ewa Czerniawska-Piątkowska	367
Rola kanałów jonowych w procesie apoptozy Zofia Józwiak, Agnieszka Marczak	373
Pleiotropowy efekt fosforylacji białek wiążących RNA bogatych w serynę i argininę Agnieszka Piekielko-Witkowska	383

TEMAT NUMERU – DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA

Degradacja mRNA niosących przedwczesny kodon stop (NMD) – na straży jakości mRNA Agnieszka Dzikiewicz, Zofia Szwejkowska-Kulińska	390
Wirus zapalenia wątroby typu C – budowa i replikacja a możliwości terapeutyczne i zjawisko oporności Arleta Kowala-Piaskowska	399
Molekularne metody diagnostyki i oceny efektywności terapii we współczesnej hematologii pediatricznej Małgorzata Dawidowska, Jacek Wachowiak, Michał Witt	408
Rola tiolaktonu homocysteiny w niektórych chorobach człowieka Marta Sikora, Tomasz Twardowski, Hieronim Jakubowski	417
Immunoproteomika <i>Helicobacter pylori</i> – zastosowanie w diagnostyce i profilaktyce Paula Roszczenko, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka	424

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Pierwsza dekada ery genomicznej – przegląd metod stosowanych w poszukiwaniu funkcji genów drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Adrianna Skoneczna	435
Produkcja rekombinowanych białek w <i>Escherichia coli</i> – artykuł sponsorowany przez firmę MERCK Sp. z o.o. Przemysław Nuc, Katarzyna Nuc	448



REVIEWS

Inotropic glutamate receptor trafficking – there and back again	351
Signaling pathways of transforming growth factor β family members	360
Growth hormone signaling pathways	367
The role of ion channels in apoptosis	373
Phosphorylation of serine-arginine rich proteins – pleiotropic effect of one type posttranslational modification	383
Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) – on guard of mRNA quality	390
Hepatitis C virus – structure, replication and therapeutical opportunities and the phenomenon of resistance	399
Molecular methods for diagnostics and assessment of treatment effectiveness in modern pediatric hematocology	408
The role of homocysteine thiolactone in some human diseases	417
Immunoproteomics of <i>Helicobacter pylori</i> – strategy for improvement of diagnostic tests and vaccine development	424
Decade of genomics – methods for genome investigation in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	435
Recombinant protein production in <i>Escherichia coli</i>	448

KILKA SŁÓW OD REDAKTORA

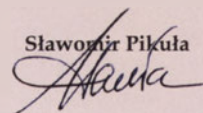
Szanowni Państwo,

Ostatni numer kwartalnika „Postępy Biochemii” w tym roku jest numerem specjalnym, poświęconym przede wszystkim dwóm zagadnieniom: szlakom przekazywania sygnałów w komórce i diagnostyce molekularnej. Jeśli tematyka pierwszej z wymienionych grup artykułów, nie jest tak na prawdę niczym wyjątkowym, omawia bowiem zagadnienia często goszczące na łamach naszego czasopisma, tak druga tematyka stanowi prawdziwy ewenement. W numerze 4 zamieściliśmy artykuły z pogranicza biochemii, biologii molekularnej i medycyny, poświęcone zarówno metodom diagnostyki, strategiom terapeutycznym, jak i molekularnym mechanizmom powstawania określonych patologii. Przewiduję, że tematyka ta na stałe zagości na łamach naszego kwartalnika. Pozostałą część zeszytu zajmują dwa bardzo interesujące artykuły przeglądowe, poświęcone zagadnieniom metodycznym. Druk jednego z tych artykułów, na temat syntezy rekombinowanych białek w komórkach bakterii, wart jest odnotowania nie tylko z uwagi na interesującą zawartość, ale i na nowy fakt w naszej praktyce wydawniczej, mianowicie taki, że druk artykułu jest sponsorowany przez firmę MERCK Sp. z o.o., której kierownictwu pragnę wyrazić podziękowanie za wspieranie działalności wydawniczej Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Jak zwykle, część wstępna czasopisma – kolorowe strony, poświęcona jest wydarzeniom wartym odnotowania, wśród nich opisującym działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, i mam nadzieję, że lektura tej części żywo Państwa zainteresuje.

Druk czwartego numeru czasopisma jak co roku zbiega się z okresem świątecznym i z tej okazji Czytelnikom, Autorom, Recenzentom i Członkom Redakcji życzę zdrowych i spokojnych Świąt, a w Nowym Roku wielu sukcesów w życiu zawodowym i osobistym.

Dziękuję za uwagę i zapraszam jak zwykle do lektury naszego czasopisma oraz do częstego odwiedzania naszej strony internetowej pod adresem www.postepybiochemii.pl.

Sławomir Pikula



PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII

OLYMPUS

Your Vision, Our Future



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

Redaktor działu krajowego: Teresa Wesółowska; 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 Dzugaj, Krystyna Grzelak, Lilla Hryniewiecka, Danuta Hulanička, Andrzej Jerzmanowski, Andrzej Kasprzak, Wanda Kłopotka, Liliana Konarska, Paweł Pomorski, Aleksander F. Sikorski, Anna Szakiel, Adam Szewczyk, Tomasz Twardowski, Marek Zembala, Krzysztof Zablocki, Alicja Żylicz

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

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

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

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

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

Rozstrzygnięcie konkursu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i firmy MERCK sp. z o.o. na najlepszą pracę doktorską z biochemii w 2005 roku

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, na podstawie opinii komisji w składzie: prof. Tadeusz Chojnacki, prof. Mieczysław Chorąży, prof. Andrzej Dżugaj, prof. Teresa Jakubowicz, prof. Piotr Laidler i prof. Sławomir Pikula (przewodniczący), ogłasza, że wśród zgłoszonych na konkurs prac doktorskich nagrodę w wysokości 4 000 zł otrzymuje **Pani dr Małgorzata Rzychoń** za pracę doktorską pt.: „Stafostatyna B: nowy typ inhibitora proteinaz cysteinowych” wykonaną w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Dubina oraz w Laboratorium Biologii Strukturalnej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie pod kierunkiem dr Matthiasa Bochtlera.



cialność: chemia biologiczna) za pracę pt. „Biochemiczna charakterystyka proteiny cysteinowej *Staphylococcus epidermidis*”, wykonaną w Instytucie Biologii Molekularnej UJ pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Dubina. W 2001 roku została przyjęta na Studia Doktoranckie Biochemii i Biofizyki na Wydziale Biotechnologii UJ. Odbyła dwa staże naukowe: trzymiesięczny na Wydziale Chemii Klinicznej Uniwersytetu w Lund w Szwecji w ramach programu TEMPUS oraz roczny w Laboratorium Biologii Strukturalnej Międzynarodowego Instytutu

Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. W latach 2004–2005 była stypendystką Fundacji na rzecz Nauki Polskiej. Pracę doktorską pt.: „Stafostatyna B: nowy typ inhibitora proteinaz cysteinowych” wykonała w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Dubina oraz w Laboratorium Biologii Strukturalnej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie pod kierunkiem dr Matthiasa Bochtlera. Obrona rozprawy doktorskiej odbyła się 11.10.2005 r. Praca doktorska Małgorzaty Rzychoń została wyróżniona przez Radę Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz uzyskała nagrodę indywidualną Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Małgorzata Rzychoń jest współautorką siedmiu prac w czasopismach międzynarodowych, m.in. w *Biological Chemistry*, *Molecular Microbiology*, *Journal of Biological Chemistry* i *Protein Science*, z których praca w *Biol Chem* 2001, 382: 1575-1582 została wyróżniona nagrodą firmy Merck Sp. z o.o. Obec-

nie Pani doktor Małgorzata Rzychoń jest asystentem w Zakładzie Genetyki Molekularnej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w zespole dr hab. Alicji Ziemenowicz. Bierze udział w projekcie badawczym dotyczącym transformacji genetycznej komórek ssaków za pomocą T-DNA *Agrobacterium tumefaciens*, badaniach porównawczych wektorów wirusowych i plazmidowego DNA. Małgorzata Rzychoń zajmuje się również pracą dydaktyczną. Prowadzi ćwiczenia i seminaria z inżynierii genetycznej oraz genetyki molekularnej dla studentów II i III roku biologii i biotechnologii.

Stafostatyna B: nowy typ inhibitora proteinaz cysteinowych – streszczenie pracy Małgorzata Rzychoń

☐ Zakład Genetyki Molekularnej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; e-mail: mrzychon@mol.uj.edu.pl, malgosiarz@poczta.onet.pl, tel.: (012) 664 63 76

Kontrola procesów proteolitycznych, niezbędna do prawidłowego funkcjonowania komórek i całych organizmów, zachodzi na wielu poziomach, od regulacji ekspresji, wydzielania i aktywacji pro-proteinaz, poprzez specyficzne degradowanie dojrzałych enzymów, aż do blokowania ich aktywności na drodze hamowania. Ze względu na możliwość zastosowania specyficznych inhibitorów proteinaz do celów terapeutycznych, szczególnie wiele uwagi poświęca się badaniom mechanizmów leżących u podstaw procesu hamowania.

Praca opisuje badania, które doprowadziły do zidentyfikowania nowej grupy inhibitorów proteinaz cyste-

Prof. Lech Wojtczak

Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Prof. Sławomir Pikula

Sekretarz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

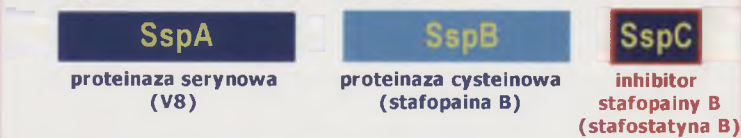
Białystok, 12.09.2006 r.

Wręczenie nagrody odbyło się 26 października 2006 roku w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego w Warszawie.

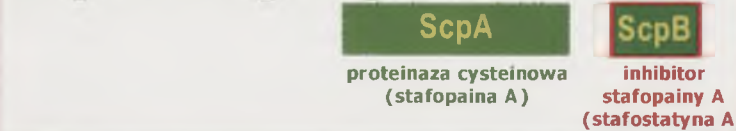
SYLWETKA MAŁGORZATY RZYCHOŃ

Małgorzata Rzychoń ukończyła Studia Matematyczno-Przyrodnicze na Uniwersytecie Jagiellońskim uzyskując stopień magistra chemii (spe-

operon proteiny serynowej
(ang. *staphylococcus serine protease - ssp*):



operon proteiny cysteinowej
(ang. *staphylococcus cysteine protease - scp*):



Rycina 1. Schemat organizacji operonu proteiny serynowej (*sspABC*) i operonu proteiny cysteinowej (*scpAB*) u *S. aureus*. Gen *sspB* kodujący stafopainę B stanowi element operonu *sspABC*, w którym gen *sspA* koduje proteinazę V8, a gen *sspC* koduje białko, którego funkcja nie była znana w chwili rozpoczęcia opisywanych tu badań. Podobnie, gen *scpA* kodujący stafopainę A zlokalizowany jest w operonie *scpAB* wspólnie z genem *scpB*, również kodującym białko o funkcji nieznaną w chwili rozpoczęcia opisywanych tu badań (Rice i wsp. 2001, Karlsson i Arvidson 2002, Shaw i wsp. 2004).

inowych. Nazwano je stafostatynami, gdyż posiadają zdolność specyficznego hamowania stafopain – enzymów papaino-podobnych produkowanych zewnątrzkomórkowo przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, uważanych za jedne z czynników chorobotwórczości tych bakterii. Są to pierwsze wielkocząsteczkowe inhibitory proteinaz cysteinowych, jakie zostały opisane i scharakteryzowane u organizmów prokariotycznych.

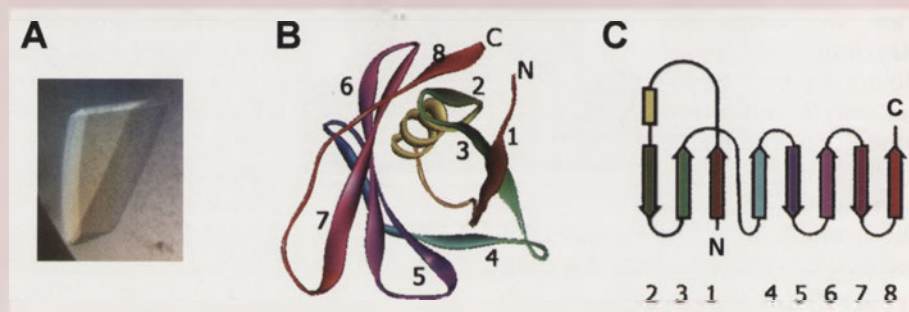
Pierwszym etapem pracy było otrzymanie w komórkach *E. coli*, oczyszczenie i określenie funkcji nieznanych wcześniej białek ScpB

i SspC, kodowanych przez geny znajdujące się bezpośrednio za genami strukturalnymi stafopain, odpowiednio, A i B (Ryc. 1). Okazało się, że obydwa białka są bardzo specyficznymi inhibitorami stafopain (białko ScpB, stafostatyna A, hamuje

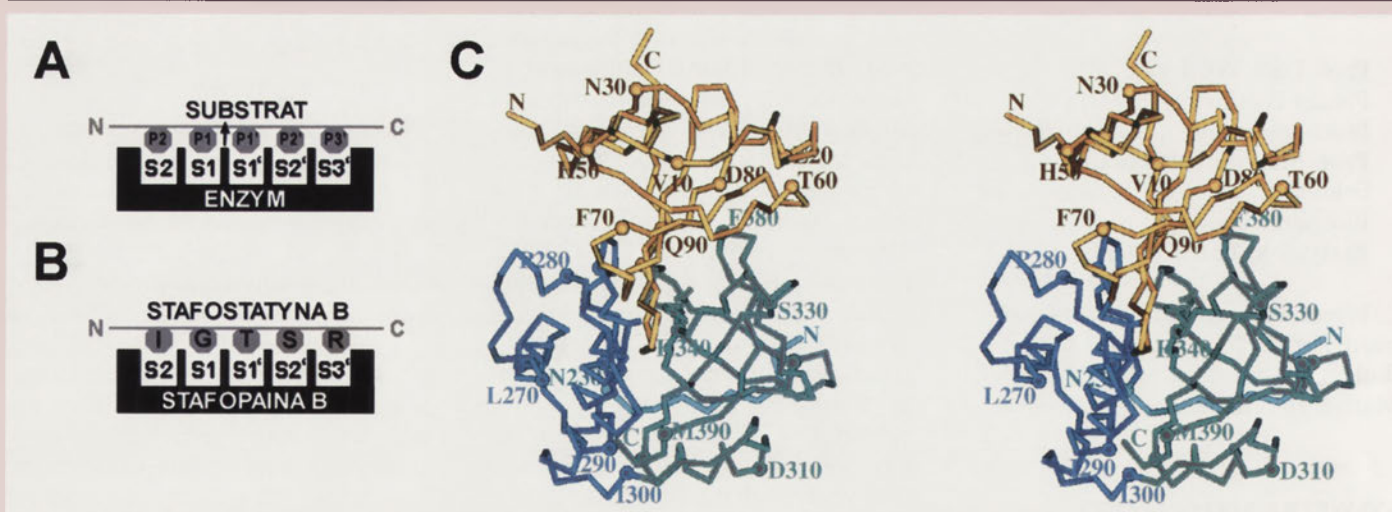
Stafostatyna B, jest inhibitorem stafopainy B, nie hamując przy tym aktywności stafopainy A).

Dalsze badania pozwoliły na potwierdzenie istnienia odpowiednich kompleksów enzym-inhibitor, ustalenie ich niekowalencyjnego charakteru, określenie stechiometrii wiązania białek jako 1:1 oraz wykazanie, że w procesie przyłączenia inhibitora zablokowane zostaje miejsce aktywne proteiny. Stwierdzono ponadto, że stafostatyna B jest obecna wyłącznie we frakcji cytoplazmatycznej komórek *S. aureus*. Stafostatyny prawdopodobnie pełnią funkcję tzw. inhibitorów progowych, tworzących rezerwowy system ochrony przed procesami proteolitycznymi mogącymi nastąpić w wyniku niekontrolowanej, przedwczesnej aktywacji prostafo-pain we wnętrzu komórki.

aktywność proteolityczną stafopainy A i nie hamuje stafopainy B, a białko



Rycina 2. Analiza struktury przestrzennej stafostatyny B (kod PDB: 1nyc). A – krysztal stafostatyny B; B – wstążkowy model struktury przestrzennej stafostatyny B; C – topologiczny schemat ułożenia nici w arkuszu beta stafostatyny B.



Rycina 3. Stafostatyna B wiąże się z miejscem aktywnym stafopainy B w sposób przypominający wiązanie substratu. A – schemat oznaczania reszt aminokwasowych substratu (P2-P3') oraz kieszeni wiążących substrat (S2-S3') wg Schechtera i Bergera (1967). Strzałką zaznaczono hydrolizowane wiązanie peptydowe; B – schematyczne przedstawienie sposobu wiązania stafostatyny B z miejscem aktywnym stafopainy B; C – stereograficzny schemat struktury kompleksu stafostatyny B i stafopainy B (kod PDB: 1pxv) przedstawionej w tzw. standardowej orientacji. Kolorem żółtym zaznaczono łańcuch główny stafostatyny B, kolorem niebieskim łańcuch główny domeny R stafopainy B, kolorem ciemnoniebieskim łańcuch główny domeny L stafopainy B, a kolorem jasnoniebieskim N-końcowy odcinek stafopainy B wprowadzony do cząsteczki na skutek zastosowania wektora ekspresyjnego. Każdą co dziesiątą resztę aminokwasową zaznaczono kropką. Do sporządzenia rysunku wykorzystano łańcuch główny enzymu oznaczony symbolem A i łańcuch główny inhibitora o symbolu C (część rysunku zaczerpnięto z pracy Filipek i wsp. 2003).

Przeszukiwanie baz danych ujawniło istnienie kolejnych białek posiadających sekwencje homologiczne ze stafostatynami A i B, występujących u innych gronkowców koagulazo-ujemnych. Jednocześnie okazało się, że stafostatyny nie wykazują wyraźnej homologii z żadnym z poznanych dotąd inhibitorów proteinaz cysteinowych.

W drugim etapie pracy podjęto próbę poznania mechanizmu działania stafostatyn. W tym celu skryształizowano i określono strukturę przestrzenną stafostatyny B w formie niezwiązanej oraz w kompleksie ze stafopainą B. Część cząsteczki stafostatyny posiada strukturę zamkniętej, ośmioniciowej mieszanej baryłki β i budową najbardziej przypomina lipokaliny (Ryc. 2). Odmierna topologia łańcucha polipeptydowego oraz brak zdolności wiązania ligandu sugerują jednak, że baryłka β typu stafostatyny reprezentuje nową, odrębną rodzinę homologiczną.

Niespodziewanie okazało się, że stafostatyna B wiąże się z enzymem w sposób przypominający wiązanie substratu, mimo to nie ulegając proteolizie (Ryc. 3). Ustalono, że kluczowe znaczenie dla procesu hamowania ma reszta glicyny zlokalizowana w pozycji odpowiadającej miejscu

P1 substratu, zachowana w ewolucji we wszystkich znanych sekwencjach stafostatyn. Przyjmuje ona nietypową, bardzo napiętą konformację, która byłaby sterycznie zabroniona dla każdej innej reszty aminokwasowej. Konformacja ta sprawia, że reakcja proteolizy zostaje zablokowana na początkowym etapie. Wydaje się, że sposób oddziaływania stafostatyny B ze stafopainą B reprezentuje nieznaną wcześniej strategię hamowania papaino-podobnej proteiny cysteinowej przez inhibitor białkowy.

Stafostatyny stanowią nową, do tej pory nie opisaną grupę inhibitorów proteinaz cysteinowych, wysoce specyficznych względem stafopain – enzymów produkowanych i wydzielanych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*. Z poznaniem mechanizmów leżących u podstaw funkcjonowania białkowych inhibitorów proteinaz wiąże się nadzieje na postęp w leczeniu schorzeń przebiegających z udziałem enzymów proteolitycznych, np. w terapii przeciwdziałającej rozwijaniu się gronkowca złocistego.

Podziękowania: Praca doktorska była wykonana w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biotechnologii UJ pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Dubina i w Laboratorium Biologii Strukturalnej Międzynarodo-

wego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, pod kierunkiem dr hab. Matthiasa Bochtlera. Część pracy związana z badaniami strukturalnymi wykonywana była wspólnie z dr Renatą Filipek z Laboratorium Biologii Strukturalnej MIBMiK. Badania były wykonywane również we współpracy z dr Arturem Sabatem i prof. dr hab. Janem Potempą z Zakładu Mikrobiologii WbT UJ.

PIŚMIENNICTWO

- Filipek R, Rzychoń M, Oleksy A, Gruca M, Dubin A, Potempa J, Bochtler M (2003) The staphostatin-staphopain complex: a forward binding inhibitor in complex with its target cysteine protease. *J Biol Chem* 278: 40959-40966
- Karlsson A, Arvidson S (2002) Variation in extracellular protease production among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to different levels of expression of the protease repressor *sarA*. *Infect Immun* 70: 4239-4246
- Rice K, Peralta R, Bast D, de Azavedo J, McGavin MJ (2001) Description of staphylococcus serine protease (*ssp*) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of *sspA*-encoded serine protease. *Infect Immun* 69: 159-169
- Schechter I, Berger A (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27: 157-162
- Shaw LE, Golonka E, Potempa J, Foster SJ (2004) The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 150: 217-228

II edycja konkursu na najlepszą pracę doktorską z biochemii w 2006 roku

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

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

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

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

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

Rozstrzygnięcie konkursu nastąpi do 31 sierpnia 2006 roku, a uroczyste wręczenie Nagrody odbędzie się na dorocznym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Szczecinie we wrześniu 2007 roku.

Patronat medialny nad konkursem sprawuje redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”.

SPRAWOZDANIE Z XLI ZJAZDU POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO BIAŁYSTOK, 12-16 WRZEŚNIA 2006 R.



PTBioch



XLI ZJAZD

Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

BIAŁYSTOK 12-15 WRZEŚNIA 2006

W dniach 12-16 września 2006 roku odbył się w Białymstoku XLI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Miejscem obrad i imprez towarzyszących były obiekty Politechniki Białostockiej, zlokalizowane przy ul. Wiejskiej 45 A. Większość uczestników była zakwaterowana w Domach Studenckich tej Uczelni.

Komitet Honorowy Zjazdu stanowili Członkowie Honorowi Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Profesorowie: Jerzy Chmielowski, Mieczysław Chorąży, Janina Kwiatkowska-Korczak, Zygmunt Machoy, Bronisława Morawiecka, Włodzimierz Ostrowski, Konstancja Raczyńska-Bojanowska, David Shugar, Lech Wojtczak, Zofia Zielińska i Mariusz Żydowo.

Komitet Organizacyjny Zjazdu został powołany spośród członków Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Białymstoku - zatrudnianych w miejscowej Akademii Medycznej, z udziałem dwojga osób spoza tej organizacji: specjalisty w zakresie finansów oraz eksperta w dziedzinie informatyki. Oto skład tego Komitetu:

Edward Bańkowski – przewodniczący, **Krzysztof Sobolewski** – sekretarz, **Nina Syrewicz** – skarbnik oraz członkowie: Marzanna Cechowska-Pasko, Zofia Galewska, Tomasz Gogiel, Andrzej Małkowski, Lech Romanowicz, Elżbieta Skrzydlewska oraz Małgorzata Wolańska.

Komitet Naukowy Zjazdu tworzyli profesorowie - specjaliści z różnych dziedzin biochemii - zatrudnieni w różnych ośrodkach, wśród nich jeden pracujący za granicą. Byli to: Jan Barciszewski (Poznań), Grzegorz Bartosz (Łódź), Mieczysław Chorąży (Gliwice), Andrzej Dżugaj (Wrocław), Andrzej Gindzieński (Białystok), Liliana Konarska (Warszawa), Elżbieta Kostyra (Olsztyn), Wiesław Oleszek (Puławy), Jerzy Pałka (Białystok), Adam Szewczyk (Warszawa), Julian Świerczyński (Gdańsk), Tomasz Twardowski (Poznań), Janusz Węgrowski (Reims, Francja) oraz Krzysztof Zwierz (Białystok).

W Zjeździe uczestniczyło około 620 osób, wśród nich 30 gości z następujących krajów: Australii, Austrii, Białorusi, Grecji, Francji, Hiszpanii, Litwy, Niemiec, Stanów Zjednoczonych Ameryki, Wielkiej Brytanii i z Włoch.

Uroczyste otwarcie Zjazdu odbyło się w auli Wydziału Elektrycznego Politechniki Białostockiej. Po powitaniu uczestników przez przewodniczącego Komitetu Organizacyjnego i Rektora Akademii Medycznej w Białymstoku, nastąpiły krótkie wystąpienia: Prezesa Polskiego Towarzystwa Biochemicznego – Prof. Lecha Wojtczaka – na temat bieżących problemów tej organizacji oraz Prezydenta Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych – Prof. Jolanty Barańskiej – na temat działalności FEBS. Prof. Dariusz Chlubek zaprosił uczestników na XLII Zjazd PTB w Szczecinie, a przedstawiciel Oddziału Krakowskiego na VI Konferencję im. J. K. Parnasa. Wręczono nagrody Towarzystwa oraz firmy Sigma-Aldrich, Polska. Wykład inauguracyjny, pt.: *Endokrynną i wydzielniczą funkcją tkanki tłuszczowej* wygłosił Prof. dr hab. Julian Świerczyński z Zakładu Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku. Uroczystość zakończył koncert Kwartetu Podla-

skiego oraz spotkanie uczestników Zjazdu przy lampce wina.

Nagrodę im. Jakuba Karola Parnasa, za najlepszą pracę doświadczalną wykonaną w Kraju i opublikowaną w roku 2005, otrzymał zespół autorski w składzie: Karolina Michalska, Krzysztof Brzeziński i Mariusz Jaskólski, z Zakładu Krystalografii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu. Wspomniana praca, pt.: *Crystal structure of isoaspartyl aminopeptidase in complex with L-aspartate*, została opublikowana w Journal of Biological Chemistry 280: 28484-91, 2005.

Nagrodę im. Bolesława Skarżyńskiego, za najlepszy artykuł opublikowany w kwartalniku Postępy Biochemii w roku 2005 (tom 51, str. 171-187), otrzymał zespół autorski w składzie: Stanisław Kowalczyk, Emilia Hadowska i Anna Piekarska, z Zakładu Biochemii Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu. Tytuł artykułu: *Roślinne układy ubikwitylacji i degradacji białek w proteasomach – kluczowe elementy hormonalnych szlaków sygnałowych*.

Nagrodę za najlepszą pracę z chemii i biochemii kwasów nukleinowych - przyznaną przez Sekcję Kwasów Nukleinowych Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i firmę Sigma-Aldrich, Polska - otrzymali Piotr Śliwa i Ryszard Korona, z Instytutu Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Praca ta, pt.: *Loss of dispensable genes is not adaptive in yeast* ukazała się w Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 102: 17670-4, 2005.

W kolejnych dniach odbyły się obrady **12 sesji monotematycznych** oraz **1 wielotematyczna sesja plakatowa**. Oto ich problematyka: Biochemia kliniczna, Biochemia nowotworów, Biochemia żywności a nutrigenomika, Biochemia macierzy pozakomórko-

wej, Biochemia lipidów, Biochemia w rolnictwie, Bioenergetyka, Biotechnologia, Glikokoniugaty, Kwasy nukleinowe, Struktura i metabolizm komórki mięśniowej, Wolne rodniki w biologii i medycynie. Organizatorami sesji byli wyżej wymienieni Członkowie Komitetu Naukowego. Prof. Mariusz Jaskólski wygłosił wykład im. J. K. Parnasa, pt.: *L-arginazy, ich krewni i znajomi*. Łącznie wygłoszono 102 wykłady, 89 komunikatów ustnych oraz przedstawiono 373 doniesienia plakatowe. Ich streszczenia zostały opublikowane w języku angielskim, w *Acta Biochemica Polonica*, jako suplement 1 do tomu 53, 2006.

Rozstrzygnięto konkursy o nagrodę im. **Włodzimierza Mozołowskiego** oraz o nagrodę im. **Janiny Opieńskiej-Blauth**. Komisjom konkursowym przewodniczyła Prof. Janina Kwiatkowska-Korczak z Zakła-

du Biochemii Lekarskiej Akademii Medycznej we Wrocławiu. Laureatką pierwszego została Magdalena Spiechowicz, z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie, za komunikat, pt.: *Białko Sg1 – badanie właściwości ko-chaperonowych*, a zwyciężcą drugiego Andrzej Błaut, z Zakładu Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, za komunikat pt.: *Rola komórkowych układów antyoksydacyjnych w oporności nabłonka dolnych dróg oddechowych na stres oksydacyjny*.

W dniu 14 września, w godzinach wieczornych, odbyło się **spotkanie koleżeńskie** uczestników Zjazdu w Klubie „Gwint” Politechniki Białostockiej.

Składamy serdeczne podziękowania Zarządowi Głównemu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego za wsparcie naszych działań orga-

nizacyjnych, Ministerstwu Szkolnictwa Wyższego i Nauki za znaczącą dotację finansową, Organizatorom sesji, Wykładowcom oraz Autorom i Prezenterom komunikatów ustnych i plakatowych za Ich wkład w sukces naukowy Zjazdu. Dziękujemy Redakcji *Acta Biochimica Polonica* za sprawną publikację streszczeń wykładów i komunikatów zjazdowych. Wyrażamy wdzięczność Rektorowi i Kanclerzowi i Pracownikom Politechniki Białostockiej za udostępnienie pomieszczeń tej Uczelni oraz obsługę techniczną Zjazdu. Dziękujemy Sponsorom i Wystawcom: książek, aparatury i odczynników za wsparcie materialne.

W imieniu Komitetu Organizacyjnego

dr Krzysztof Sobolewski
Sekretarz

prof. Edward Bańkowski
Przewodniczący

Sesja „Biotechnologia. Dokąd zmierza polska biotechnologia?”

Sesja „*Biotechnologia. Dokąd zmierza polska biotechnologia? – Spór o genetycznie zmodyfikowane organizmy (GMO)*” XLI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok

W ramach XLI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, w Białymstoku, 12–16.09.2006 r. odbyły się z inicjatywy przewodniczącego Komitetu Organizacyjnego p. prof. Edwarda Bańkowskiego obrady sesji „*Biotechnologia. Dokąd zmierza polska biotechnologia? – Spór o genetycznie zmodyfikowane organizmy (GMO)*” zorganizowane i koordynowane przez prof. Tomasza Twardowskiego. W ramach tej sesji obrady prowadzone były na czterech posiedzeniach:

- 1) „Jaka jest dzisiejsza biotechnologia”,
- 2) „Kierunki rozwoju biotechnologii”,
- 3) „Dyskusja okrągłego stołu” i uchwalenie „rezolucji” uczestników sesji,
- 4) Prezentacje „młodych naukowców”.

Największe zainteresowanie i ożywioną polemikę wywołała dyskusja „okrągłego stołu” prowadzona przez red. M. Rotkiewicza z „Polityki”. Kontekstem do obrad były zarówno referaty zwolenników biotechnologii (profesorowie Stanisław Bielecki, Stefan Malepszy, Janusz Zimny), jak i sceptyków (prof. Ludwik Tomiałoć). Wybrane kierunki rozwoju biotechnologii w naszym kraju zostały omó-

wione w następnym cyklu referatów profesorowie Zdzisława Libudzisz, Andrzej Mackiewicz, Ryszard Słomski, Ewa Łojkowska, Małgorzata Korbin]. Nader istotny dla przebiegu dyskusji był głos (jakże rzadko słyszany) przedstawicieli przemysłu: Roberta Gabarkiewicza [Monsanto]; Tomasz Sławatyńca [Hoffman-la Roche] i Marka Przeździaka [Rada ds. Żywności przy Ministerstwie Rolnictwa i Rozwoju Wsi]. Tłem jak i motywem dominującym w dyskusji była kwestia opracowywanej legislacji, projektu nowej ustawy zwanej „Prawo o GMO”.

Z ogromnym zadowoleniem wszystkich uczestników „rezolucję” przyjęto przez aklamację, co przy mających miejsce różnicach w poglądach pomiędzy np. ekologami a biotechnologami, ma istotne znaczenie.

prof. Tomasz Twardowski

Rezolucja

Rezolucja przyjęta w trakcie obrad sesji „Biotechnologia. Dokąd zmierza polska biotechnologia? – Spór o genetycznie zmodyfikowane organizmy (GMO)”

XLI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Białymstoku 13.09.2006 r.

Biotechnologia stanowi najbardziej istotną część biogospodarki, powszechnie uznawanej jako szansa rozwoju cywilizacyjnego w tym stuleciu. Rozwój biotechnologii w Polsce jest w zasadniczym stopniu uwarunkowany przez normy prawne. W odpowiedzi na liczne apele polskiego środowiska

biotechnologicznego powstała idea nowelizacji ustawy o organizmach genetycznie zmodyfikowanych, która zmaterializowała się w postaci przygotowanego w Ministerstwie Środowiska projektu (z 23 sierpnia 2006 r.) nowej Ustawy, znanej pod nazwą „Prawo o GMO”. Celem tej godnej poparcia idei jest adaptacja do polskich

warunków odpowiednich przepisów prawnych Unii Europejskiej w obszarze działań dotyczących organizmów genetycznie zmodyfikowanych.

Z uwagi na fakt, że stworzenie podstaw biogospodarki w naszym kraju wymaga właściwych norm prawnych, zmiany w projekcie ustawy „Prawo o GMO” z 29 maja 2006 r. powinny uwzględnić następujące cele główne:

1. Zapewnienie równości wszystkich podmiotów w świetle prawa.

Prace, np. mikrobiologa, rolnika i producenta biofarmaceutyków są równocześnie dla nauki i gospodarki.

2. Stymulowanie rozwoju kształcenia, nauki i wdrożeń w Polsce jest sprawą priorytetową dla gospodarki.

3. Zgodność z prawem Unii Europejskiej i konwencjami międzynarodowymi.

4. Tworzona legislacja nie może stwarzać sytuacji korupcjogennych, prawnie nieprzejrzystych zarówno dla naukowców, jak i dla przedstawicieli gospodarki czy administracji.

Szczegółowa analiza projektu Ustawy prowadzi jednak do wniosku, że nie spełnia on zasad dobrej techniki legislacyjnej, gdyż duch tego projektu jest wyraźnie sprzeczny z kompleksowym rozwojem innowacyjnej nauki i technologii oraz rozwojem gospodarczym kraju. W związku z tym apelujemy o zmianę projektu Ustawy uwzględniającą wymienione priorytety.

prof. Tomasz Twardowski

WIADOMOŚCI KRAJOWE

KOLOSTRYNINA (ang. *Colostrin*) – kompleks białek znajdujący się w sianie ssaków – może być produkowany na skalę przemysłową dzięki badaniom profesora **Antoniego Polanowskiego** (Fot. 1) i **Tadeusza Wilusza** (Fot. 2) z Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego (dotychczas Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej UW).

Kolostryna występuje w sianie w różnych ilościach, zależnie od fazy laktacji. Najwyższy poziom tych peptydów jest w sianie wydzielanej od kilku do kilkudziesięciu pierwszych godzin po porodzie. Potem jej zawartość w mleku matki stopniowo spada. Zapewnia ona substancje odpornościowe niewykształconemu jeszcze układowi immunologicznemu nowo narodzonego ssaka – człowieka, owcy, krowy itd. do czasu aż sam zacznie produkować własne przeciwciała. Naukowcy nie znają jeszcze dokładnego pochodzenia kolostryny, ale wiadomo, że część peptydów, jakie występują w kompleksie kolostryny pochodzi z innego białka, kazeiny lub aneksyny. Dla części peptydów nie znaleziono białka, z którego mogłyby powstawać, co może wskazywać na to, że są one produktami bezpośredniej syntezy w organizmie matki.

Badania porównawcze nad immunoglobulinami surowicy i siary owiec – prowadzone w latach 70. w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej (IITD) PAN we Wro-

clawiu przez prof. Józefa Lisowskiego i doc. Marię Janusz – skierowały uwagę badaczy na towarzyszące tym białkom niskocząsteczkowe immunoregulatory. Były to peptydy związane z frakcją immunoglobulin, wyróżniające się wysoką zawartością aminokwasu proliny (ok. 22%). Dlatego nazwano je w skrócie PRP (ang. *proline rich polipeptides*).



Fotografia 1. Profesor Antoni Polanowski.

Kompleks białkowy znany obecnie pod nazwą firmową Kolostryna (kolostryna) zawiera ponad 30 różnych peptydów. Kompleks ten charakteryzuje się szczególnymi właściwościami biologicznymi, potencjalnie terapeutycznymi. Wykazano, że posiada on interesujące właściwości immunoregulatorowe, wpływając m.in. na indukcję cytokin mających kluczowe znaczenie w układzie immunologicznym. Zdolność PRP do indukowania cytokin, mających wpływ na powstawanie w mózgu toksycznych złogów amyloidowych sprawiła, że Anna Dubowska-Ingłot, Maria Janusz i Józef Lisowski rozpoczęli prace nad zastosowaniem PRP z siary owiec do leczenia choro-

by Alzheimera. W badaniach klinicznych, prowadzonych przez dr hab. med. Jerzego Leszka, na małej próbie pacjentów udało się wykazać lecznicze działanie kolostryny.

Produkcja kolostryny jest klasycznym przykładem umiejętnego połączenia badań podstawowych z aplikacyjnymi. Pierwotny cel badań miał charakter czysto poznawczy. Wyniki pozwoliły naukowcom na sformułowanie hipotezy roboczej na temat właściwości terapeutycznych odkrytych peptydów i zastosowanie ich w praktyce medycznej. Kolostryna wyraźnie spowalnia proces niszczenia komórek mózgu, do którego dochodzi w wyniku choroby Alzheimera. W 1998 roku zastosowanie kolostryny do leczenia choroby Alzheimera zostało opatentowane przez IITD im. Hirszfelda we Wrocławiu.

W 2000 roku patent ten został sprzedany brytyjskiej firmie biotechnologicznej ReGen Therapeutics Plc, która postanowiła przeprowadzić szersze badania dotyczące przydatności preparatu w leczeniu Alzheimera. Przeprowadzenie badań wymagało jednak dużej ilości preparatu, co przy złożonej i czasochłonnej metodzie jego oczyszczania było swego rodzaju wyzwaniem. Pierwsze próby preparacji na większą skalę podjęto w



Fotografia 2. Profesor Tadeusz Wilusz.

jednym z laboratoriów niemieckich. Uzyskany tam preparat nie spełniał oczekiwanych wymogów. Następne zlecenia ReGen skierował do laboratorium brytyjskiego i do polskich naukowców – prof. Polanowskiego i prof. Wilusza, zajmujących się od lat specjalistycznymi badaniami nad białkami. Po dwóch miesiącach pierwsze próby polskiego preparatu przeszły pomyślnie testy fizykochemiczne i biologiczne w Niemczech oraz w Anglii i Polacy rozpoczęli czteroletnią owocną współpracę z firmą ReGen. Po zaspokojeniu potrzeb wynikających z prowadzonych badań klinicznych, w kolejnych miesiącach profesorowie Polanowski i Wilusz podjęli się w swoich laboratoriach opracowania nowej metody preparacji, która pozwalałaby na produkcję kolostryny w skali przemysłowej. Polscy naukowcy opracowali prostą metodę pozyskiwania kolostryny na skalę przemysłową z mleka owiec i krów. Międzynarodowy patent przyznano w 2005 roku. Jego twórcami są naukowcy polscy, ale właścicielem jest brytyjska firma ReGen Therapeutics Plc.

Przemysłowe otrzymywanie kolostryny jest w zasadzie dwuetapowe. W pierwszym są wytrącane z siary za pomocą alkoholi niepotrzebne białka, głównie kazeina i immunoglobuliny z równoczesną dysocjacją peptydów aktywnych od immunoglobulin, z którymi występują w kompleksie. W drugim etapie z otrzymanego płynu, w określonym pH, wytrąca się aktywne białka prostym sposobem wysalania. Osad po pozbyciu się soli stanowi czystą kolostrynę.

W Polsce preparat zawierający kolostrynę został przetestowany na ponad 150 osobach cierpiących na chorobę Alzheimer. Efekty są bardzo obiecujące. U chorych zaobserwowano m.in. spowalnianie efektów chorobowych i polepszenie ogólnych funkcji behawioralnych, z wyraźnym usprawnieniem zdolności zapamiętywania. Poprawa była widoczna przede wszystkim u pacjentów cierpiących na początkowe i średnio zaawansowane stadium choroby. U pacjentów będących w zaawansowanym stadium efekty nie były tak jednoznaczne. Jest szansa na opóźnienie, a być może nawet cofnięcie objawów

choroby. Wpływ kolostryny na polepszenie funkcji pamięciowych potwierdzono również w badaniach na zwierzętach wykazując, że podawanie starym szczurom preparatu przyspiesza proces zapamiętywania, poprawia pamięć przestrzenną i incydentalną. W USA trwa uruchamianie produkcji kolostryny jako dodatku do żywności, bo produkcja takiego preparatu nie jest obwarowana tak wielkimi wymaganiem, jak produkcja leku. Produkcją zajmie się firma Sterling Technology. Aby kolostryna mogła trafić na rynek farmaceutyczny, konieczne jest dokończenie trwających kilka lat badań klinicznych. Jest substancją całkowicie naturalną. Nie wykazano dotychczas żadnych efektów ubocznych. Kolostryna powinna znaleźć zastosowanie nie tylko w leczeniu choroby Alzheimer, ale także jako dodatek do odżywek dla dzieci, które z różnych powodów zostały pozbawione możliwości karmienia piersią.

Prof. Antoni Polanowski i jego zespół pracują równolegle nad innym, wyodrębnionym przez siebie z siary owiec i krów białkiem – nonapeptydem nazwanym NP-Pol. Białko, które może pomóc w leczeniu choroby Parkinsona czeka na opatentowanie w Londynie (wg witryny Nauka w Polsce i za zgodą autorów metody).

PROFESOR KORNEL GIBIŃSKI (Fot. 3) został patronem Centralnego Szpitala Klinicznego Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach na mocy decyzji Senatu Uczelni. Nestor internistów polskich, prof. dr hab. med., dr h.c.mult. Kornel Gibiński osobiście wziął udział w uroczystości. Profesor jest wybitnym autorytetem w dziedzinie chorób wewnętrznych i farmakologii klinicznej, twórcą śląskiego ośrodka klinicznego, prowadzącego pionierskie badania w zakresie wielu zagadnień dotyczących chorób wewnętrznych.

Szerokie zainteresowania badawcze Profesora Gibińskiego obejmują zagadnienia kardiologii i enzymologii klinicznej, a zwłaszcza gastroente-

rologii. W latach 60. zajmowała Go wartość diagnostyczna aktywności gamma-glutamylotranspeptydazy, poszukiwał inhibitorów enzymu w ustrojowych płynach ciała. Badał i wykorzystywał w diagnostyce internistycznej fibrynolityczną aktywność osocza i proteolityczną aktywność leukocytów. Pracował nad wykorzystaniem analogów prostaglandyny E2 w leczeniu owrzodzeń żołądka i dwunastnicy. Z Jego Kliniki wyszły pierwsze w Polsce prace poświęcone diagnostyce i leczeniu pierwotnego aldosteronizmu. Na szczególną uwagę zasługują badania Profesora dotyczące czynności gruczołów potowych w trudnych warunkach klimatycznych. W początkowym okresie swojej pracy zawodowej zajmował się nowatorską, jak na tamte czasy, poligraficzną oceną struktury i czynności serca. W latach późniejszych zajmowały Profesora czynniki ryzyka miażdżycy i sposoby prewencji. Prace z zakresu farmakologii klinicznej przyczyniły się do wprowadzenia standardów kontrolowanych badań klinicznych, a zwłaszcza przestrzegania i stosowania zasad etycznych. Jako pierwszy w Polsce, dostrzegł znaczenie zjawisk chronobiologii i ich znaczenie dla farmakoterapii. Profesor Kornel Gibiński jest związany ze Śląską Akademią Medyczną od 1953 r. kiedy podjął się organizacji IIL Kliniki Chorób Wewnętrznych w Bytomiu. W szpitalu w Ligocie założył pierwszą w kraju Klinikę Gastroenterologii. Profesor

Gibiński jest symbolem najwyższych wartości moralnych. Cechuje Go wrażliwość na problemy ludzi chorych i cierpiących oraz gotowość w niesieniu pomocy każdemu potrzebującemu. W przekonaniu pomysłodawców uroczystości Publiczny Centralny Szpital Kliniczny imienia prof. Kornela Gibińskiego będzie symbolem tych wszystkich wartości, których uosobieniem jest Patron szpitala. Profesor zwykł mówić „...lekarze widzą

chore organy, komórki, ale nie widzą człowieka. Zaczęliśmy leczyć śmierć, a to nonsens, bo śmierci się nie uleczy.



Fotografia 3. Profesor Kornel Gibiński.

Ludzie są mądrzy i wiedzą, że muszą umrzeć. Ratować trzeba od choroby” i w innym miejscu dodaje „rozum i serce lekarza to rzeczy, których w medycynie zgubić nie wolno”.

Z dniem 1 września wchodzi w życie **NOWE PRZEPISY OBEJMUJĄCE SPRAWY PRACOWNICZE NAUCZYCIELI AKADEMICKICH** (Ustawa z dnia 27 lipca 2005 r. Prawo o szkolnictwie wyższym; Dz.U. nr 164, poz. 1365 oraz z 2006 r. Dz.U. nr 46, poz.328), a dotyczą one dodatkowego zatrudnienia, rozwiązywania stosunku pracy i podstawowości zatrudnienia.

KATEGORIE JEDNOSTEK NAUKOWYCH, ustalone wcześniej przez komisję Rady Nauki, zgodnie z zasadami określonymi w 2005 r. zatwierdził podsekretarz stanu prof. Krzysztof J. Kurzydłowski w końcu sierpnia b.r. Są one podstawą trybu przyznawania i rozliczania środków finansowych na naukę. Ocena parametryczna będzie miała decydujący wpływ na wysokość finansowania danej jednostki naukowej przez MNiSW przez najbliższe cztery lata. Ministerstwo zapewnia, że jednostki, które podniosły swoją ocenę otrzymają wyróżnienie z tytułu różnic w wysokości finansowania jednostek różnych kategorii i nastąpi to pod koniec czwartego kwartału br.

FUNDACJA na rzecz NAUKI POLSKIEJ w piątej edycji konkursu przyznała **11 Krajowych Stypendiów Wyjazdowych** umożliwiających wyjazd na staż do innej niż macierzysta placówki badawczej. Otrzymali je (nauki matematyczno-przyrodnicze): **dr Ewa Brucka – Jastrzębska** z Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Szczecińskiego na staż na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego; **dr Artur Goławski** z Wydziału Rolniczego Akademii Podlaskiej w Siedlcach na staż w Zakładzie Ekologii Behawioralnej UAM; **dr Zbigniew Kasprzykowski** z Wydziału Rolniczego Akademii Podlaskiej w Siedlcach na staż w Katedrze Ekologii i Zoologii Kręgowców Uniwersytetu Gdańskiego; **dr Marcin Palusiak** z Wydziału Fizyki i Chemii Uniwersytetu Łódzkiego na staż w Instytucie Chemii Uniwersytetu Warszawskiego; **dr Piotr Przybylski**

z Wydziału Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza na staż na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Politechniki Szczecińskiej; **dr Justyna Rosicka-Kaczmarek** z Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej na staż na Wydziale Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego.

PHIL EPISTEMONI – nagroda ustanowiona w 1986 r. przyznawana jest dziennikarzom popularyzującym problemy, w kategorii ogólnopolskiej, szkolnictwa wyższego, nauki oraz kultury i sztuki, przez Kolegium Rektorów Szkół Wyższych Krakowa. Tegorocznym laureatem Nagrody, i to po raz trzeci, jest **p. Marian Nowy**, redaktor „Dziennika Polskiego”. Nagrodę Phil Epistemoni otrzymali w dwudziestolecie m.in. znani dziennikarze Janina Paradowska, Ignacy Rutkiewicz, Zbigniew Święch, Jerzy Wunderlich, Lesław Peteres, Jerzy Sadecki.

L'ORÉAL POLSKA przy wsparciu Polskiego Komitetu do Spraw UNESCO ogłosił w 2001 r. pierwszą edycję konkursu na **roczne stypendia dla pięciu MŁODYCH POLEK – NAUKOWCÓW** prowadzących badania w dziedzinach biologiczno-medycznych. Celem tej inicjatywy była pomoc młodym kobietom w realizacji ich pracy badawczej. O stypendia ubiegać się mogą kobiety zajmujące się badaniami naukowymi w dziedzinach biologiczno-medycznych, których prace mają charakter aplikacyjny: doktorantki, będące w ostatnim roku realizacji swej pracy doktorskiej, które nie ukończyły 35 lat oraz habilitantki, kończące pracę habilitacyjną, które nie przekroczyły 45 roku życia. Wyłonione w wyniku konkursu trzy laureatki na poziomie doktoratu przez rok otrzymują stypendia w wysokości 1.500 zł miesięcznie, natomiast dwie habilitantki nagrodzone zostają rocznym stypendium wynoszącym 1.800 złotych miesięcznie. Stypendia ufundowane przez L'Oréal Polska są inicjatywą lokalną. Źródłem inspiracji polskiej inicjatywy jest międzynarodowa umowa zawarta w Paryżu między Grupą L'Oréal i UNESCO: „For Women in Science”. W jej ramach, każdego roku, w paryskiej siedzibie UNESCO wybitne przedstawicielki

świata nauki oraz młode badaczki z pięciu kontynentów otrzymują nagrody pieniężne.

Aspiracją polskiego programu stypendiów jest lokalna promocja młodych kobiet – naukowców. Celem L'Oréal Polska jest zaangażowanie się w ważną akcję pomocy kobietom i działanie w sposób skuteczny i długotrwały. Program stypendiów L'Oréal Polska dla Kobiet i Nauki przy wsparciu Polskiego Komitetu do Spraw UNESCO pragnie zachęcić kobiety do większego zaangażowania na wszystkich poziomach życia naukowego. W bieżącym roku wnioski konkursowe można było składać w terminie 1 maja–31 lipca. Warto śledzić na stronie www.lorealdlakobietnauki.pl informacje dotyczące konkursu w roku 2007.

W bieżącym roku spośród ponad 80 kandydatek stypendia otrzymały habilitantki: w dziedzinie biologii ogólnej – **dr Maria Anna Ciemerych-Litwinienko** z Zakładu Embriologii Instytutu Zoologii Uniwersytetu Warszawskiego, temat pracy: „Rola cyklin D w rozwoju zarodkowym myszy oraz w nowotworzeniu” oraz w dziedzinie dermatologii i wenerologii – **dr Joanna Narbutt** z Kliniki Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, temat pracy: „Wpływ promieniowania ultrafioletowego na wybrane parametry układu immunologicznego skóry”.

Stypendia doktoranckie otrzymały: w dziedzinie biochemii – **Beata Peplowska** z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie, temat pracy: „Poszukiwanie zmian w genie MAPT w przypadkach otępienia czołowo-skroniowego”, w dziedzinie modelowania molekularnego – **Magdalena Ślusarz** z Katedry Chemii Teoretycznej, Zakładu Modelowania Molekularnego, Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, temat pracy: „Modelowanie molekularne białek GPCR i ich oddziaływań z bioligandami”; w dziedzinie biotechnologii molekularnej i biokatalizy – **Małgorzata Zakrzewska** z Zakładu Inżynierii Białka, Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, temat pracy: „Analiza mutacyjna ludzkiego kwaśnego czynnika wzrostu fibroblastów – FGF-1”.

Celem organizowanego, po raz dziewiąty, **KONKURSU NA NAJLEPSZĄ PRACĘ DOKTORSKĄ i MAGISTERSKĄ** przygotowaną z zastosowaniem narzędzi statystyki i analizy danych zawartych w programach z rodziny Statistica, jest promocja autorów najlepszych prac i popularyzacja nowoczesnych metod analizy danych. Do Konkursu mogą być zgłaszane prace przygotowane w polskich wyższych uczelniach i instytutach naukowych, które przed terminem zgłoszenia do Konkursu zostały obronione lub uzyskały pozytywne recenzje i został wyznaczony termin ich obrony. Zgłoszenia prac do Konkursu dokonują autorzy, promotorzy lub dziekani wydziałów. **Zgłoszenia** przyjmuje sekretarz Komisji Konkursowej pod adresem: StatSoft Polska, 30-11- Kraków, ul. Kraszewskiego 36 **do dnia 15 grudnia 2006 r.** Konkursowi patronuje Polskie Towarzystwo Statystyczne. Więcej informacji na stronie www.statsoft.pl.

NAGRODĘ DLA NAJLEPSZEGO MŁODEGO POPULARYZATORA na zakończenie X Festiwalu Nauki w Warszawie odebrał Takao Ishikawa, doktorant Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Ishikawa urodzony w Tokio (z matki Polki) studiował na UW i czuje się silnie związany z Zakładem Biologii Molekularnej UW. Podczas zakończonego 24 września b.r. X Festiwalu Nauki w Warszawie prezentował wykład dotyczący prionów w drożdżach. Mówił o stanie obecnej wiedzy na temat chorób powodowanych przez priony oraz o właściwościach tych białek, występujących w drożdżach piekarniczych. Zdaniem Takao Ishikawa Japończycy, organizując imprezy popularnonaukowe, powinni wzorować się na Polakach. Młody naukowiec jest pełen podziwu dla idei Festiwalu i odwagi młodych naukowców dzielenia się wiedzą ze słuchaczami – uczestnikami dorocznej imprezy popularnonaukowej. Według prof. Magdaleny Fikus, przewodniczącej Rady Programowej X Festiwalu Nauki, prezentacja Ishikawy była wzorem wykładu popularnonaukowego. Profesor z radością zauważyła, że rosną nowe pokolenia popularyzatorów.

NOWOCZESNE LABORATORIUM ANALIZ FARMACEUTYCZ-

NYCH powstanie w ciągu roku w na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Białymstoku, dzięki dofinansowaniu z UE (koszt 1,5 miliona zł) z programu Interreg IIIA. Jednostka będzie działać na potrzeby całego transgranicznego obszaru polsko-litewskiego, gdzie do tej pory nie ma takiego laboratorium. Partnerami w projekcie są litewskie szpitale w Lazdijai, Mariampolu i Kalwarii. Laboratorium będzie pomocne lekarzom, ale zakresem analiz w nim wykonywanym są także zainteresowane różne instytucje, np. służby graniczne i celne, policja i prokuratura. W laboratorium możliwe będzie badanie osób zatrutych farmaceutykami nieznanego pochodzenia – na przykład lekami kupionymi na bazarze czy pochodzącymi z niekontrolowanej wymiany przygranicznej oraz analizowanie leków sprzedawanych na rynku, badanie substancji chemicznych czy toksycznych w lekach, żywności lub próbkach krwi czy moczu. Na terenie przeznaczonym dla nowej jednostki trwają prace dostosowawcze i równolegle prowadzone jest szkolenie kadry. Informacja prof. Elżbiety Skrzydlewskiej, kierownika Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej AMB dla PAP (3.09.2006).

Były minister nauki i informatyzacji, **prof. MICHAŁ KLEIBER (Fot. 4), ZOSTAŁ WYBRANY** członkiem prestiżowej Europejskiej Akademii Nauk i Sztuk w Salzburgu. Jest to międzynarodowa, interdyscyplinarna organizacja, zrzeszająca blisko 1,5 tys. osób. Decyzją władz Akademii prof. Kleiber, pracujący w Instytucie Podstawowych Problemów Techniki PAN, został zaliczony do grona jej członków w sekcji Nauk Technicznych i Ochrony Środowiska. Prof. Kleiber jest specjalistą z zakresu informatyki stosowanej i metod komputerowych mechaniki, laureatem Nagrody Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, tzw. polskiego Nobla. W latach 2001–2005 był ministrem nauki i informatyzacji.

TARGI BIOTECHNOLOGII I BIOBIZNESU zorganizowano w

Łodzi, w dniach 19–20 października 2006 r. Na targach Bio-Forum od sześciu lat spotykają się ludzie nauki i biznesu związani z przemysłem kosmetycznym i farmaceutycznym. Serwis Nauka w Polsce patronuje tegorocznej imprezie. Naczelną ideą tych spotkań jest prezentacja osiągnięć ośrodków badawczo-rozwojowych przedstawicielom polskich firm kosmetycznych, farmaceutycznych, producentom żywności funkcjonalnej (równocześnie odżywiającej i oddziałującej pozytywnie na zdrowie i odporność człowieka), a także innych, w których mogą być wykorzystane osiągnięcia biotechnologii. Bio-Forum jest szczególną giełdą ofert, służących podniesieniu poziomu innowacji w sektorze biogospodarki. Do udziału w targach zaproszeni zostali przedsiębiorcy zagraniczni, głównie z rejonu Europy Środkowej i Wschodniej. Wystawcami byli autorzy projektów badawczo – wdrożeniowych, w których założeniu jest zawarta myśl o wykorzystaniu ich w działalności gospodarczej. Zespoły naukowe mogły dodatkowo zaprezentować ofertę usługową laboratoriów, dysponujących drogą i unikatową aparaturą naukową, a także nowatorskimi metodami badawczymi.

W programie targów zawarto liczne seminaria adresowane zarówno do polskich producentów, jak również do tych naukowców, którzy są zainteresowani realizacją biotechnologicznych projektów badawczo-wdrożeniowych, ale nie mają w tym względzie wystarczającej wiedzy i doświadczenia. Osiągnięcia prezentowali naukowcy, realizujący projekty z zakresu biotechnologii w ochronie zdrowia, ochronie środowiska i kosmetologii, farmacji i nauk biomedycznych, nanotechnologii, biomateriałów, diagnostyki molekularnej, testów alternatywnych oraz żywności funkcjonalnej. Rozwój biotechnologii stanowi jeden z priorytetów w strategii rozwoju regionu łódzkiego. I dlatego Urząd Miasta Łodzi ufundował zatrudnionym w tym regionie naukowcom specjalne stypendia, przeznaczone na pokry-



Fotografia 4. Profesor Michał Kleiber.

cie kosztów uczestnictwa w Targach Bioforum. Prezentacja projektów badawczo-wdrożeniowych w ramach Targów umożliwi ich konfrontację z potrzebami rynku.

POLITECHNIKA SZCZECIŃSKA OBCHODZI 60.LECIE ISTNIE-NIA (Fot. 5.) 28 września, na uroczystej konferencji naukowej spotkali się naukowcy i przedstawiciele instytucji odpowiedzialnych za szkolnictwo wyższe. Analizę szkolnictwa wyższego na Pomorzu Zachodnim przedstawił prof. Mieczysław Wysiecki (PS). O Politechnice w roku jubileuszu opowiadał jej rektor, prof. Włodzimierz Kiernożycki (Fot. 6). Rektor Politechniki Gdańskiej, prof. Janusz



Fotografia 5. Medale z okazji jubileuszu 60. lecia istnienia Politechniki Szczecińskiej.

Rachoń, omówił wpływ Ustawy o Szkolnictwie Wyższym na obecną

sytuację polskich uczelni. Niektóre wystąpienia dotyczyły wąskiej tematyki związanej z edukacją techniczną. O minimum kadrowym niezbędnym dla prowadzenia kierunków studiów mówił prof. Wojciech Mitkowski (Rada Główna Szkolnictwa Wyższego). Standardy nauczania na studiach I i II stopnia przedstawił prorektor ds. kształcenia PŁ, prof. Edward Jezierski. Przewodniczący Komisji Akredytacyjnej Uczelni Technicznych prof. Jerzy Świątek mówił o celach i zadaniach komisji. Rektor Politechniki Krakowskiej, prof. Józef Gawlik, omówił zalety Centrów Transferu Technologii i Parków Technologicznych i podzielił się ze słuchaczami własnymi doświadczeniami w tym zakresie. W tym roku PS była gospodarzem czwartego posiedzenia Konferencji Rektorów Polskich Uczelni Technicznych.

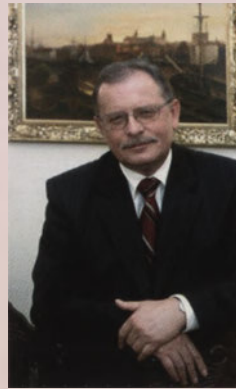
Od sześciu miesięcy przed Kampusem Nauk Biologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Pychowicach czas odmierza **ZEGAR SŁONECZNY**. Ini-

ciatorem budowy zegara był prof. Aleksander Koj, biochemik, światowej rangi naukowiec, nie tak dawno rektor UJ. I jest to miejsce szczególne dla tego instrumentu, bowiem w jego bezpośrednim sąsiedztwie uprawiane są nauki

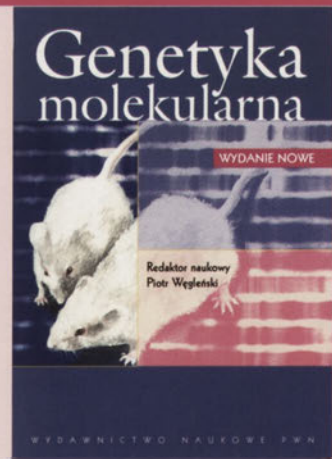
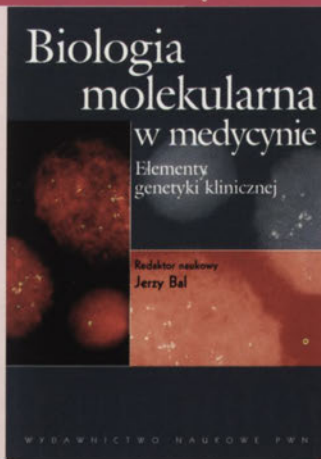
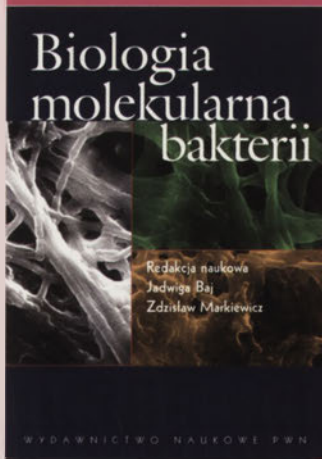
biologiczne i nauki o środowisku. Wyjątkowy chronometr będzie odmierzał czas polskich nowych osiągnięć naukowych. Zegar jest dziełem architekta Stanisława Deńki, a autorem niezbędnych wyliczeń, potwierdzonych przez astronoma dr Jana Mietelskiego, był January Weiner. Budowa zegara została zrealizowana dzięki hojności rodziny Sulimirskich, dla której inicjatywa prof. Koj była sposobem uczczenia pamięci wybitnego profesora archeologii UJ i wieloletniego rektora Polskiego Uniwersytetu w Londynie. Witold Sulimirski z Fundacji Kościuszkowskiej

podziękował władzom Uniwersytetu, prof. A. Kojowi i wszystkim osobom zaangażowanym przy realizacji projektu za pozytywny finał budowy (wg Alma Mater, lato 2006).

**pod redakcją
Teresy Wesołowskiej**



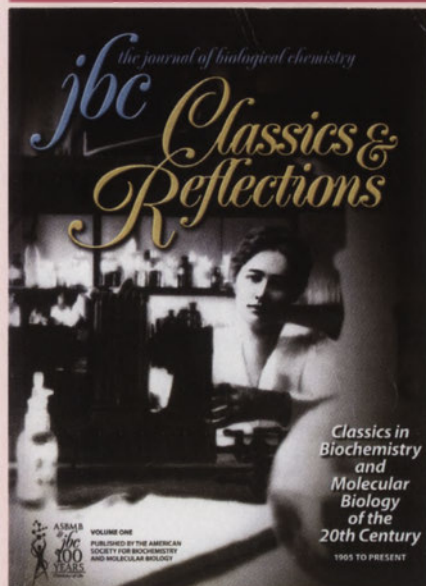
Fotografia 6. Profesor Włodzimierz Kiernożycki.



GENETYKA MOLEKULARNA pod redakcją naukową Piotra Węgleńskiego. Nowe wydanie podręcznika genetyki molekularnej obejmuje najważniejsze działy genetyki, w tym krótki rozdział poświęcony genetyce klasycznej. W podręczniku omówiono podstawowe koncepcje genetyczne i metody analizy genetycznej; budowę, strukturę i fizyczną organizację materiału genetycznego; kod genetyczny i biosyntezę białek; inżynierię genetyczną; budowę i działanie genów prokariotycznych i eukariotycznych; genomikę i proteomikę; geny a różnicowanie się i rozwój; molekularne podłoże chorób odpornościowych; genetyczne podłoże chorób nowotworowych; geny a ewolucja; nowy wspaniały świat biotechnologii. Wydanie 6 zmienione, październik 2006 roku.

BIOLOGIA MOLEKULARNA W MEDYCYNIE. Elementy genetyki klinicznej pod redakcją naukową Jerzego Bala. Podręcznik prezentuje szeroki zakres zastosowań biologii molekularnej w medycynie i genetyce człowieka. Przedstawione są najważniejsze działy medycyny, w których analiza kwasów nukleinowych określa zarówno nowoczesność, jak i wyzwania najbliższych dziesięcioleci. Nowe wydanie obejmuje podstawy genetyki molekularnej; informacje o genomie człowieka i zróżnicowaniu genetycznym populacji ludzkiej; zasady dziedziczenia i zmienności genetycznej; metody badań genomu; diagnostykę molekularną chorób genetycznie uwarunkowanych; podłoże molekularne modelowych chorób dziedzicznych i nowotworowych; główne kierunki w leczeniu chorób genetycznie uwarunkowanych; podstawy farmakogenetyki i immunogenetyki; zasady poradnictwa i profilaktyki chorób genetycznie uwarunkowanych; metodykę analizy DNA w medycynie sądowej; zastosowania biotechnologii w medycynie; wybrane prawne aspekty badań genetycznych człowieka. W podręczniku uwzględniono najnowocześniejsze osiągnięcia z zakresu cytogenetyki molekularnej. Wydanie 2 zmienione, luty 2006 roku.

BIOLOGIA MOLEKULARNA BAKTERII pod redakcją naukową Jadwigi Baj i Zdzisława Markiewicza. Pierwszy i jedyny na rynku polskim nowoczesny podręcznik opisujący w sposób tak dogłębny i kompleksowy bakterie od strony molekularnej. Autorzy, nauczyciele akademicki z Instytutu Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego, opierając się na najnowszych badaniach zapoznają Czytelnika z fascynującym światem bakterii zasiedlających bardzo różnorodne nisze ekologiczne. Obejmuje przegląd aktualnych danych na temat budowy i ich funkcjonowania oraz wybrane zagadnienia wiążące się z ich znaczeniem. Podręcznik zawiera bogaty materiał ilustracyjny oraz wybrane definicje i skróty, co ułatwia Czytelnikowi przyswajanie zawartej w nim wiedzy. Wydanie 1, wrzesień 2006 roku.



Na półki biblioteki Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN trafił w październiku 2006 roku numer specjalny Journal of Biochemical Chemistry (JBC), wydany z okazji stulecia czasopisma. Otrzymaliśmy ten specjalny zeszyt, wydany przez Amerykańskie Towarzystwo Biochemii i Biologii Molekularnej, z rąk profesora Gustava Dallnera, naszego przyjaciela i współpracownika z Karolinska Institute i Arrhenius Laboratory Uniwersytetu Sztokholmskiego. Jesteśmy profesorowi Dallnerowi za to wdzięczni jako, że ów (gruby) zeszyt nie znajduje się w normalnym obiegu i mimo starań nie udało się bibliotece dotąd go zakupić. Przekazując egzemplarze zeszytu JBC bibliotekom Instytutu Biochemii i Biofizyki oraz Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego profesor Dallner dzieli się z naszym środowiskiem swoim prywatnym księgozbiorem, do którego wspomniany zeszyt trafił jako kopia przekazywana członkom FASEB. Dobrze się staje, że ten specjalny zeszyt znajdzie się w obu naszych bibliotekach, zawiera on bowiem zestaw artykułów odzwierciedlających znakomicie historię rozwoju naszej dziedziny. Historia *magistra vitae* – ta prawda dotyczy również nauk ścisłych, toteż ten wykład historii biochemii przyda się w naszych współczesnych laboratoriach, jako nie tylko nauka o rozwoju myśli badawczej, ale i refleksja nad wyborem zagadnień, którym poświęcamy aktualnie uwagę.

Omawiany tom dzieli się na dwie części. Pierwsza to „Reflections”, wypełniona artykułami omawiającymi dzieje biochemii i przypominającymi, że historia biochemii z grubsza dzieli się na trzy fazy. Początkowo, gdy nazywano ją „chemią fizjologiczną”, była to dziedzina analityczna, ściśle związana z medycyną i otoczona lekką pogardą przedstawicieli wielkiej chemicznej szkoły niemieckiej przełomu XIX i XX wieku, którzy ową chemię fizjologiczną nazywali „schmerchemie”. Ale już od lat trzydziestych XX wieku pojawia się w biochemii kwestia poznania przemian związków biologicznych – rodzi się „biochemia dynamiczna”. Rzeczywisty rozwój dziedziny następuje jednak po II wojnie światowej, gdy jej centralnym tematem staje się problem biosyntezy.

Eugene Kennedy w artykule „Hitler’s gift and era of biosynthesis” przypomina, że w 1945 roku, gdy rozpoczął studia doktoranckie na University of Chicago, wiedza na temat syntezy głównych składników komórki (wielocukrów, lipidów, białek, kwasów nukleinowych) była po prostu żadna. Sama kwestia poznania łańcuchów syntez, prowadzących do powstania makromolekuł, postawiona została w istocie przez grupę uczonych wygnanych z Europy przez nazistowski antysemityzm działający w imię zbrodniczych tez rasistowskich. Ową grupę wielkich umysłów przytuliły Stany Zjednoczone i Wielka Brytania. Ich imigrację Kennedy nazywa „Darem Hitlera” dla kultury anglosaskiej. W grupie tej były trzy wielkie osobowości, z którymi Kennedy bezpośrednio zetknął się w trakcie swojej pracy badawczej. Wśród nich na pierwszym miejscu wymienia Fritza Lippmana (ur. w 1899 roku w Królewcu) ucznia Otto Meyerhafa w Kaiser-Wilhelm Institut w Berlinie, uciekiniera z Niemiec, który w swoim laboratorium w Massachusetts General Hospital sformułował pojęcie „wiązań wysokoenergetycznego” i za serię prac prowadzącą do poznania struktury i funkcji acetylokoenzymu A otrzymał w 1953 roku nagrodę Nobla. Istotny wkład w nowe myślenie o biochemii wniósł też Rudolf Schoenheimer (ur. w 1898 roku w Berlinie)

współpracujący z G. Hevesy’em nad stosowaniem izotopów w biologii, po ucieczce do USA, w laboratorium H. Urey’a (odkrywcy deuteru i noblisty), wdrażający stosowanie stabilnych izotopów w badaniu przemian biologicznych. To jemu zawdzięczamy dziś zda się oczywiste, ale wtedy nieznanne stwierdzenie, że składniki makromolekularne komórki znajdują się w ciągłym procesie dynamicznych przemian. Wreszcie do wspomnianej trójki zalicza Kennedy Konrada Blocha (ur. w 1902 roku w Nysie), który w 1934 roku ucieka do Szwajcarii, gdzie w 1936 roku władze odmawiają mu prawa pobytu; przed powrotem do Niemiec i pewną śmiercią ratuje go zaproszenie od H. Clarke z Yale University. Zaproszenie miało postać dwóch listów – pierwszy, formalny, pozwolił na uzyskanie wizy do Stanów, drugi mniej formalny, stwierdził, że Clarke nie ma dla Blocha pieniędzy... (skąd my to znamy...). W Stanach w 1940 roku Bloch podejmuje pracę nad biosyntezą cholesterolu. Kennedy przypomina w tym kontekście, że zaledwie 12 lat przedtem, Windaus w swoim wykładzie noblowskim stwierdził „budowa cholesterolu jest wysoce skomplikowana ... jego synteza dla chemika będzie niezwykle trudna, więc jej nie podejmowałem, jako że szansa na sukces jest nikła Fizjologowie uznają, że organizm zwierzęcy nie jest zdolny do jej przeprowadzenia”. Badania Blocha pozwoliły jednak poznać przebieg syntezy „aktywnego donora izoprenu” i wskazać jak z octanu przez mewalonian, syntetyzowane są sterydy. Bloch wraz z Lynenem otrzymał za te badania w 1964 roku nagrodę Nobla.

Podobna myśl, o owym „darze Hitlera”, pojawia się w artykule Arthura Kornberga „Remembering our teachers”, poświęconym Carlowi i Gerry Cori, absolwentom Wydziału Medycznego Uniwersytetu Karola, uchodzącym do Stanów w 1922 roku przed narastającym antysemityzmem w Czechach. W USA ich badania nad przemianą glikogenu doprowadzają do poznania roli „estru Corich” (glukozy-1-fosforanu) i uwieńczone zostają nagrodą Nobla w 1959 roku. Przez laboratorium Corich przewinęła się cała seria przyszłych noblistów

– S. Ochoa, A. Kornberg, L. Leloir, E. Sutterland, E. Krebs, Ch. de Duve. Ten ostatni wspomina, że gdy tuż po wojnie opublikował prace nad rolą insuliny i chciał je kontynuować w laboratorium Corich, otrzymał od nich suchy list, iż nie zgadzają się z jego hipotezami, ale może odbyć u nich staż.

Uwagę przyciąga też artykuł P. D. Boyera (noblisty z 1997 roku) poświęcony historii badań nad mechanizmem fosforylacji oksydacyjnej. Autor opisuje przebieg poszukiwania pośredników białkowych, historię zwrócenia uwagi na zmiany konformacyjne białek biorących udział w syntezie ATP oraz początkowego odrzucenia teorii chemiosmotycznej Mitchella przez większość badaczy i wreszcie rozpoznania struktury ATPazy mitochondrialnej i mechanizmu jej działania.

Istotną dla samowiedzy o naszym środowisku jest refleksja P. Reicharda „Oswald T. Avery and Nobel prize in medicine”. Autor, członek Komitetu Noblowskiego wyjaśnia, czemu Avery, odkrywca roli DNA jako nośnika genów, nagrody Nobla nie otrzymał mimo, że Komitet dyskutował wielokrotnie nad jego kandydaturą. Zasadniczym powodem było to, że pewni członkowie Komitetu z Karolinska Instytutu zajmujący się kwasami nukleinowymi sami nie umieli dobrze oczyścić DNA od białek i sądzili wobec tego, że oczyszczenie DNA od białek jest praktycznie niemożliwe; należy dodać, że białka były też rozpatrywane jako kandydaci do funkcji nośników genów.

Druga część tomu zatytułowana „Classics”, to wybór z artykułów opublikowanych w ciągu 100 lat w JBC, artykułów, które dziś rozpoznajemy jako najważniejsze w dorobku pisma. Trudno tu omówić wszystkie wybrane artykuły, ale rzeczywiście widać, że w piśmie znalazł swoje odbicie cały rozwój biochemii i biologii molekularnej. To w JBC w 1926 roku J. B. Sumner (nagroda Nobla z chemii za 1946 rok) publikuje serię prac o krystalizacji ureazy, które zostają wówczas ostro skrytykowane przez Wilstättera uważającego, że „czyste” enzymy nie zawierają białka. Badacz ten, sam oczyszczając enzymy, białka przede wszystkim odrzucał. To w JBC ukazuje się pierwsza praca poświęcona krystalografii

TMV (R. Wyckoff, R. Corey, 1936 rok) otwierająca badania krystalograficzne makromolekuł. W JBC ukazuje się też pierwsza reklama spektrofotometru Beckmana DV (35 000 egzemplarzy tego aparatu znalazło się potem w różnych laboratoriach, a na jego kopiach pracowaliśmy swego czasu w Polsce). Tu też znalazły swoje miejsce prace E. E. Snella (1940 rok) omawiające odkrycie, izolację i własności awidyny, A. Waksmana (laureata nagrody Nobla z 1952 roku) i M. Tischlera (1942 rok) poświęcona strukturze aktynomycyny.

W JBC V. du Vigneaud publikuje serię prac poświęconych hormonom peptydowym, zwieńczoną Nagrodą Nobla w 1955 roku, L. Leloir – prace nad strukturami nukleozydów (Nobel za 1970 rok), G. Pallade – oczyszczeniu i mikroskopii elektronowej mitochondriów (Nobel za 1974 rok), G. Wald – prace poświęcone barwnikom wzrokowym i izomerom retinolu (Nobel za 1967 rok).

W JBC A. Kornberg donosi o syntezie DNA przez polimerazę DNA (Nobel za 1959 rok), S. Moore i W. H. Stein przedstawiają serię prac o strukturze rybonukleazy (Nobel za 1972 rok), R. A. Holley opisuje strukturę tRNA^{Ala} (Nobel za 1968 rok), a S. Bergström i B. Samuelson omawiają wyniki swoich badań nad prostaglandynami (Nobel za 1982 rok wraz z J. R. Vane). Przypomniane są także prace E. Chargaffa, podające stosunki molowe między zasadami w cząsteczkach różnych DNA. Jak wspomina Chargaff, który już przedtem był autorem wielu przyjętych do druku w JBC prac, te akurat zostały przez jednego z recenzentów odrzucone, bo ten nie wiedział, dlaczego autor odnosi te stosunki do zawartości molowej dezoksyrybozy, której zdaniem recenzenta w DNA nie ma. Chargaff wspomina, że napisał wtedy do redaktorów JBC rzeczywiście niegrzeczny list. I wreszcie warto wspomnieć, że to w JBC ukazała się praca najczęściej cytowana w literaturze światowej. Jest to artykuł O. H. Lowry’ego i współpracowników (JBC 1951, 193: 265-275) poświęcony metodzie oznaczania stężenia białek, mający do 2004 roku 275 669 cytowań. Tyle, że Lowry też pamięta, że praca w pierwszej wersji została przez redakcję odrzucona i musiał się nieźle natrudzić nad jej skróceniem do jednej trzeciej, a i tak ledwo przeszła.

Bodźcem do omówienia tego wydania JBC jest również to, że kilkaset stron tej książki pochodzi spod pióra autorów-biochemików, będących największymi żyjącymi autorytetami naszej dziedziny nauki. Wielu z nich, twórców tego tomu, pamiętamy jako gości Instytutu Biochemii i Biofizyki, gdy wygłaszali seminaria w sali wykładowej starego budynku przy ul. Rakowieckiej, a także z ich bytności w naszym już nowym gmachu na ul. Pawińskiego w Warszawie. A niemal wszystkich autorów „Refleksji” wspomina wielu pracowników Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, którzy odbywali staże naukowe w kierowanym przez nich laboratoriach i przynosili nam od nich do Kraju nowe idee, kierunki badawcze a także materialną pomoc.

Mysząc o zestawie prac zaliczonych do „Classics” warto zdać sobie sprawę z tego, że to tylko próba czasu określa, która z tysięcy publikacji znajdzie kiedyś swoje miejsce w takim wyborze. W tym znalazły się oczywiście prace, o których dziś wiemy, że legły u źródeł wielkich odkryć. Nie tak się miała sprawa w chwili przyjmowania owych prac do druku, co dowodnie widać we wspomnieniach Chargaffa, Lowry’ego i innych badaczy. I tu oczywiście natychmiast powstaje pytanie o tzw. „naukometrię” czyli ocenę wartości działań naukowych opartą o analizy *a posteriori*. Ciekawe, czy autorzy owych „Classics”, gdy rozpoczynali swoje badania nad zupełnie nieeksplorowanymi uprzednio dziedzinami biosyntezy makrocząsteczek, mieli w swoim dorobku odpowiednio wysoki kumulacyjny współczynnik przebiccia (IF), pozwalający na uzyskanie stosownych wsparć. Chyba nie. Stąd następująca refleksja. Ocena nowych myśli odbywa się w istocie *a priori* i opiera się na czymś co, w przypadku wydawcy czasopisma naukowego, obejmuje elementy takie, jak doświadczenie, znajomość dziedziny, ale i otwartość na nowe i wreszcie coś zupełnie nieuchwytnego – smak naukowy. A w przypadku decydenta – laika, ocena taka winna być przede wszystkim wsparta o szacunek dla opinii środowiskowej.

prof. Włodzimierz Zagórski-Ostoja
prof. Tadeusz Chojnacki

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

Wędrowniki receptorów jonotropowych – do synapsy i z powrotem

STRESZCZENIE

Pobudzająca transmisja synaptyczna w mózgu oparta jest na glutaminianie i angażuje głównie receptory jonotropowe AMPA i NMDA (nazwy pochodzą od selektywnych agonistów receptorów), zazwyczaj współwystępujące w synapsie. Regulacja liczby i właściwości tych receptorów jest ważnym elementem kontroli, zapewniającej właściwe przekazywanie informacji z neuronu do neuronu, ale również przyczynia się do powstawania zmian plastycznych, leżących u podstaw dojrzewania układu nerwowego, uczenia się i pamięci. Receptory glutaminianu nie są statycznymi elementami synapsy, przeciwnie, są dostarczane do i usuwane z błon synaptycznych w sposób regulowany przez aktywność neuronalną, czyli przez stopień pobudzenia elektrycznego neuronu, lub raczej sieci neuronów, wskutek działania specyficznych bodźców. Regulacja przemieszczania się receptorów do synaps jest wieloetapowa i obejmuje transport z siateczki śródplazmatycznej, wędrownkę wzdłuż dendrytów oraz lokalny transport w zakończeniu synaptycznym. Proces ten kontrolują liczne białka, oddziałujące z receptorami poprzez domeny PDZ oraz same receptory, mogące regulować swoją liczebność w synapsie.

WPROWADZENIE

Neurony w układzie nerwowym przekazują między sobą informację dzięki wyspecjalizowanym strukturom – synapsom. W trakcie pobudzenia neuronu z zakończenia presynaptycznego do szczeliny synaptycznej uwalniany jest neuroprzebiegacz, aktywujący specyficzne receptory jonotropowe, w których skład wchodzi kanał jonowy, umiejscowione w błonie postsynaptycznej. Aktywacja tych receptorów powoduje otwarcie tych kanałów, napływ jonów do wnętrza komórki i uruchomienie kaskady procesów w neuronie postsynaptycznym. Istnieją neuroprzebiegacze pobudzające, których uwolnienie wywołuje depolaryzację neuronu postsynaptycznego i jego pobudzenie, oraz hamujące, wywołujące hyperpolaryzację błony i zmniejszenie pobudliwości neuronu. Głównym neuroprzebiegaczem pobudzającym w ośrodkowym układzie nerwowym jest kwas glutaminowy (glutaminian), a hamującym kwas γ -aminomasłowy (GABA). Niezwykłą cechą synaps jest to, że mają zdolność do modyfikacji swojej efektywności. Zjawisko to nosi nazwę plastyczności synaptycznej i leży u podstaw uczenia się i zapamiętywania. Plastyczność synaptyczna polega, w dużym uproszczeniu, na zmianie „siły” synapsy, czyli zwiększenia lub zmniejszenia wydajności przewodzenia impulsów nerwowych, wskutek zmian jej aktywności [1]. Sposób, w jaki dochodzi do wzmocnienia synapsy od wielu lat jest przedmiotem dyskusji. Receptory glutaminianu pośredniczące w transmisji synaptycznej, przykuwają uwagę badaczy, ponieważ ich liczba i właściwości mają przemożny wpływ na efektywność przekazywania pobudzenia. Tradycyjnie uważano, że wystarczającym wyjaśnieniem funkcjonalnych zmian przebiegaczności są modyfikacje tkwiących w błonie postsynaptycznej receptorów, np. fosforylacja, co prowadzi do zmiany ich przewodności, czyli przepuszczalności dla jonów czy powinowactwa do glutaminianu. Badania ostatniej dekady zburzyły ten statyczny obraz synapsy i ujawniły jej dynamiczną strukturę, w której receptory stale krążą między cytoplazmą a błoną postsynaptyczną.

Większa część przebiegaczności z udziałem glutaminianu odbywa się za pośrednictwem dwóch klas receptorów: receptorów AMPA (kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izooksazolo-propionowy), przepuszczalnych dla jonów sodu i potasu oraz receptorów NMDA (kwas N-metylo-D-asparaginowy), przepuszczalnych dodatkowo dla wapnia [2]. Każdy z nich odgrywa nieco inną rolę w przebiegaczności synaptycznej: receptory AMPA biorą udział w podstawowej transmisji synaptycznej, podczas gdy receptory NMDA, przepuszczalne dla jonów wapnia, aktywowane są przy silnym pobudzeniu komórki i są istotnym elementem w indukowaniu zmian plastycznych. Receptory jonotropowe glutaminianu są prawdopodobnie tetramerami, składającymi się z kilku rodzajów podjednostek. Skład podjednostkowy stanowi o właściwościach danego receptora, dlatego też podlega ściśle regulacji [3]. Większość białek receptorów neu-

Dorota Nowicka[✉]

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, Warszawa

[✉]Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, Pracownia Molekularnych Podstaw Plastyczności Mózgu, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: d.nowicka@nencki.gov.pl, tel. (022) 589 23 63

Artykuł otrzymano 4 września 2006 r.

Artykuł zaakceptowano 19 września 2006 r.

Słowa kluczowe: receptor, AMPA, NMDA, synapsa, plastyczność

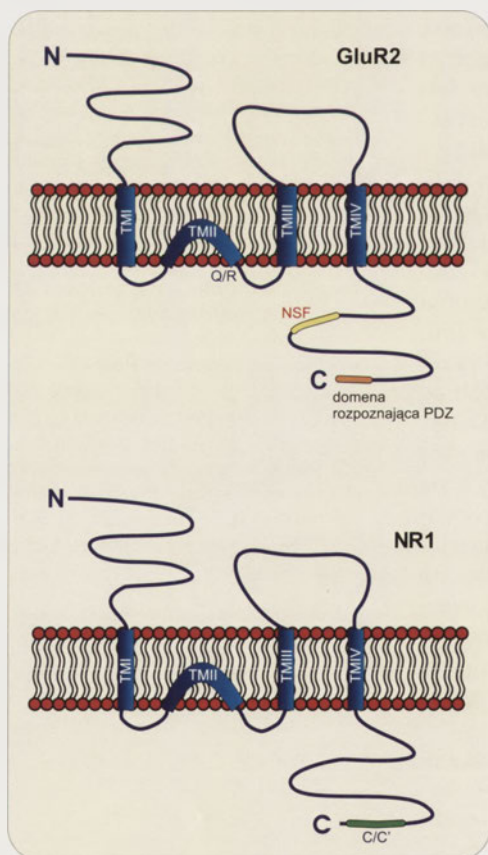
Wykaz skrótów: AMPA – kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izooksazolo-propionowy; BiP – ang. immunoglobulin-binding protein; CASK – ang. calmodulin-associated serine/threonine kinase; COPII – ang. coat protein complex II; ER – siateczka śródplazmatyczna; ERK/MAPK – ang. extracellular signal-regulated kinase/mitogen activated protein kinase; KIF – ang. kinesin family; NMDA – kwas N-metylo-D-asparaginowy; GRIP1/ABP – ang. glutamate receptor interacting protein 1/AMPA binding protein; LTD (ang. long term depression) – długotrwałe osłabienie synaptyczne; LTP (ang. long term potentiation) – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne; NSF – ang. N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein; PDZ – ang. PSD-95, disc large, zona occludens 1; PICK1 – ang. protein interacting with C-kinase-1; PSD-95 – ang. postsynaptic density 95; SAP97 – ang. synapse associated protein 97; SNARE – ang. soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor; TARP – ang. transmembrane AMPA receptor regulatory protein

roprzeznaczonych syntetyzowana jest w ciele neuronu i tam też dochodzi do tworzenia kompleksów receptorowych, które następnie transportowane są do synapsy [4]. Synteza i transport receptorów są procesami, na które składa się wiele etapów. Wydaje się, że każdy z nich może być regulowany w sposób zależny od aktywności neuronalnej i w ten sposób przyczyniać się do powstawania zjawisk plastycznych.

RECEPTORY AMPA

SYNTEZA I EKSPORT Z SIATECZKI ŚRÓDPLAZMATYCZNEJ

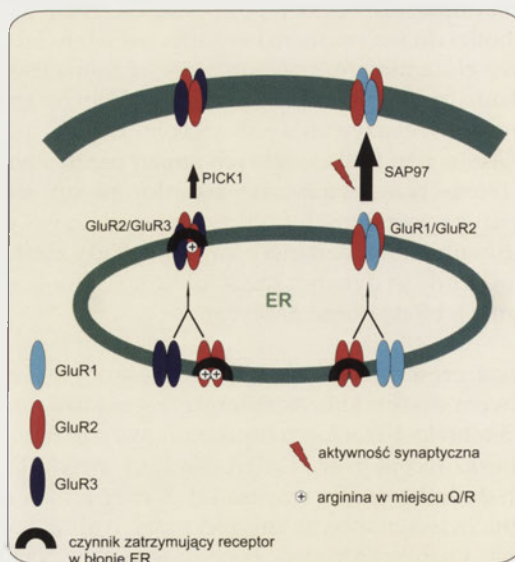
Znane są cztery geny kodujące podjednostki receptora AMPA: GluR1, GluR2, GluR3 i GluR4. Receptory AMPA są heterotetramerami, zbudowanymi prawdopodobnie z czterech podjednostek ułożonych w rozmaitych kombinacjach. Podjednostki receptora charakteryzują się wysokim stopniem homologii i zbliżoną budową [2]. Posiadają dużą domenę N-kończową, zlokalizowaną na zewnątrz komórki, cztery domeny wewnątrz błonowe TM1–TM4 oraz najbardziej zmienną ewolucyjnie domenę C-kończową. Domena TM2, współtworząca kanał receptora, nie penetruje przez całą szerokość błony, stanowiąc raczej hydrofobową pętlę zagłębioną w błonie od strony cytoplazmy (Ryc. 1), przez



Rycina 1. Schemat budowy podjednostki GluR2 receptora AMPA i podjednostki NR1 receptora NMDA. N-koniec obu podjednostek położony jest na zewnątrz komórki, natomiast C-koniec skierowany jest do cytoplazmy. W domenie TM2 podjednostki GluR2 zaznaczono miejsce edytowania (Q/R) odpowiedzialne za regulację przepuszczalności receptora dla jonów wapnia oraz za regulację eksportu receptorów z siateczki śródplazmatycznej. Domena C-kończowa GluR2 zawiera miejsce wiązania czynnika NSF, regulującego egzo- i endocytozę GluR2, oraz sekwencję rozpoznawczą białka z rodziny PDZ. W domenie C-kończowej podjednostki NR1 receptora NMDA zaznaczono miejsce różnicowego składania eksonów C2/C2'.

co C-kończowa domena białka skierowana jest do wewnątrz i stanowi punkt zaczepienia dla innych białek. Podjednostki GluR1 i GluR4 mają długie domeny C-końcowe, natomiast podjednostki GluR2 i GluR3 – krótkie [5].

Z badań nad składem podjednostkowym receptorów z hipokampa mózgu szczura wynika, że najczęściej spotykane kombinacje to GluR1/GluR2 oraz GluR2/GluR3 [6]. Mechanizm łączenia się monomerów w określone kombinacje nie jest dokładnie poznany. Wydaje się, że istotną rolę może tu odgrywać domena N-kończowa, bowiem delecja najbardziej proksymalnej części tej domeny znosi zdolność oligomeryzacji takiego białka [4]. Kompleksy GluR1/GluR2 stosunkowo szybko opuszczają siateczkę śródplazmatyczną i kierowane są do aparatu Golgiego, gdzie ulegają glikozylacji. Natomiast kompleksy GluR2/GluR3 pozostają w siateczce śródplazmatycznej znacznie dłużej. *De facto*, duża pula GluR2 związana z GluR3 (ok. 60 % całkowitego GluR2) zdaje się funkcjonować w siateczce śródplazmatycznej jako stabilna pula niedojrzałych, częściowo tylko glikozylowanych receptorów (Ryc. 2). Co ciekawe, uwięzienie podjednostki GluR2 w siateczce śródplazmatycznej zależy w głównej mierze od jednego tylko elementu – obecności reszty argininy w tzw. miejscu Q/R położonym w regionie uczestniczącym w formowaniu kanału jonowego [7]. Podczas transkrypcji kodon kodujący glutaminę zostaje zamieniony na kodon argininy. Zamiana ta ma ogromny wpływ na właściwości receptora, powoduje bowiem zablokowanie kanału jonowego dla jonów wapnia [8]. Pomiarzy elektrofizjologiczne wskazują, że synaptyczne receptory AMPA są w przeważającej większości nieprzepuszczalne dla wapnia, większość z nich musi więc zawierać podjednostkę GluR2 w formie redagowanej. Być może pula wewnątrzkomórkowa, związana z siateczką śródplazmatyczną, stanowi zapas tej kluczowej dla funkcjonowania receptora podjednostki. Nie jest jeszcze poznane białko, które przetrzymuje GluR2 w siateczce śródplazmatycznej. Badania wykonane metodą koimmunoprecypitacji GluR2 z innymi białkami wykazały



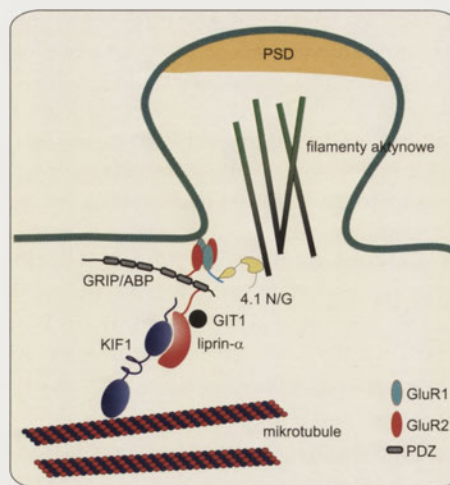
Rycina 2. Selektywny mechanizm eksportu receptorów o różnym składzie podjednostkowym. Receptory GluR1/GluR2, po pobudzeniu neuronu opuszczają bez przeszkód siateczkę śródplazmatyczną (ER) transportowane przez SAP97. Niewielka liczba receptorów GluR2/GluR3 opuszcza siateczkę śródplazmatyczną przy udziale PICK1, większość pozostaje w błonie siateczki śródplazmatycznej, zatrzymana przez lokalne białka szaperonowe, wiążące się z GluR2.

ściśle współwystępowanie tej podjednostki z białkiem BiP (ang. *immunoglobulin binding protein*) i kalneksyną, białkami opiekuńczymi charakterystycznymi dla siateczki śródplazmatycznej, zaangażowanymi w proces kontroli prawidłowego zwijania nowo zsyntetyzowanych białek [9]. Być może białka te, oprócz typowej dla białek opiekuńczych funkcji, odpowiedzialne są również za przetrzymywanie frakcji niedojrzałych receptorów w błonie siateczki śródplazmatycznej, służących jako pula zapasowa. Eksport receptorów AMPA z siateczki śródplazmatycznej zależy również od obecności sekwencji rozpoznających domeny PDZ (ang. *PSD-95, disc large, zona occludens 1*). C-końcowy fragment podjednostki GluR2 wiąże się między innymi z domeną PDZ białka PICK1 (ang. *protein interacting with C-kinase-1*). Białko to, wykrywane zwykle we frakcji synaptosomalnej, wykryto również w siateczce śródplazmatycznej gdzie, jak się wydaje, bierze udział w regulacji wczesnych etapów eksportu receptorów AMPA [10].

Mimo istnienia mechanizmu aktywnie zatrzymującego kompleksy GluR2/GluR3 w siateczce śródplazmatycznej, część tych receptorów eksportowana jest do synapsy. Proces ten ma charakter konstytutywny, jest w dużym stopniu niezależny od aktywności neuronu i służy podtrzymaniu podstawowej transmisji pobudzającej [11]. Natomiast transport receptorów GluR1/GluR2 jest regulowany przez aktywność neuronalną i zależy od pobudzenia receptora NMDA. Sądzi się, że inicjowane przez zwiększoną aktywność neuronu wbudowywanie receptorów GluR1/GluR2 leży u podstaw szybkich zmian plastycznych, których najlepiej opisanym przykładem jest długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP, ang. *long term potentiation*) [12]. C-końców podjednostki GluR1 również zawiera sekwencje wiążące się z domenami PDZ. W przypadku tej podjednostki wykazano, że wiąże się ona z PDZ białka SAP97 (ang. *synapse associated protein 97*) [13]. Jest to jak dotąd jedyne znane białko wiążące się z C-końcową domeną GluR1. Białko SAP97, wykryte początkowo w presynaptycznej części synapsy, jest obecne również w cytoplazmie i współwystępuje z niedojrzałymi, częściowo glikozylowanymi receptorami AMPA w przedziale ER – cis-Golgi [14]. Zmutowanie domeny wiążącej SAP97 w podjednostce GluR1 znosi indukowane aktywnością neuronalną pojawianie się receptorów GluR1/GluR2 w błonie postsynaptycznej, sugerując udział SAP97 w transporcie receptorów do synapsy [15].

TRANSPORT RECEPTORÓW WZDŁUŻ DENDRYTÓW I W KOLCACH DENDRYTYCZNYCH

Większość mRNA kodującego podjednostki receptorów glutaminianu znajduje się w ciele neuronu. Tam też dochodzi do syntezy białka, tworzenia kompleksów receptorowych i ich dojrzewania w aparacie Golgiego. Gotowy receptor musi być więc przetransportowany, czasem na dużą odległość, wzdłuż dendrytów. Pęcherzyki błonowe zawierające receptory AMPA są aktywnie transportowane wzdłuż dendrytów przez białka motoryczne z rodziny kinazy (Ryc. 3) [16]. Szczegółowy mechanizm tego zjawiska nie jest jeszcze opisany. Prawdopodobnie uczestniczy w nim białko GRIP1/ABP (ang. *glutamate receptor interacting protein 1/AMPA binding protein*), należące do większej rodziny białek zawierających kilka domen PDZ. W dużej ilości występuje w synapsach, ale znajdowane jest również w pę-



Rycina 3. Transport receptorów AMPA wzdłuż włókien cytoskieletu. Ruch receptorów AMPA wzdłuż mikrotubul wymaga interakcji pomiędzy C-końcem podjednostki GluR2 i domeną PDZ białka GRIP/ABP, które z kolei oddziałuje z kinazy KIF1 poprzez białko *liprin-α*. W kolcach dendrytycznych, które nie zawierają mikrotubul ruch receptorów odbywa się wzdłuż filamentów aktynowych za pośrednictwem białek 4.1N/G.

cherzykach opuszczających aparat Golgiego, gotowych do dalszego transportu. GRIP1/ABP rozpoznaje podjednostki GluR2, GluR3, oraz GluR4, jak również ma zdolność bezpośredniego wiązania kinazy [17,18]. Takie potrójne kompleksy GluR2, GRIP1/ABP/kinazy wykrywa się metodą koimmunoprecypitacji w lisatach z mózgu. Do kompleksu GRIP1/ABP/GluR2 przyłącza się też białko *liprin-α*, rozpoznające specyficzną neuronalnie kinazę KIF1A (ang. *kinasin family protein 1A*) oraz białko GIT1, wiążące się z kolei z *liprin-α* [19-21]. Jego funkcja w transporcie kompleksu jest niejasna, niemniej jednak zaburzenie oddziaływania tego białka z *liprin-α* powoduje znaczący spadek poziomu synaptycznych receptorów AMPA [19].

Końcowy etap wędrówki wzdłuż włókien cytoskieletu odbywa się w kolcach dendrytycznych, na których umiejscowiona jest większość synaps pobudzających. Kolce dendrytyczne nie zawierają mikrotubul, receptory transportowane są więc wzdłuż włókien aktynowych. Mechanizm tego transportu jest bardzo słabo poznany, wiadomo jednak, że depolimeryzacja aktyny powoduje zaburzenia w dostarczaniu receptorów do synapsy [22]. Prawdopodobnym pośrednikiem między receptorem AMPA a cytoskieletem aktynowym są adaptorowe białka 4.1N i 4.1G, kotwiczące rozmaite białka do szkieletu aktynowego. Mają one zdolność wiązania się z podjednostką GluR1 i GluR4 w C-końcowej części tych białek [23]. Wykazano, że prawidłowe funkcjonowanie białka 4.1N jest warunkiem pojawienia się receptorów AMPA na powierzchni błony postsynaptycznej [23], jednak molekularne podstawy tego zjawiska wymagają dalszych badań.

WBUDOWYWANIE SIĘ RECEPTORÓW AMPA DO BŁONY POSTSYNAPTYCZNEJ

Ostatnim etapem na długiej drodze receptorów do synapsy jest ich wbudowanie w błonę postsynaptyczną. Jest to proces niezwykle dynamiczny. Wydaje się, że przynajmniej część receptorów podlega naprzemiennej egzocytozie i internalizacji [24]. Kierowanie receptorów do błony postsy-

napływającej odbywa się na drodze oddziaływania domeny C-końcowej podjednostek receptorowych z wieloma białkami. Jak już wspomniano, receptory GluR1/GluR2 docierają do synapsy w odpowiedzi na pobudzenie komórki dzięki oddziaływaniom z białkiem SAP97, natomiast receptory GluR2/GluR3 korzystają z innego mechanizmu transportowego, angażującego PICK1-GRIP1/ABP. Jak się wydaje, białka te uczestniczą także w końcowym etapie transportu receptorów do błony oraz ich stabilizacji [10] (Ryc. 4). Ponieważ zawierają one wiele domen PDZ, mogą służyć jako pomosty łączące receptory z wieloma innymi białkami, np. białkami rusztowania (ang. *scaffolding proteins*) lub kinazami, fosforylującymi receptory i w ten sposób wpływającymi na ich właściwości.

Oprócz wyżej wspomnianych, również inne białka wykrywane są w kompleksach z receptorami AMPA. Należą do nich NSF (ang. *N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein*), stargazyna (ang. *stargazin*), obecne w zagęszczeniu postsynaptycznym (PSD, ang. *postsynaptic density*). NSF, ATPaza zaangażowana w procesy fuzji błon plazmatycznych wiąże się bezpośrednio z podjednostką GluR2 [25]. Z drugiej strony posiada też zdolność oddziaływania z kompleksami białkowymi SNARE (ang. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*), obecnymi w części postsynaptycznej synapsy, do których należy vSNARE na pęcherzykach i tSNARE na błonie docelowej. Zniszczenie kompleksów SNARE, np. przy użyciu botuliny podanej do zakończenia postsynaptycznego, wywołuje znaczący spadek transmisji synaptycznej zależnej od receptorów AMPA [26], a zablokowanie wiązania NSF i podjednostki GluR2 powoduje zmniejszenie powierzchniowej ekspresji receptorów AMPA oraz zależnej od nich transmisji [27,28]. Wszystkie te obserwacje wskazują na uzależnienie obecności funkcjonalnych receptorów AMPA w synapsie od procesów fuzji błon plazmatycznych, a więc od egzocytozy.

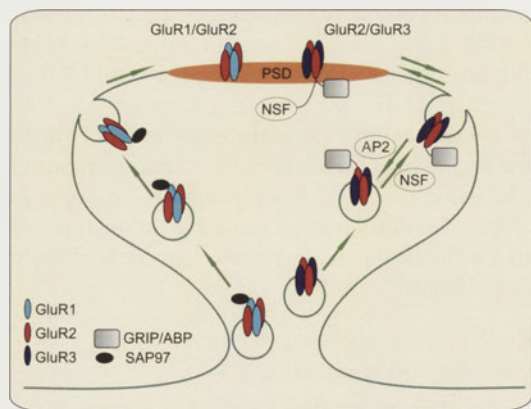
W dostarczaniu receptorów AMPA do błony postsynaptycznej prawdopodobnie bierze również udział stargazyna oraz jej homologi tworzące rodzinę TARP (ang. *transmembrane AMPAR regulatory proteins*) [29]. Białka te niewybiórczo wiążą się ze wszystkimi znanymi podjednostkami receptora AMPA oraz z domeną PDZ białka PSD-95 (ang. *post-synap-*

tic density-95), niezwykle istotnym składnikiem zagęszczenia postsynaptycznego, tworzącym jego rusztowanie [29]. Powiązanie receptorów z PSD-95 poprzez stargazynę jest niezbędne, aby pojawić się mogły w błonie postsynaptycznej [30]. Pozbawienie stargazyny ostatnich czterech aminokwasów rozpoznających domenę PDZ w białku PSD-95 powoduje, że receptory AMPA pojawiają się, co prawda, na powierzchni komórki, ale poza obszarem synapsy. Ciekawe, że stargazyna wykrywana jest w towarzystwie receptorów AMPA również na wczesnych etapach ich biosyntezy, o czym świadczy jej współwystępowanie z niedojrzałymi, częściowo glikozylowanymi podjednostkami [29].

Nie jest jasne jak te dwa mechanizmy, selektywny w stosunku do podjednostek receptora oraz nieselektywny, współpracują ze sobą w procesie regulacji liczby receptorów AMPA w synapsie. Sugeruje się, że mechanizm nieselektywny, zależny od białek TARP miałby nadrzędną funkcję zapewniając stały dopływ receptorów gotowych do wbudowania w błonę postsynaptyczną, natomiast mechanizm selektywny mógłby decydować o konkretnym składzie podjednostkowym i w efekcie o właściwościach biofizycznych receptorów oraz plastyczności [29].

USUWANIE RECEPTORÓW AMPA Z SYNAPSY

Usuwanie receptorów z błony postsynaptycznej jest tak samo istotnym etapem regulacji siły synapsy i plastyczności synaptycznej jak ich inkorporacja. Stwierdzono, że określona pula receptorów ulega ciągłej rotacji. Sądzi się, że zarówno konstytutywna jak i stymulowana internalizacja receptorów zachodzi na drodze mechanizmu zależnego od klatryny, typowego dla wielu białek błonowych [31]. Konstytutywny obrót receptorów jest nieselektywny w stosunku do podjednostek receptora i dotyczy zarówno GluR1 i GluR2/3 [31]. Ciekawe, że eksperymentalna ingerencja w procesy endocytozy nie obniża liczby receptorów AMPA w błonie postsynaptycznej, sugerując istnienie mechanizmu współkontrolującego endo- i egzocytozę, zabezpieczającego obecność stałej liczby receptorów w błonie i tym samym transmisję synaptyczną przed zaburzeniami [32]. Regulowana endocytoza, prowadząca do zmiany poziomu receptorów w błonie wydaje się zależeć również od aktywności synaptycznej i pobudzenia receptorów AMPA lub NMDA, lub też od działania innych czynników. Wykazano np., że w warunkach doświadczalnych insulina wywołuje endocytozę receptorów, nie wpływając jednocześnie na proces egzocytozy, co skutkuje zmniejszeniem liczby receptorów AMPA na powierzchni i osłabieniem transmisji synaptycznej [31]. Taki mechanizm być może leży u podstaw niektórych procesów plastycznych, takich jak np. długotrwałe osłabienie synaptyczne (LTD) [6,11]. Regulowana insulinią endocytoza wydaje się być procesem wybiórczym w stosunku do składu podjednostkowego i dotyczy określonej puli receptorów zawierających podjednostkę GluR2. Opiera się na oddziaływaniach białka NSF z jej C-końcem [31]. W postaci związanej z GluR2, NSF stabilizuje receptory AMPA w błonie postsynaptycznej. W regulacji endocytozy uczestniczy również PICK1, którego obecność stymuluje internalizację kompleksów receptorowych. Białko PICK1 ma zdolność wiązania kinazy C. W kompleksie z PICK1/GluR2 kinaza C fosforyluje podjednostkę GluR2 i blokuje jej od-



Rycina 4. Lokalny transport receptorów AMPA w synapsie. Receptory GluR1/GluR2 docierają do synapsy za pośrednictwem białka SAP97. Receptory GluR2/GluR3 związane z białkiem GRIP/ABP są wbudowywane w błonę do błon przy udziale czynnika NSF. NSF konkuruje o miejsce wiązania z AP2, odpowiedzialnym za internalizację tych receptorów.

działanie z GRIP/ABP mającym zdolność utrzymania receptorów AMPA w błonie. Oddziaływanie PICK1-GluR2 jest regulowane przez czynnik NSF. Związanie czynnika z podjednostką GluR2 indukuje jego aktywność ATPazową i powoduje dysocjację kompleksu PICK1-GluR2, umożliwienie wiązania GRIP/ABP i stabilizację receptorów w błonie postsynaptycznej [33]. Odłączenie NSF, oprócz opisanych powyżej skutków, prawdopodobnie prowadzi również do odblokowania miejsca wiązania kompleksu adaptorowego AP2, który inicjuje zależną od klatryny szybką endocytozę receptorów [34].

Wydaje się jednak, że procesy endo- i egzocytozy nie zachodzą bezpośrednio w obrębie zagęszczenia synaptycznego. Receptory AMPA mają zdolność dyfuzji bocznej w błonie plazmatycznej. Stymulacja neuronów glutaminianem zwiększa ich ruchliwość w błonie i redukuje zlokalizowaną w synapsie stabilną, mało ruchliwą pulę receptorów na korzyść ruchliwych receptorów pozasynaptycznych [35]. Również podczas LTD, obserwuje się przyspieszoną dyfuzję receptorów z synapsy do okolic przylegających, a następnie dopiero ich internalizację na drodze endocytozy. Hipotezę tę potwierdza odkrycie „gorących plam” endocytozy zlokalizowanych w pobliżu zagęszczenia postsynaptycznego [36]. To może wskazywać na udział dyfuzji bocznej receptorów w regulacji ich liczby podczas procesów plastycznych. Mechanizmy regulujące dyfuzję boczną receptorów nie są jeszcze wyjaśnione. Wydaje się jednak, że istotną rolę może tu odgrywać lokalne stężenie wapnia. Wiadomo bowiem, że wzrost jego stężenia prowadzi do zmniejszenia ruchliwości receptorów w błonie cytoplazmatycznej, być może poprzez modyfikację oddziaływań receptora i białka rusztowania, lub poprzez wpływ na organizację cytoszkieletu podbłonowego [35].

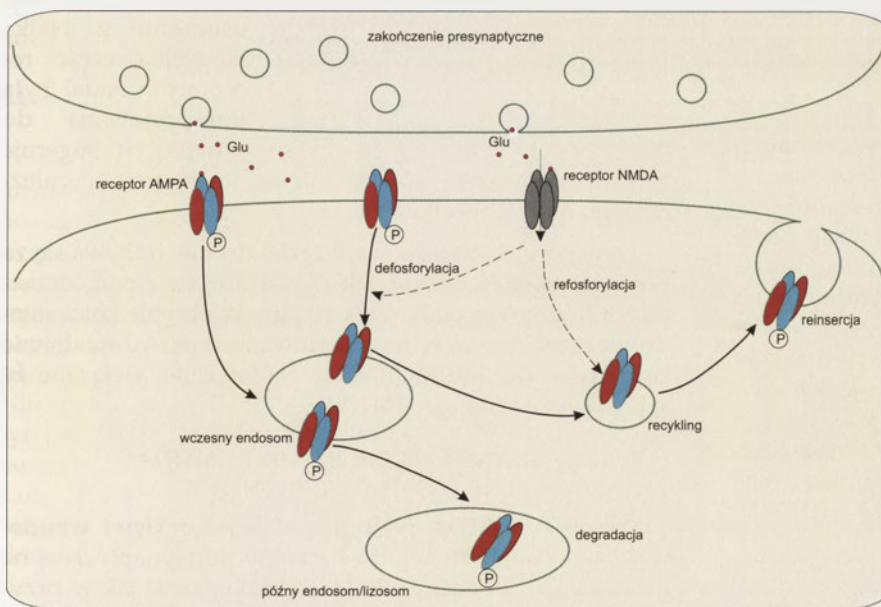
Dalsze losy receptorów, które uległy internalizacji zależą od stopnia pobudzenia neuronu. W warunkach podstawowej transmisji synaptycznej (kiedy receptory NMDA są

w dużej mierze nieaktywne) większość internalizowanych receptorów ulega ponownemu wbudowaniu do błony synaptycznej. W przypadku silnego pobudzenia synapsy aktywacji ulegają zarówno receptory AMPA jak i NMDA. W badaniach przeprowadzonych na hodowlach neuronów stwierdzono, że w przypadku pobudzenia receptorów AMPA powrót receptorów do błony jest bardzo powolny i nie wszystkie receptory ponownie są wbudowywane w błonę, podczas gdy pobudzenie receptorów NMDA powoduje gwałtowny i niemal całkowity powrót internalizowanych receptorów AMPA do błony (Ryc. 5). Niezależnie od tego, przez jaki receptor wywołana została internalizacja receptorów, trafiają one do wczesnego endosomu. Stamtąd receptory internalizowane wskutek pobudzenia receptora AMPA trafiają do późnego endosomu i do kompartmentu lizosomalnego, a receptory internalizowane po pobudzeniu receptora NMDA ulegają recyklingowi. Procesowi internalizacji receptora AMPA po pobudzeniu przez receptory NMDA towarzyszy szybka defosforylacja podjednostki GluR1, po której następuje jej szybka ponowna fosforylacja, skorelowana z kolei z powtórным wbudowaniem receptora w błonę [32]. Sugeruje to prostą regulację wędrówki receptora poprzez jego fosforylację.

RECEPTORY NMDA

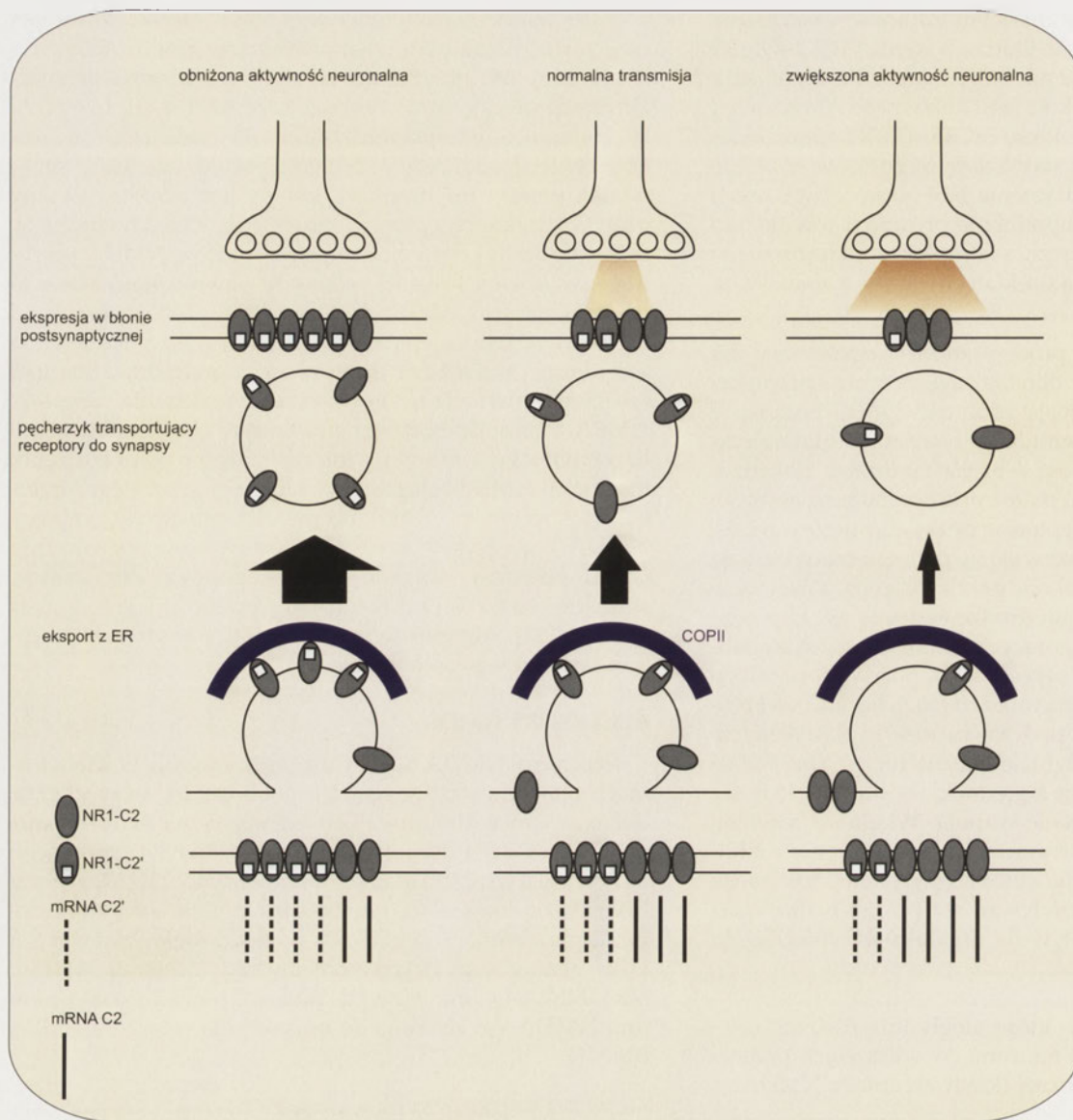
Receptory NMDA odgrywają kluczową rolę w wielu formach plastyczności mózgu. Ich pobudzenie jest niezbędne dla powstania długotrwałego wzmocnienia synaptycznego LTP, ale i dla długotrwałego osłabienia synaptycznego LTD w większości zbadanych sieci neuronów [1]. Receptory NMDA zbudowane są, podobnie jak inne receptory jonotropowe glutaminianu, z czterech podjednostek. Znanych jest kilka genów kodujących podjednostki receptora NMDA: NR1, NR2A-D, oraz NR3 [2]. Budowa podjednostek receptora NMDA jest zbliżona do opisanej dla receptora AMPA (Ryc. 1).

EKSPORT RECEPTORÓW NMDA Z ER



Rycina 5. Sortowanie internalizowanych receptorów AMPA. Po pobudzeniu receptorów AMPA glutaminianem internalizowane receptory kierowane są do późnego endosomu i w efekcie do degradacji. Stymulacja receptora NMDA wywołuje internalizację receptorów AMPA, po której następuje szybkie powtórne ich wbudowanie.

Pierwszy etap regulacji receptorów NMDA odbywa się już na etapie transkrypcji i zależy od pobudzenia neuronu, a polega na alternatywnym włączaniu bądź wyłączaniu (ang. *alternative splicing*) eksonu 22 z sekwencji mRNA kodującego podjednostkę NR1. W sytuacji zablokowania aktywności neuronalnej ekson 22 jest usuwany z pre-mRNA NR1, co skutkuje syntezą podjednostki NR1 zawierającej tzw. domenę C2' w C-końcowej części sekwencji NR1. Natomiast silne pobudzenie neuronu inicjuje włączenie eksonu 22 i zmianę sekwencji C-końcowej na taką, która koduje domenę C2. Domena C2' zawiera sekwencje ułatwiające uwalnianie NR1 z siateczki śródplazmatycznej poprzez wiązanie kompleksu COPII (ang. *coat protein complex II*) i kierowanie receptora do miejsc, z których uwalniane są pęcherzyki migrujące następnie do dalszych przedziałów błonowych [37,38]. W sytuacji niskiego pobudze-



Rycina 6. Model zależnego od aktywności eksportu receptorów NMDA z siateczki śródplazmatycznej (ER). Przy niskiej aktywności neuronalnej w wyniku różnicowego składowania mRNA NR1 powstają formy NR1-C2', sprzyjające szybkiemu eksportowi podjednostki NR1 z siateczki śródplazmatycznej. Stymulacja neuronu przesuwa równowagę na korzyść form C2, zatrzymywanych w siateczce śródplazmatycznej.

nia neuronalnego mamy więc do czynienia ze zwiększonym uwalnianiem receptora NMDA z siateczki śródplazmatycznej. Prawdopodobnie prowadzi to do zwiększenia dostępności receptora dla inkorporacji w błony postsynaptyczne i tym samym przyczynia się do utrzymania homeostazy. Podobnie, mechanizm ten działa w odwrotnym kierunku (Ryc. 6). Sposób, w jaki aktywność neuronalna wpływa na obróbkę mRNA NR1 nie jest poznany. Sugeruje się tu udział kinaz białkowych, które regulują zarówno różnicowe składowanie jak i liczbę receptorów NMDA w synapsie. Wydaje się, że kinaza białkowa A i kinaza białkowa C mają zdolność synergistycznej fosforylacji, stymulującej opuszczenie siateczki śródplazmatycznej przez podjednostkę NR1 [37].

TRANSPORT RECEPTORÓW NMDA Z ER DO SYNAPSY

Jak wynika z badań nad receptorami AMPA, w transporcie receptorów glutaminianu z siateczki śródplazmatycznej do synapsy istotną rolę odgrywa cytoplazmatyczna

domena C-końcowa podjednostek receptorowych, oddziałująca z domenami PDZ białek wspomagających transport. Podjednostka NR1 posiada raczej krótki C-końiec, w dodatku najczęściej spotykany wariant nie zawiera żadnej domeny PDZ. Natomiast podjednostki NR2 mają długie C-końcowe domeny, mające zdolność rozpoznawania domen PDZ. Dane eksperymentalne potwierdziły teoretyczne przewidywania i wykazały, że homomeryczne receptory NR1 pozostają w ER, natomiast podjednostki NR2 przemieszczają się do synaps [39]. Co więcej, heteromeryczne receptory NR1/NR2 również ulegają translokacji, co świadczy o zdolności podjednostek NR2 do uwalniania NR1 z uwięzi. Potwierdziły się też przypuszczenia o istotnej roli domen PDZ podjednostek NR2 w tym procesie, aczkolwiek po ich usunięciu z białka niewielka część receptorów nadal była transportowana do synaps, co sugeruje

istnienie dodatkowego mechanizmu transportu, niezależnego od oddziaływań z PDZ [39].

Transport receptorów wzdłuż dendrytów odbywa się za pośrednictwem kinezy KIF17 wiążącej się z podjednostką NR2B poprzez białko LIN 10 [40]. W obrębie kolca dendrytycznego receptory transportowane są prawdopodobnie przez miozyny lub inne białka motoryczne, związane ze szkieletem aktynowym [41].

LOKALNY TRANSPORT RECEPTORÓW NMDA W ZAKOŃCZENIU POSTSYNAPTYCZNYM

Receptory NMDA podlegają stałemu cyklowi wbudowywania i internalizacji do i z błony postsynaptycznej na drodze egzo- i endocytozy [42]. Analogicznie jak w przypadku receptorów AMPA, liczba receptorów NMDA jest wynikiem ustalonej równowagi między szybkościami z jakimi zachodzą te procesy. Co więcej, równowaga ta jest

wyraźnie zależna od aktywności neuronalnej. Kinaza białkowa C sześciokrotnie zwiększa tempo inkorporacji receptorów NMDA w błony na drodze egzocytozy regulowanej przez kompleksy SNARE [43]. W błonie postsynaptycznej receptory NMDA zakotwiczone są poprzez białka rusztowania zagęszczenia postsynaptycznego. Podjednostki NR2 mają zdolność wiązania się z domeną PDZ białka PSD-95 [44]. Poprzez PSD-95 receptory NMDA mają możliwość oddziaływać z kompleksem sygnałowym, obejmującym m.in. syntazę tlenu azotu i synGAP (ogniwo łączące receptor NMDA z kaskadą ERK/MAPK) [45-47].

Endocytoza receptorów NMDA również jest regulowana przez aktywność synaptyczną. Niskoczęstotliwościowa stymulacja, pobudzenie receptorów metabotropowych glutaminianu czy związanie liganda – wszystkie te procesy stymulują wiązanie receptora z kompleksem AP2 i internalizację receptora [37]. Egzocytoza i endocytoza receptorów NMDA, podobnie jak AMPA, zachodzi w wyspecjalizowanych obszarach położonych pozasynaptycznie [36,48]. Receptory w położeniu pozasynaptycznym stanowią ruchliwą pulę, łatwo dostępną w razie potrzeby.

Nie tylko liczba, ale i skład podjednostkowy receptora NMDA jest modyfikowany w procesie lokalnego transportu w synapsie. Insercja podjednostek NR2B ma charakter konstytutywny i nie wymaga aktywności synaptycznej, podczas gdy podjednostka NR2A pojawia się w synapsie po pobudzeniu neuronu [39]. Również internalizacja podjednostek na drodze endocytozy zachodzi z różną wydajnością, podjednostki NR2A i NR2B mają bowiem różniące się między sobą sekwencje rozpoznawane przez kompleks AP2, mające różne do niego powinowactwo [42,49]. Rzeczywiście, endocytoza podjednostki NR2B zachodzi szybciej niż NR2A [42]. Podjednostki NR2B są znacznie częściej wykrywane w położeniu pozasynaptycznym, co również przyczyniać się może do zwiększenia tempa internalizacji. Po endocytozie pęcherzyki zawierające podjednostki NR2A kierowane są najczęściej do późnego endosomu i przeznaczone do degradacji, natomiast pęcherzyki niosące podjednostkę NR2B podlegają recyklingowi [49].

RECEPTORY KAINIANOWE

W przeciwieństwie do receptorów AMPA, które uczestniczą w głównej transmisji synaptycznej, receptory kainianowe są odpowiedzialne raczej za regulowanie aktywności sieci neuronalnych [50]. Pełnią rozmaite funkcje w neuronach, zależnie od miejsca, w którym są zlokalizowane. Receptory kainianowe znajdują się w synapsach lub perisynaptycznie, występują też presynaptycznie, gdzie działają jako autoreceptory regulujące wydzielanie glutaminianu. Nie stwierdzono żadnej specyficzności co do pre- lub postsynaptycznej lokalizacji poszczególnych typów podjednostek. Molekularny mechanizm sortowania receptorów kainianowych do aksonów lub dendrytów ciągle pozostaje nieznanym. Receptor kainianowy jest tetramerem, w którego skład mogą wchodzić podjednostki GluR5, GluR6, GluR7, KA1 i KA2 [51]. Dodatkowe urozmaicenie wprowadza różnicowe cięcie i składanie mRNA, stwierdzone w przypadku podjednostek GluR5-7, oraz edycja mRNA [2]. Budowa podjednostki receptora kainianowego jest bardzo zbliżona

do podjednostek innych receptorów glutaminianu, z wewnątrzplazmatyczną częścią N-końcową i C-końcowym cytoplazmatycznym ogonem.

Podobnie jak inne receptory glutaminianu, tetramery receptorów kainianowych składane są już w siateczce śródplazmatycznej [52]. O eksporcie z siateczki śródplazmatycznej, a raczej o zatrzymaniu podjednostki receptorowej w przedziale wewnątrzkomórkowym decyduje obecność określonej sekwencji białkowej w C-końcowej domenie receptora. Wykryto takie sekwencje w podjednostkach KA1 i GluR5c (jeden z wariantów różnicowego składania). W kompleksach homomerycznych podjednostki te nie opuszczają ER [53,54]. Opuszczają one siateczkę śródplazmatyczną dzięki podjednostce GluR6a, która zarówno w kompleksach homojak i heteromerycznych łatwo opuszcza siateczkę śródplazmatyczną [53]. Pojawianie się receptorów w synapsie regulowane jest przez oddziaływania C-końcowych domen podjednostek receptora z domenami PDZ innych białek. Co ciekawe, zablokowanie oddziaływań C-końca z PDZ nie zaburza transportu receptorów z siateczki śródplazmatycznej, ma natomiast wpływ na ich wbudowywanie się w błonę komórkową. Świadczy to o odrębnych mechanizmach regulujących transport receptorów na wczesnym i końcowym etapie. Podjednostka GluR6a, zarówno *in vitro* jak *in vivo* ma zdolność rozpoznawania takich białek jak PSD-95, SAP97, SAP102 (ang. *102kDa synapse associated protein*), CASK (ang. *calmodulin-associated serine/threonine kinase*), synteniny oraz wspomnianych już GRIP i PICK1 [50]. Również podjednostka GluR5 wiąże GRIP i PICK1 [55]. Podjednostka GluR6 dodatkowo ma zdolność oddziaływania z kompleksami adhezyjnymi kadheryna - katenina, występującymi szczególnie licznie w obszarach perisynaptycznych. Być może oddziaływania GluR6 z tymi białkami odpowiedzialne są za kierowanie receptorów kainianowych do tych właśnie okolic [56].

Liczba receptorów kainianowych regulowana jest na drodze endocytozy. W warunkach podstawowej transmisji synaptycznej część receptorów podlega internalizacji. Zwiększenie aktywności komórki znacznie przyspiesza tempo tego procesu. Losy pęcherzyków endocytotycznych są uzależnione od sposobu pobudzenia komórki. Jeśli endocytoza receptorów kainianowych zachodzi wskutek pobudzenia receptora NMDA, receptory szybko wracają do błony. Natomiast aktywacja samych receptorów kainianowych (aktywacja ligandem) prowadzi do ich szybkiej degradacji w lizosomach [57].

PODSUMOWANIE

Mimo ogromnego postępu dokonanego w ciągu ostatniej dekady, wiedza na temat mechanizmów regulacji przekaznictwa synaptycznego i roli receptorów w plastyczności układu nerwowego ciągle jest wyrzywkowa. Wiele pytań pozostaje jeszcze otwartych: jakie inne białka oddziałują z receptorami i jaki mają wpływ na ich funkcję? Czy mechanizmy regulacji receptorów są dla wszystkich rodzajów neuronów jednakowe? Jakie znaczenie dla przekaznictwa i plastyczności mają receptory kainianowe? Niezbędne są badania opisujące szczegółowo, słabo jak dotąd poznane, początkowe etapy transportu, w odróżnieniu od tych za-

chodzących w synapsie oraz opisanie maszynerii bezpośrednio uczestniczącej w transporcie receptorów. Z drugiej strony, niezbędne są badania przeprowadzone na bardziej fizjologicznych modelach. Należy pamiętać, że większość danych pochodzi z eksperymentów przeprowadzonych w najlepszym wypadku na hodowlach pierwotnych neuronów, a głównie z badań nad ekspresją rekombinowanych receptorów w komórkach nieneuronalnych. Czy wszystkie dane uzyskane z tych badań zostaną potwierdzone *in vivo* – pozostaje nadal nierozstrzygniętą kwestią.

PIŚMIENNICTWO


- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51: 7-61
- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280: 1596-1599
- Leuschner WD, Hoch (1999) W Subtype-specific assembly of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits is mediated by their n-terminal domains. *J Biol Chem* 274: 16907-16916
- Passafaro M, Piech V, Sheng M (2001) Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4: 917-926
- Bredt DS, Nicoll RA (2003) AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* 40: 361-379
- Greger IH, Khatri L, Ziff EB (2002) RNA editing at arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. *Neuron* 34: 759-772
- Sommer B, Kohler M, Sprengel R, Seeburg PH (1991) RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67: 11-19
- Rubio ME, Wenthold RJ (1999) Calnexin and the immunoglobulin binding protein (BiP) coimmunoprecipitate with AMPA receptors. *J Neurochem* 73: 942-948
- Esteban JA (2003) AMPA receptor trafficking: a road map for synaptic plasticity. *Mol Interv* 3: 375-385
- Gomes AR, Correia SS, Carvalho AL, Duarte CB (2003) Regulation of AMPA receptor activity, synaptic targeting and recycling: role in synaptic plasticity. *Neurochem Res* 28: 1459-1473
- Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT (2004) Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5: 952-962
- Leonard AS, Davare MA, Horne MC, Garner CC, Hell JW (1998) SAP97 is associated with the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit. *J Biol Chem* 273: 19518-19524
- Sans N, Racca C, Petralia RS, Wang YX, McCallum J, Wenthold RJ (2001) Synapse-associated protein 97 selectively associates with a subset of AMPA receptors early in their biosynthetic pathway. *J Neurosci* 21: 7506-7516
- Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R (2000) Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287: 2262-2267
- Goldstein LS, Yang Z (2000) Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci* 23: 39-71
- Setou M, Seog DH, Tanaka Y, Kanai Y, Takei Y, Kawagishi M, Hirokawa N (2002) Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature* 417: 83-87
- Srivastava S, Osten P, Vilim FS, Khatri L, Inman G, States B, Daly C, DeSouza S, Abagyan R, Valtchanoff JG, Weinberg RJ, Ziff EB (1998) Novel anchorage of GluR2/3 to the postsynaptic density by the AMPA receptor-binding protein ABP. *Neuron* 21: 581-591
- Wyszynski M, Kim E, Dunah AW, Passafaro M, Valtchanoff JG, Serra-Pages C, Streuli M, Weinberg RJ, Sheng M (2002) Interaction between GRIP and liprin-alpha/SYD2 is required for AMPA receptor targeting. *Neuron* 34: 39-52
- Ko J, Kim S, Valtchanoff JG, Shin H, Lee JR, Sheng M, Premont RT, Weinberg RJ, Kim E (2003) Interaction between liprin-alpha and GIT1 is required for AMPA receptor targeting. *J Neurosci* 23: 1667-1677
- Shin H, Wyszynski M, Huh KH, Valtchanoff JG, Lee JR, Ko J, Streuli M, Weinberg RJ, Sheng M, Kim E (2003) Association of the kinesin motor KIF1A with the multimodular protein liprin-alpha. *J Biol Chem* 278: 11393-11401
- Kim CH, Lisman JE (2001) A labile component of AMPA receptor-mediated synaptic transmission is dependent on microtubule motors, actin, and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *J Neurosci* 21: 4188-4194
- Shen L, Liang F, Walensky LD, Hagan RL (2000) Regulation of AMPA receptor GluR1 subunit surface expression by a 4. 1N-linked actin cytoskeletal association. *J Neurosci* 20: 7932-7940
- Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25: 103-126
- Song I, Kamboj S, Xia J, Dong H, Liao D, Hagan RL (1998) Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron* 21: 393-400
- Lledo PM, Zhang X, Sudhof TC, Malenka RC, Nicoll RA (1998) Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. *Science* 279: 399-403
- Nishimune A, Isaac JT, Molnar E, Noel J, Nash SR, Tagaya M, Collingridge GL, Nakanishi S, Henley JM (1998) NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* 21: 87-97
- Noel J, Ralph GS, Pickard L, Williams J, Molnar E, Uney JB, Collingridge GL, Henley JM (1999) Surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons is regulated by an NSF-dependent mechanism. *Neuron* 23: 365-376
- Nicoll RA, Tomita S, Bredt DS (2006) Auxiliary subunits assist AMPA-type glutamate receptors. *Science* 311: 1253-1256
- Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Bredt DS, Nicoll RA (2000) Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408: 936-943
- Man HY, Lin JW, Ju WH, Ahmadian G, Liu L, Becker LE, Sheng M, Wang YT (2000) Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* 25: 649-662
- Ehlers MD (2000) Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28: 511-525
- Hanley JG, Khatri L, Hanson PI, Ziff EB (2002) NSF ATPase and alpha-/beta-SNAPs disassemble the AMPA receptor-PICK1 complex. *Neuron* 34: 53-67
- Lee SH, Liu L, Wang YT, Sheng M (2002) Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron* 36: 661-674
- Triller A, Choquet D (2005) Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move! *Trends Neurosci* 28: 133-139
- Blanpied TA, Scott DB, Ehlers MD (2002) Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron* 36: 435-449
- Perez-Otano I, Ehlers MD (2005) Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci* 28: 229-238
- Carroll RC, Zukin RS (2002) NMDA-receptor trafficking and targeting: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends Neurosci* 25: 571-577
- Barria A, Malinow R (2002) Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron* 35: 345-353

40. Guillaud L, Setou M, Hirokawa N (2003) KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons. *J Neurosci* 23: 131-140
41. Lei S, Czerwinska E, Czerwinski W, Walsh MP, MacDonald JF (2001) Regulation of NMDA receptor activity by F-actin and myosin light chain kinase. *J Neurosci* 21: 8464-8472
42. Roche KW, Standley S, McCallum J, Dune Ly C, Ehlers MD, Wenthold RJ (2001) Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat Neurosci* 4: 794-802
43. Lan JY, Skeberdis VA, Jover T, Grooms SY, Lin Y, Araneda RC, Zheng X, Bennett MV, Zukin RS (2001) Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nat Neurosci* 4: 382-390
44. Li B, Otsu Y, Murphy TH, Raymond LA (2003) Developmental decrease in NMDA receptor desensitization associated with shift to synapse and interaction with postsynaptic density-95. *J Neurosci* 23: 11244-11254
45. Krapivinsky G, Krapivinsky L, Manasian Y, Ivanov A, Tyzio R, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Clapham DE, Medina I (2003) The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron* 40: 775-784
46. Rumbaugh G, Adams JP, Kim JH, Haganir RL (2006) SynGAP regulates synaptic strength and mitogen-activated protein kinases in cultured neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4344-4351
47. Ishii H, Shibuya K, Ohta Y, Mukai H, Uchino S, Takata N, Rose JA, Kawato S (2006) Enhancement of nitric oxide production by association of nitric oxide synthase with N-methyl-D-aspartate receptors via postsynaptic density 95 in genetically engineered Chinese hamster ovary cells: real-time fluorescence imaging using nitric oxide sensitive dye. *J Neurochem* 96: 1531-1539
48. Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, Lounis B, Choquet D (2004) Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 7: 695-696
49. Lavezzari G, McCallum J, Dewey CM, Roche KW (2004) Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis. *J Neurosci* 24: 6383-6391
50. Jaskolski F, Coussen F, Mulle C (2005) Subcellular localization and trafficking of kainate receptors. *Trends Pharmacol Sci* 26: 20-26
51. Madden DR (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* 3: 91-101
52. Ayalon G, Stem-Bach Y (2001) Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron* 31: 103-113
53. Jaskolski F, Coussen F, Nagarajan N, Normand E, Rosenmund C, Mulle C (2004) Subunit composition and alternative splicing regulate membrane delivery of kainate receptors. *J Neurosci* 24: 2506-2515
54. Hayes DM, Braud S, Hurtado DE, McCallum J, Standley S, Isaac JT, Roche KW (2003) Trafficking and surface expression of the glutamate receptor subunit, KA2. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 8-13
55. Hirbec H, Francis JC, Lauri SE, Braithwaite SP, Coussen F, Mulle C, Dev KK, Coutinho V, Meyer G, Isaac JT, Collingridge GL, Henley JM (2003) Rapid and differential regulation of AMPA and kainate receptors at hippocampal mossy fibre synapses by PICK1 and GRIP. *Neuron* 37: 625-638
56. Coussen F, Normand E, Marchal C, Costet P, Choquet D, Lambert M, Mege RM, Mulle C (2002) Recruitment of the kainate receptor subunit glutamate receptor 6 by cadherin/catenin complexes. *J Neurosci* 22: 6426-6436
57. Martin S, Henley JM (2004) Activity-dependent endocytic sorting of kainate receptors to recycling or degradation pathways. *EMBO J* 23: 4749-4759

Iontropic glutamate receptor trafficking – there and back again

Dorota Nowicka 

Nencki Institute of Experimental Biology, Laboratory of Molecular Basis of Brain Plasticity, 3 Pasteur St., 02-093 Warsaw, Poland


 e-mail: d.nowicka@nencki.gov.pl

Key words: receptor, AMPA, NMDA, synapse, plasticity

ABSTRACT

Glutamate is a major excitatory neurotransmitter in brain. It engages mainly ionotropic glutamate receptors of AMPA and NMDA type. Thus, regulation of the number and properties of the receptors is crucial for correct neuronal communication, but also contributes to various forms of synaptic plasticity, namely neuronal development, learning and memory. Glutamate receptors are not static components of synapses. On the contrary, they are continuously delivered and removed from postsynaptic membranes and this process is regulated by synaptic activity. Receptor trafficking to synapses is a multi-step process, involving exit from endoplasmic reticulum, transport along dendrites, incorporation to postsynaptic membrane and finally removing them from synapses. The transport is regulated by numerous proteins, especially those bearing PDZ domains, or by receptors themselves.

Ścieżki sygnalizacyjne rodziny transformujących czynników wzrostowych typu β

Małgorzata Zimowska 

Zakład Cytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

[✉]Zakład Cytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: mzymowska@biol.uw.edu.pl, tel.: (022) 554 22 03

Artykuł otrzymano 28 lutego 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 11 sierpnia 2006 r.

Słowa kluczowe: TGF- β , Smad, transdukcja sygnału

Wykaz skrótów: BMP – morfogenetyczne białka kości; MAPK – kinaza białkowa aktywowana mitogenem; PI3K – 3-kinaza fosfadytyloinozytoli; TGF- β (ang. *transforming growth factor* β) – transformujący czynnik wzrostu β

STRESZCZENIE

Czynniki należące do dużej rodziny transformujących czynników wzrostu β kontrolują wiele procesów komórkowych takich jak podziały komórkowe, różnicowanie, czy morfogeneza. Uczestniczą w rozwoju zwłóknienia, inicjują proces apoptozy, towarzysząc rozwojowi wielu stanów patologicznych. Przedstawiciele rodziny TGF- β są syntetyzowani jako duże cząsteczki prekursorowe, wydzielane na zewnątrz komórki w formie nieaktywnej. Zapobiega to wiązaniu czynnika wzrostu do jego receptora. Po aktywacji ligandy TGF- β wiążą się z receptorem na powierzchni komórki. Wynikiem aktywacji kinazy receptora jest ufosforylowanie wewnątrzkomórkowych substratów przez zaktywowaną kinazę receptora i w rezultacie transdukcja sygnału do jądra komórkowego. Najlepiej poznanymi białkami efektorowymi sygnalizacji TGF- β są białka Smad. Przedstawiciele rodziny TGF- β uczestniczą także w przekazywaniu sygnałów na drogach niezależnych od białek Smad. Regulacja przekazywania sygnałów, rola białek Smad oraz innych efektorów w szlakach sygnałowych rodziny TGF- β wskazuje na złożoność regulacji i oddziaływań, które towarzyszą odpowiedzi komórkowej.

WPROWADZENIE

Cytokiny z rodziny międzykomórkowych czynników sygnalizacyjnych TGF- β (ang. *transforming growth factor* β) wykazują różnorodne funkcje *in vitro* i *in vivo*. Są one regulatorami proliferacji, różnicowania, rozwoju zarodkowego i morfogenezy, uczestnicząc także w rozwoju zwłóknienia oraz wielu stanów patologicznych [1-3]. Przedstawiciele rodziny TGF- β odpowiadają również za indukcję procesu apoptozy [4]. Badania nad biologiczną rolą czynników wzrostu z rodziny TGF- β w rozwoju zarodkowym i regeneracji wielu typów tkanek rozwinęły się intensywnie w drugiej połowie lat 80. XX wieku, kiedy zidentyfikowano sekwencję cDNA TGF- β człowieka oraz strukturę genu jego prekursora [5]. Wczesne badania nad TGF- β dotyczyły przede wszystkim jego związku z procesem nowotworzenia. Początkowo sądzono, że TGF- β jest czynnikiem odpowiedzialnym jedynie za transformację nowotworową komórek. Kiedy stało się jasne, że TGF- β skutecznie blokuje cykl komórkowy, a jego działanie ma związek z wieloma schorzeniami, np. artretyzmem [6], osteoporozą [7], czy procesem gojenia ran [8,9], badania rozszerzono na wszystkie komórki pochodzenia mezenchymalnego, skupiając się przede wszystkim na tkance łącznej [10] i kostnej [11].

RODZINA CZYNNIKÓW TGF- β

W tkankach ssaków opisano prawie 40 przedstawicieli rodziny czynników wzrostu TGF- β . Ze względu na różnice w ich budowie oraz w procesach, w które są zaangażowane, czynniki wzrostu z rodziny TGF- β zostały podzielone na kilka grup, wyróżnionych w obrębie dwóch podstawowych podrodziny: TGF- β /aktywiny oraz BMP/GDF (ang. *bone morphogenetic protein/ growth and differentiation factor*). Należą do nich trzy izoformy transformującego czynnika wzrostu- β (TGF- β): TGF- β 1, - β 2 i - β 3, będące prototypami całej rodziny: BMP, aktywiny, inhibiny, nodal, miostatyny i innych (Tab. 1). Ich działanie związane jest z różnymi tkankami i typami komórek [3,12,13].

Białka wchodzące w skład podrodziny BMP opisywane są jako czynniki indukujące tworzenie tkanki kostnej i chrząstki. Odgrywają one istotną rolę w indukcji mezodermy brzusznej, różnicowaniu tkanki nerwowej i organogenezie [14-16]. Przedstawiciele grupy aktywiny pełnią funkcję aktywatorów hormonu folikularnego (FSH) wydzielanego przez przysadkę [17]. Znana jest również ich funkcja promująca proces erytropoezy [18]. Natomiast TGF- β 1, TGF- β 2 oraz TGF- β 3 regulują formowanie miotub, rozwój motoneuronów czy utrzymanie otoczki mielinowej [13]. Przedstawiciele tej grupy czynników wzrostu uczestniczą także w regulacji ekspresji integryn, produkcji białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz formowaniu i różnicowaniu tkanki łącznej, indukując także

Tabela 1. Przedstawiciele rodziny TGF- β [2,23,33,34].

Podrodzina	Grupa	Ligand	
TGF- β / Aktywiny	TGF- β	TGF- β 1 TGF- β 2 TGF- β 3	
	aktywiny	aktywina A [β A- β A] aktywina B [β B β B] aktywina AB [β A β B]	
	inhibiny	inhibina A [inhibina α -aktywina β A] inhibina B [α - β B]	
	nodal lefty	nodal [Ndr] lefty lefty1 [lefty A/EBAF] lefty2 [lefty B]	
	BMP/GDF	BMP2/4	BMP2 [BMP2A] BMP4 [BMP2B]
		BMP5/6/7	BMP5 BMP6 [Vgr1/DVR6] BMP7 [OP1] BMP8A [OP2] BMP8B [OP3/PC8]
		GDF1	GDF1 GDF3 [Vgr2]
		GDF5/6/7	GDF5 [CDMP1] GDF6 [CDMP2/BMP13] GDF7 [BMP12]
		BMP9/10	BMP9 [GDF2] BMP10
		BMP3	BMP3 [osteogenina] BMP3b [GDF10/ sumitomo-BIP]
	GDF9	GDF9 GDF9b [BMP15] GDF15 [MIC1/PLAB/ PTGFB/PDF]	
	GDF8	GDF8 [miostatyna] GDF11 [BMP11]	
	MIS	MIS [MIF/AMH]	

rozwój włóknienia w wielu tkankach *in vivo*. Podwyższona ekspresja czynników należących do TGF- β związana jest m.in. z zaburzeniami architektury tkanki, jakie pojawiają się podczas rozwoju wielu dystrofii mięśniowych [19].

KONTROLA BIOAKTYWNOŚCI TGF- β

Białka z rodziny TGF- β są syntetyzowane jako duże cząsteczki prekursorowe, które poddawane są w aparacie Golgiego działaniu endopeptydaz (np. furyny). Rozcinają one cząsteczkę prekursorową na dojrzały TGF- β i resztę N-końcową nazwaną LAP (ang. *latency-associated peptide*). LAP pozostaje jednak nie kowalencyjnie przyłączona do TGF- β , tworząc kompleks, którego stabilność jest znacznie wyższa niż aktywnego TGF- β . Zapobiega to wiązaniu czynnika wzrostu do jego receptora. Wewnątrz aparatu Golgiego, LAP dodatkowo kowalencyjnie oddziałuje z białkiem LTBP (ang. *latent TGF- β binding protein*) tworząc duży, nieaktywny kompleks. Dotychczas scharakteryzowano cztery homologi LTBP, zwiększające stabilność kompleksu TGF- β -LAP i ułatwiające jego wydzielanie. Zapewniają one prawidłowe ułożenie i przeniesienie kompleksu nieaktywnego TGF- β do macierzy zewnątrzkomórko-

wej [20,21]. LTBP1, LTBP2, LTBP4 zawierają także sekwencję RGD, będącą miejscem wiązania integrzyn. Wykazano, że duży nieaktywny kompleks TGF- β -LAP-LTBP bezpośrednio oddziałuje z integrzynami (np. integrzyną α V β 1) na powierzchni komórki, co może umożliwić przedstawicielom rodziny TGF- β aktywację sygnalizacji poprzez te białka transbłonowe [22].

Przekształcenie kompleksu TGF- β -LAP-LTBP do formy biologicznie aktywnej TGF- β jest kontrolowane przez enzymy (np. plazminę), które rozcinają LAP oraz poprzez łączenie LAP z receptorem mannozo-6-fosforanowym. Po odcięciu fragmentu C-końcowego, uwalniany jest czynnik wzrostu, zdolny do aktywacji receptora i szlaków przekazywania sygnałów w komórce. Innym mechanizmem, włączonym w aktywację TGF- β jest deglikozylacja LAP. Dodatkowo, ważnym aktywatorem TGF- β *in vivo* wydaje się być trombospondyna-1, która indukuje zmiany konformacyjne LAP i aktywuje TGF- β . Także czynniki hamujące aktywację plasminogenu do plazminy pośrednio negatywnie kontrolują aktywację TGF- β [12,21]. Po aktywacji, najczęściej spotykanymi formami czynnika wzrostu biorącymi udział w ścieżkach przekazywania sygnału, są homodimery takie jak TGF- β 1, TGF- β 2 lub TGF- β 3, choć zidentyfikowano także heterodimery, np. TGF- β 1.2 czy TGF- β 2.3 [23].

Wiele białek macierzy zewnątrzkomórkowej posiada zdolność wiązania i modyfikowania aktywności TGF- β , zmieniając w różny sposób ich aktywność [21]. Niektóre białka związane z powierzchnią komórki (dekoryna, biglikan oraz białka z rodziny EGF-CFC: zawierające motyw EGF-podobny oraz domenę bogatą w reszty cysteinowe – CFC) działają jako koreceptory przedstawicieli rodziny TGF- β . Poprzez wiązanie z czynnikami wzrostu, składniki macierzy zewnątrzkomórkowej zdolne są do modyfikowania ich bioaktywności. Proteoglikany takie jak dekoryna hamują aktywację TGF- β , natomiast wiązanie przez fibronektynę promuje bioaktywność czynników wzrostu, umożliwiając uwolnienie aktywnego TGF- β z kompleksu TGF- β -LAP-LTBP. Za magazynowanie bioaktywnych form TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 w macierzy zewnątrzkomórkowej odpowiada natomiast kolagen IV [24-26].

SZLAK SYGNAŁOWY RODZINY TGF- β

Czynniki z rodziny TGF- β przekazują sygnał przez heterodimerowy, śródbłonowy kompleks składający się z dwóch receptorów typu II i dwóch receptorów typu I o aktywności kinazy serynowo-treoninowej. W stanie niewzbudzonego, receptory typu II oraz typu I występują na powierzchni komórki w formie homodimerów. Związanie liganda z jednym z nich nie jest jednak wystarczającym bodźcem do zaktywowania szlaku sygnałowego. W odpowiedzi na wiązanie liganda, kompleks receptorów składający się z dwóch receptorów typu II tworzy stabilny kompleks z dwoma receptorami typu I, czemu towarzyszy proces fosforylacji części cytoplazmatycznej receptora typu I, w tym domeny GS. Proces ten powoduje zmiany konformacyjne, które zapobiegają wiązaniu czynników zdolnych do blokowania przekazywania sygnałów poprzez ich oddziaływanie z receptorem i odsłaniają miejsce wiązania dla aktywowanych receptorem efektorów, uczestniczących w przekazywaniu sygnału [21]. Wynikiem aktywacji kinazy receptora jest ufosforylowanie

Tabela 2. Receptory sygnalizacji TGF- β [23,24,30,32,35,55].

Receptor		Ligand	
Receptor typu I	grupa	Alk1	TGF- β , aktywina A
		Alk2	TGF- β , aktywina A, MIS, BMP6/7
	grupa	Alk3	BMP2/4, BMP6/7
		Alk6	BMP2/4, GDF5/6, GDF9b, MIS, BMP6/7
	grupa	Alk5	aktywina A, GDF1, nodal (z EGF-CFC), GDF11
		Alk4	TGF- β
		Alk7	Nodal
Receptor typu II	TGF- β RII	TGF- β	
	BMP RII	inhibina A (z TGFRIII), BMP2/4, BMP6/7, GDF5/6, GDF9b	
	Act RII (ang. <i>activin type II receptor</i>)	aktywina A, inhibina A/B, GDF1 i nodal (z EGF-CFC), BMP2, BMP6/7, GDF5, GDF9b, GDF8/11	
	Act RII B	aktywina A, inhibina A/B, nodal, BMP2, BMP6/7, GDF5, GDF8/11	
	MIS RII (ang. <i>mullerian inhibitory substance type II receptor</i>)	MIS	
Receptor typu III	betaglikan	TGF- β	
	endoglina	TGF- β	

wewnątrzkomórkowych substratów i w rezultacie przekazania sygnału do jądra komórkowego [2,26-28].

Różnorodność ligandów może sugerować udział wielu typów receptorów II/I oraz wiązanie wielu ligandów przez kompleks receptorowy. U ssaków scharakteryzowano 7 typów receptora I włączonych w przekazywanie sygnałów - ALK 1-7 (ang. *activin-like kinase 1-7*) i pięć typów receptora II (Tab. 2). Każdy przedstawiciel rodziny TGF- β zdolny jest do wiązania charakterystycznej kombinacji receptora typu I i II, która następnie aktywuje specyficzną grupę wewnątrzkomórkowych substratów [23-25,29]. Cytokiny z rodziny TGF- β można podzielić na dwie podrodziny, w zależności od szlaku przekazywania sygnału, który aktywują. TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, nodal oraz aktywiny wiążą się najpierw z receptorami typu drugiego, podczas gdy czynniki z rodziny BMP łączą się początkowo głównie z receptorem typu pierwszego [2,16,27,30-32].

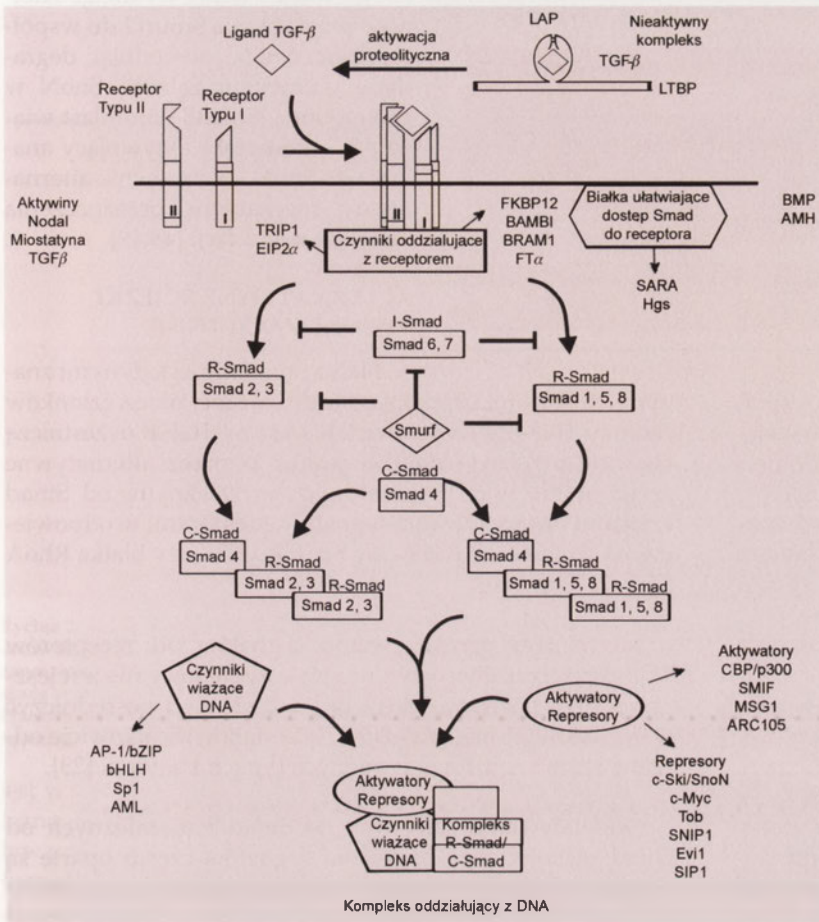
Przyjmuje się, że kluczowy szlak sygnalizacyjny rodziny czynników wzrostu TGF- β , prowadzi od kinazy receptora typu drugiego (typ II), poprzez kinazę receptora typu pierwszego (typ I), do białek efektorowych [2,8], które następnie przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie wpływają na transkrypcję genów docelowych [12,13,33]. Wyniki badań zespołu Ebnera wskazywały, że w wyniku wiązania TGF- β , typ I receptora może pośredniczyć w aktywacji genów zaangażowanych w oddziaływanie pomiędzy komórką a macierzą zewnątrzkomórkową, bez konieczności oddziaływania z typem II receptora. Jednak zarówno te doniesienia, jak i aktywacja szlaku sygnałowego poprzez receptor typu II bez udziału receptora typu I, do tej pory nie zostały potwierdzone przez inne grupy badaczy, choć zaobserwowano także wiązanie ligandu do homodimerów receptora typu II lub I, które zainicjowało

autofosforylację domen cytoplazmatycznych. Obecnie postuluje się, że oba typy receptorów są niezbędnymi komponentami kompleksu receptorowego, niezbędnymi do zainicjowania szlaku przekazywania sygnału, w którym receptory typu I odpowiadają za swoistość oddziaływań wewnątrzkomórkowych indukowanych przez cytokiny z rodziny TGF- β [2,25,26,28].

Sygnalizacja TGF- β jest także związana z obecnością czynników określanych jako receptory typu III (T β RIII). Należą do nich betaglikan (proteoglikan) lub endoglina (glikoproteina). Ten typ receptora został opisany tylko dla przedstawicieli grupy TGF- β i nie został zidentyfikowany w przypadku innych grup ligandów. W odróżnieniu od receptorów typu I i II, typ III receptora odgrywa główną rolę w regulacji wiązania ligandu i prezentacji ligandu receptorowi typu II [34].

Betaglikan jest transbłonowym białkiem o krótkiej domenie cytoplazmatycznej bogatej w reszty seryny, posiadającym w swojej domenie zewnątrzkomórkowej kilka miejsc wiązania dla TGF- β 1, β 2 i β 3 o wysokim powinowactwie. Forma związana z błoną może być odcinana na jej powierzchni przez plazminę, dzięki czemu betaglikan występuje w dwóch formach: jako proteolikan związany z błoną oraz w formie rozpuszczalnej. Obie formy wykazują odmienny, a zarazem przeciwstawny wpływ na szlak przekazywania sygnału przedstawicieli rodziny TGF- β . Podstawową funkcją pełnioną przez formę związaną z błoną jest wiązanie, a następnie prezentowanie ligandu receptorowi typu II. Ułatwia to połączenie TGF- β z receptorem typu drugiego, co ma szczególne znaczenie w przypadku TGF- β 2, który charakteryzuje się niskim powinowactwem do T β RII. Natomiast rozpuszczalna forma betaglikanu, poprzez wiązanie aktywnych form ligandu, działa jako inhibitor sygnalizacji TGF- β [17,23,24,26,30]. Także endoglina zaangażowana jest w przekazywanie sygnałów przez rodzinę czynników TGF- β . Mechanizm jej działania pozostaje jednak wciąż niejasny. Wydaje się, że tworząc kompleks z receptorem endoglina ułatwia oddziaływanie czynników wzrostu z receptorem i modyfikuje odpowiedź komórkową [34-36].

Sygnalizacja TGF- β jest także modyfikowana przez cały szereg cząsteczek oddziałujących bezpośrednio z receptorami. Należą do nich m.in. FKBP12 (ang. *FK506-binding protein 12*), BAMBI (ang. *BMP and activin membrane bound inhibitor*), czy BRAM1 (ang. *BMP receptor associated molecule 1*), których specyficzne wiązanie z receptorem typu I blokuje przekazywanie sygnałów przez przedstawicieli poszczególnych grup rodziny TGF- β . FKBP12 wiążąc T β RI zapobiega fosforylacji receptora typu I przez receptor typu II, hamując przekazywanie sygnałów przez TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. BAMBI zapobiega formowaniu aktywnego kompleksu receptorowego w sygnalizacji BMP i aktywiny, natomiast BRAM1, wiążąc receptor BMPRI, hamuje przekazywanie sygnału jedynie przez BMP [37-39].



Rycina 1. Szlaki sygnałowe rodziny TGF- β zależne od białek Smad. Białka z rodziny TGF- β transportowane są do macierzy zewnątrzkomórkowej jako duży nieaktywny kompleks TGF- β -LAP-LTBP, zapobiegający wiązaniu czynnika wzrostu do jego receptora. Po odcięciu C-końcowego fragmentu LAP, uwalniany jest aktywny czynnik wzrostu, zdolny do aktywacji receptora, fosforylacji R-Smad (Smad 2, Smad 3 lub Smad 1, Smad 5, Smad 8) i zainicjowania szlaku przekazywania sygnałów w komórce. Szlak inicjowany przez aktywiny, nodal, miostatynę czy przedstawicieli rodziny TGF- β związany jest z przyłączeniem liganda w pierwszej kolejności do receptora typu II i aktywacją szlaku przekazywania sygnałów przez Smad 2 lub Smad 3. Sygnalizacja przez BMP i AMH związana jest z wiązaniem liganda początkowo z odpowiednim dla niego receptorem typu I oraz aktywacją szlaku przekazywania sygnałów przez Smad 1, Smad 5 lub Smad 8. Fosforylacja destabilizująca połączenie R-Smad z białkami ułatwiającymi dostęp R-Smad do receptora, pozwala na ich oddysocjowanie i utworzenie homodimeru, składającego się z dwóch ufosforylowanych R-Smad, a następnie stworzenie heterotrimericznego kompleksu z C-Smad (Smad-4). Kompleks R-Smad/C-Smad przemieszcza się do jądra, gdzie reguluje ekspresję docelowych genów przy współpracy czynników wiążących DNA oraz ko-aktywatorów lub ko-represorów transkrypcji. Proces przekazywania sygnału kontrolowany jest przez I-Smad (Smad 6 lub Smad 7), które poprzez tworzenie stabilnego kompleksu z receptorem typu I, zapobiegają aktywacji R-Smad. Dodatkowo regulacja przekazywania sygnału przez białka Smad jest związana z procesem ich ubikwitylacji i degradacji w proteasomach przy wykorzystaniu białek Smurf. Strzałki i bloki wskazują kierunek przekazywania sygnału od receptora do jądra komórkowego lub miejsca hamowania sygnalizacji.

BIAŁKA Smad – ŚCIEŻKI SYGNALIZACJI TGF- β ZALEŻNE OD Smad

Najlepiej poznanymi efektorami sygnalizacji TGF- β są białka Smad (Ryc. 1) [25,33,34]. Pierwszy z przedstawicieli rodziny Smad – MAD został zidentyfikowany u *Drosophila*, a następnie zidentyfikowano homologiczne białka sma-2, sma-3 i sma-4 u *C. elegans*. MAD-podobne białka zidentyfikowano także u kręgowców, określając je jako Smad. Obecnie znanych jest 9 przedstawicieli rodziny białek Smad (Tab. 3). Ze względu na różnice w pełnionych przez nie funkcjach, białka te zostały podzielone na trzy kategorie: Smad oddziałujące z receptorem – R-Smad (ang. *receptor-activated Smad*); I-Smad, pełniące funkcje in-

hibitorowe (ang. *inhibitory Smad*) i C-Smad (ang. *common Smad*), odpowiedzialne za wiązanie i przemieszczanie kompleksu Smad do jądra komórkowego, gdzie współpracują z innymi czynnikami aktywując transkrypcję określonych genów [2,24,26,40].

W odpowiedzi na przykazywanie sygnału przez ligandy z rodziny TGF- β , kinaza receptora typu I fosforyluje R-Smad. Każdy przedstawiciel rodziny czynników wzrostu TGF- β wiążąc się z różnymi kombinacjami receptorów typu I i II stymuluje aktywację różnych białek typu R-Smad, które pośredniczą w generowaniu różnorodnych odpowiedzi komórkowych. TGF- β i aktywiny poprzez receptor typu I aktywują Smad 2 i 3, podczas gdy Smad 1, 5 i 8 są celami aktywacji receptora typu I dla sygnalizacji BMP [13,24,41]. Dwa białka: SARA (ang. *Smad anchor for receptor activation*) i Hgs zawierające domeny FYVE, odpowiedzialne za wiązanie fosfolipidów w błonie komórkowej, oddziałują bezpośrednio z R-Smad, ułatwiając im dostęp do aktywnego receptora [42,43]. W wyniku krótkotrwałego oddziaływania R-smad z receptorem typu I, na C-końcu białka ulega fosforylacji reszta serynowa, co powoduje odłączenie się R-smad od receptora. Fosforylacja destabilizująca połączenie R-Smad z SARA, pozwala na ich oddysocjowanie i odsłonięcie miejsca wiązania. Umożliwia to połączenie dwóch ufosforylowanych R-smad zarówno w homodimer, jak i stworzenie heterotrimerowego kompleksu z kolejnym przedstawicielem rodziny Smad: C-Smad [2,25].

Smad 4, będący przedstawicielem C-Smad został po raz pierwszy opisany jako DPC4. Podobnie jak w przypadku R-Smad, C-Smad również wiązane są z błoną komórkową poprzez białka kotwiczące. Czynnikiem zaangażowanym w ten proces wydaje się być TRIP1 (ang. *TGF- β receptor interacting protein 1*), białko oddziałujące z receptorem typu I. Po aktywacji receptora, TRIP1 jest uwalniany, wiążąc C-Smad, co ułatwia oddziaływanie z aktywowanym receptorem Smad. TRIP1 wydaje się ułatwiać przemieszczenie C-Smad do R-Smad [32].

Po utworzeniu kompleksu R-Smad/C-Smad, białka kompleksu przemieszczane są do jądra komórkowego, gdzie wiążą się z odpowiednimi sekwencjami DNA. Oddziałują i współpracują z szeregiem czynników transkrypcyjnych, które wiążą się z sekwencjami regulatorowymi promotorów wymagając współaktywatorów (np. CBP, ang. *CREB-binding protein* i p300, MSG, ang. *monosodium glutamate* czy SMIF, ang. *Smad4-interacting protein*), wzmagając transkrypcję lub współrepresorów hamujących ten proces. R-Smad (za wyjątkiem Smad 2) wiążą się z sekwencją DNA ze 100 razy niższym powinowactwem niż czynniki transkrypcyjne. Jednak połączenie to jest warunkiem prawidłowego przekazywania sygnałów w odpowiedzi na TGF- β [28,31,40].

Tabela 3. Białka Smad uczestniczące w przekazywaniu sygnałów przez rodzinę TGF- β [2,11,25,33,34,40,47].

Podrodzina	Białko Smad	Oddziaływanie
R-Smad (wiążące się z receptorem)	Smad 1	BMPs i niektóre GDFs
	Smad 2	TGF- β 1, - β 2, - β 3, aktywiny, nodał, niektóre GDF
	Smad 3	TGF- β 1, - β 2, - β 3, aktywiny, nodał, niektóre GDF
	Smad 5	BMPs i niektóre GDF
I-Smad (inhibitorowe)	Smad 8	BMP i niektóre GDF
	Smad 7	TGF β / aktywiny/BMP
	Smad 6	BMP
C-Smad (pośredniczące)	Smad 4	wiążanie R-Smad
	Smad 4B	wiążanie R-Smad

W odróżnieniu od dobrze udokumentowanego współdziałania Smad z czynnikami transkrypcyjnymi aktywującymi transkrypcję, mechanizm, który jest podstawą represji, w której pośredniczą efekторы Smad jest słabo poznany. Uważa się, że jeden z mechanizmów jest związany z oddziaływaniem Smad 3 z represorami transkrypcji i tym samym hamowaniem transkrypcji genów docelowych. W proces ten zaangażowanych jest wiele różnych korepresorów [44]. Po aktywacji receptora przez TGF- β , kompleks białkowy zawierający Smad 3, E2F3 i DP1 oraz współrepresor p107 przenoszony jest do jądra i rozpoznawany przez miejsce na promotorze c-myc, powodując zahamowanie transkrypcji. Podobnie Smad 3 tworzy kompleks z represorem transkrypcji ATF3 na promotorze Id1 i hamuje transkrypcję [29]. W obu przypadkach wymagane jest wiązanie Smad do specyficznej sekwencji DNA w docelowym promotorze i prawdopodobnie ono stabilizuje kompleks hamujący transkrypcję. Drugi mechanizm powodujący represję szlaku TGF- β -Smad związany jest z blokowaniem wiązania Smad 4 do współaktywatora. Czynniki takie jak SNIP-1 (ang. *Smad nuclear interacting protein 1*) poprzez ich zdolność do łączenia z Smad4 i cbp-p300, uniemożliwiają oddziaływanie Smad 4 z współaktywatorami transkrypcji. SNIP-1 dodatkowo wpływa także na hamowanie jądrowego czynnika kappa B (9NF- κ B), poprzez wiązanie z domeną CBP-p300 [45].

W regulacji przekazywania sygnałów przez białka efektorowe Smad, ważną funkcję pełnią Smad inhibitorowe [46]. Smad 6 i Smad 7, będące przedstawicielami I-Smad działają poprzez tworzenie stabilnego kompleksu z receptorem I, zapobiegając fosforylacji, a tym samym aktywacji R-Smad. Mechanizm ten mógłby powodować niespecyficzną negatywną regulację przekazywania sygnałów przez ligandy należące do TGF- β . Wykazano jednak, że Smad 7 jest silnym inhibitorem przekazywania sygnałów przez TGF- β , podczas gdy Smad 6 hamuje drogi sygnalizacji wewnątrzkomórkowej indukowane BMP [2,34,47].

Regulacja przekazywania sygnału przez Smad jest również związana z procesami ubiquitylacji i degradacji w proteosomach [2]. Smurf1 i Smurf2 zostały zidentyfikowane jako białka homologiczne ligazy E6-AP E3, które oddziałują z bogatą w resztę proliny domeną Smad, promując ich ubiquitylację i degradację w proteosomach. Smurf-1 i Smurf-2 za pośrednictwem Smad 7 wiązane są także do receptora TGF- β , naznaczając go do degradacji, hamując tym samym szlak sygnalizacyjny. Także przedstawiciele R-Smad zdolni są do indukowania degradacji innych białek poprzez wią-

zanie Smurf. Smad2 wykazuje zdolność przyłączania Smurf2 do współrepresora SnoN, powodując degradację ubiquityno-zależną SnoN w proteosomie. Smad3 natomiast wiąże APC (kompleks aktywujący anafazę) do SnoN, co zapewnia alternatywny mechanizm przeznaczenia SnoN do degradacji [48,49].

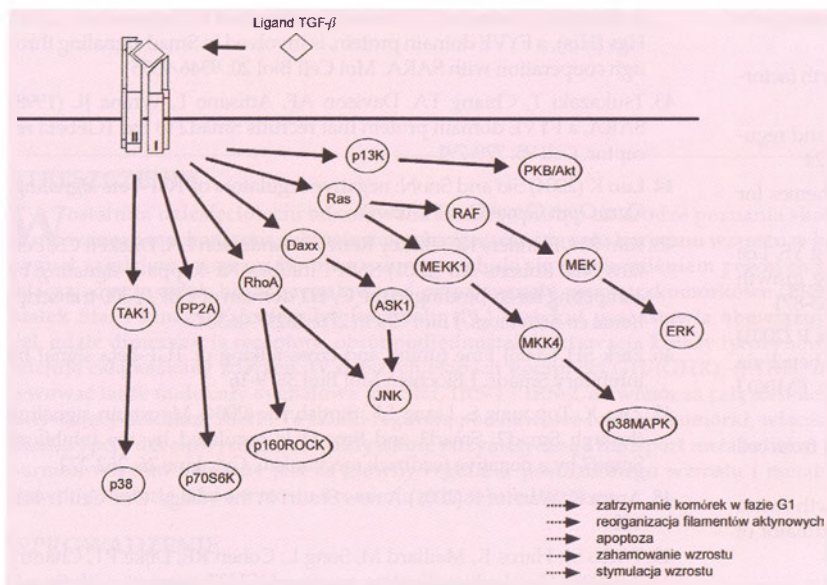
ALTERNATYWNE ŚCIEŻKI SYGNALIZACJI TGF- β

Białka Smad nie są jedynymi znanymi efektorami sygnalizacji indukowanej przez członków rodziny TGF- β . Przedstawiciele rodziny TGF- β uczestniczą także w przekazywaniu sygnałów poprzez alternatywne szlaki sygnałowe. W nazwanych niezależnymi od Smad szlakami przekazywania sygnałów, efektorami w odpowiedzi na sygnał TGF- β stają się np. Ras, PI3K czy białka RhoA (Ryc. 2) [26,41,50].

Mechanizm przekazywania sygnałów od receptorów TGF- β poprzez alternatywne szlaki sygnałowe nie jest jeszcze dobrze poznany. Mogą one wiązać się i pośredniczyć w sygnalizacji Smad-zależnej, bądź stanowić całkowicie odrębny szlak sygnałowy w różnych typach komórek [23].

Oddziaływania zależnych od Smad i niezależnych od Smad szlaków przekazywania sygnałów często oparte są na ich współpracy. Niektóre z oddziaływań, mogą wynikać z indukowania docelowych genów szlaku zależnego od Smad poprzez szlaki alternatywne. Aktywacja MAPK może np. oddziaływać na poziom transkrypcji, w której uczestniczą białka Smad, poprzez bezpośredni wpływ na czynniki transkrypcyjne wiążące się ze Smad, np. c-Jun czy ATF-2. Także indukowana przez białka z rodziny TGF- β aktywacja szlaków przekazywania sygnałów przez ERK i JNK może powodować fosforylację białek Smad i regulować ich funkcjonowanie. TGF- β może blokować przekazywanie sygnału poprzez p38 MAPK indukując ekspresję fosfatazy MAPK na drodze zależnej od Smad [51]. Chociaż oddziaływania zależnych od Smad i alternatywnych szlaków przekazywania sygnałów często związane są ze współpracą obu szlaków, mogą one wywoływać odmienne efekty. Smad 6 może być wiązany do TAK1, co obniża jego aktywność, podczas gdy Smad 7 może wzmacniać aktywację JNK [2,12,50].

Niezależne od Smad przekazywanie sygnałów stanowi także odrębny szlak w różnych typach komórek. Sygnalizacja poprzez JNK i p38 MAPK włączona jest poprzez kinazy MAPK w odpowiedzi na różne ligandy. Bezpośrednia regulacja szlaków alternatywnych może wynikać z zależnych od typu liganda oddziaływań z kompleksem receptorowym [23]. Zarówno TGF- β jak i BMP-4 mogą aktywować kinazę JNK [2]. Opisywano także oddziaływania pomiędzy PI3K i receptorem TGF- β , w których szlak sygnałowy inicjowany jest za pośrednictwem białek należących do podrodziny TGF- β czy BMP. Można do nich zaliczyć aktywację PI3K przez TGF- β czy BMP2 w różnych typach komórek [52]. Inne efekторы również mogą uczestniczyć w przekazywaniu sygnału poprzez szlaki alternatywne. Rodzina białek Rho włączona



Rycina 2. Szlaki sygnałowe rodziny TGF- β niezależne od białek Smad. Receptory czynników z rodziny TGF- β umożliwiają różnorodność odpowiedzi na sygnalizację, a aktywacja receptorów może zapoczątkować alternatywne szlaki przekazywania sygnałów. Białka z rodziny TGF β aktywują kaskadę sygnałów, w których pośredniczą MAPK, ERK, JNK, p38 MAPK, PI3K, kinaza białkowa C. Przekazywanie sygnałów przez szlaki niezależne od białek Smad oraz ich biologiczne konsekwencje są jednak słabo poznane.

jest w aktywację JNK, aktywację ERK MAPK, czy TAK1-zależną aktywację p38 MAPK przez TGF- β [53]. Także oddziaływanie pomiędzy fosfatazą serynowo-treoninową, PP2A a kompleksem receptorowym typu I/II powoduje gwałtowną defosforylację i zahamowanie aktywacji p70 S6K [23].

Aktywacja receptora rodziny TGF- β rozpoczyna także polimeryzację aktyny i reorganizację cytoszkieletu w wielu różnych typach komórek [54]. Kinaza LIMK1, która reguluje polimeryzację aktyny poprzez związaną z fosforylacją inaktywacją kofiliny, jest związana z sygnalizacją, w której pośredniczy receptor II BMP. Sygnał przekazywany przez, np. BMP 4 powoduje przemieszczenie LIMK1 do peryferyjnych obszarów komórki, fosforylację kofiliny i przekształcenia cytoszkieletu aktywnego. Wskazuje to, że sygnalizacja poprzez BMP RII aktywuje szlak sygnałowy, w którym uczestniczy LIMK1, regulując szlak niezależny od sygnalizacji Smad [55].

Regulacja przekazywania sygnałów, rola białek Smad oraz innych efektorów w szlaku sygnałowym rodziny TGF- β wskazuje na złożoność regulacji i oddziaływań, które towarzyszą odpowiedzi komórkowej. Poznanie roli poszczególnych czynników uczestniczących w przekazywaniu sygnałów oraz ich wzajemnych oddziaływań może przyczynić się do zrozumienia specyficznej i zależnej od typu komórek odpowiedzi na TGF- β towarzyszącej utrzymaniu homeostazy komórkowej jak i rozwojowi wielu stanów patologicznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Allegra S, Li JY, Saez JM, Langlois D (2004) Terminal differentiation of Sol 8 myoblasts is retarded by a transforming growth factor-beta autocrine regulatory loop. *Biochem J* 381: 429-436
2. Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425: 577-584
3. Mauviel A (2005) Transforming growth factor-beta: a key mediator of fibrosis. *Methods Mol Med* 117: 69-80

4. Sanchez-Capelo A (2005) Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 15-34
5. Derynck R, Rhee L (1987) Sequence of the porcine transforming growth factor-beta precursor. *Nucleic Acids Res* 15: 3187
6. Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, LaBorde J, Sheehan DM, Derynck R, Moses HL (1997) Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J Cell Biol* 139: 541-552
7. Erlebacher A, Derynck R (1996) Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J Cell Biol* 132: 195-210
8. Connors D, Gies D, Lin H, Gruskin E, Mustoe TA, Tawil NJ (2000) Increase in wound breaking strength in rats in the presence of positively charged dextran beads correlates with an increase in endogenous transforming growth factor-beta1 and its receptor TGF-betaRI in close proximity to the wound. *Wound Repair Regen* 8: 292-303
9. Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, Redmer DA, Reynolds LP, Abdullah A, Abdullah KM (2003) Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today (Barc)* 39: 787-800
10. Ignatz RA, Massague J (1985) Type beta transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8530-8534
11. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL (1994) Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr Rev* 15: 27-39
12. Keski-Oja J, Koli K, von Melchner H (2004) TGF-beta activation by traction? *Trends Cell Biol* 14: 657-659
13. McLennan IS, Koishi K (2002) The transforming growth factor-betas: multifaceted regulators of the development and maintenance of skeletal muscles, motoneurons and Schwann cells. *Int J Dev Biol* 46: 559-567
14. Stern CD (2005) Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development* 132: 2007-2021
15. Tsumaki N, Yoshikawa H (2005) The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 279-285
16. Wan M, Cao X (2005) BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 651-657
17. Findlay JK, Drummond AE, Dyson M, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF (2001) Production and actions of inhibin and activin during folliculogenesis in the rat. *Mol Cell Endocrinol* 180: 139-144
18. Yu J, Dolter KE (1997) Production of activin A and its roles in inflammation and hematopoiesis. *Cytokines Cell Mol Ther* 3: 169-177
19. Bernasconi P, Di Blasi C, Mora M, Morandi L, Galbiati S, Confalonieri P, Cornelio F, Mantegazza R (1999) Transforming growth factor-beta1 and fibrosis in congenital muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 9: 28-33
20. Saharinen J, Hyytiainen M, Taipale J, Keski-Oja J (1999) Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs)-structural extracellular matrix proteins for targeting TGF-beta action. *Cytokine Growth Factor Rev* 10: 99-117
21. Hyytiainen M, Penttinen C, Keski-Oja J (2004) Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41: 233-264
22. Annes JP, Chen Y, Munger JS, Rifkin DB (2004) Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *J Cell Biol* 165: 723-734
23. de Caestecker M (2004) The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 1-11
24. Piek E, Westermark U, Kastemar M, Heldin CH, van Zoelen EJ, Nister M, Ten Dijke P (1999) Expression of transforming-growth-factor (TGF)-beta receptors and Smad proteins in glioblastoma cell lines with distinct responses to TGF-beta1. *Int J Cancer* 80: 756-763

25. Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K (2002) Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* 7: 1191-1204
26. Zhu HJ, Burgess AW (2001) Regulation of transforming growth factor-beta signaling. *Mol Cell Biol Res Commun* 4: 321-330
27. Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P (1999) Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *Faseb J* 13: 2105-2124
28. Roberts AB, Derynck R (2001) Meeting report: signaling schemes for TGF-beta. *Sci STKE* 2001: PE43
29. Kang NS, Yim HE, Bae IS, Choi JH, Choi BM, Yoo KH, Hong YS, Lee JW, Kim SK (2003) ACE inhibition modulates transforming growth factor-beta receptors in the young rat. *Pediatr Nephrol* 18: 865-871
30. Rotzer D, Roth M, Lutz M, Lindemann D, Sebald W, Knaus P (2001) Type III TGF-beta receptor-independent signalling of TGF-beta2 via TbetaRII-B, an alternatively spliced TGF-beta type II receptor. *EMBO J* 20: 480-490
31. Shi Y, Massague J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700
32. Choy L, Derynck R (1998) The type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor-interacting protein TRIP-1 acts as a modulator of the TGF-beta response. *J Biol Chem* 273: 31455-31462
33. Feng XH, Derynck R (2005) Specificity and versatility in TGF- signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 659-693
34. Mehra A, Wrana JL (2002) TGF-beta and the Smad signal transduction pathway. *Biochem Cell Biol* 80: 605-622
35. Chen K, Mehta JL, Li D, Joseph L, Joseph J (2004) Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circ Res* 95: 1167-1173
36. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267: 19027-19030
37. Wang T, Donahoe PK (2004) The immunophilin FKBP12: a molecular guardian of the TGF-beta family type I receptors. *Front Biosci* 9: 619-631
38. Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, Niehrs C (1999) Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401: 480-485
39. Kurozumi K, Nishita M, Yamaguchi K, Fujita T, Ueno N, Shibuya H (1998) BRAM1, a BMP receptor-associated molecule involved in BMP signalling. *Genes Cells* 3: 257-264
40. van Grunsven LA, Verstappen G, Huylebroeck D, Verschuere K (2005) Smads and chromatin modulation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 495-512
41. Wenner CE, Yan S (2003) Biphasic role of TGF-beta1 in signal transduction and crosstalk. *J Cell Physiol* 196: 42-50
42. Miura S, Takeshita T, Asao H, Kimura Y, Murata K, Sasaki Y, Hanai JI, Beppu H, Tsukazaki T, Wrana JL, Miyazono K, Sugamura K (2000) Hgs (Hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through cooperation with SARA. *Mol Cell Biol* 20: 9346-9355
43. Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95: 779-791
44. Luo K (2004) Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev* 14: 65-70
45. Kim RH, Flanders KC, Birkey Reffey S, Anderson LA, Duckett CS, Perkins ND, Roberts AB (2001) SNIP1 inhibits NF-kappa B signaling by competing for its binding to the C/H1 domain of CBP/p300 transcriptional co-activators. *J Biol Chem* 276: 46297-46304
46. Park SH (2005) Fine tuning and cross-talking of TGF-beta signal by inhibitory Smads. *J Biochem Mol Biol* 38: 9-16
47. Zhu X, Topouzis S, Liang LF, Stotish RL (2004) Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine* 26: 262-272
48. Arora K, Warrior R (2001) A new Smurf in the village. *Dev Cell* 1: 441-442
49. Wicks SJ, Haros K, Maillard M, Song L, Cohen RE, Dijke PT, Chantray A (2005) The deubiquitinating enzyme UCH37 interacts with Smads and regulates TGF-beta signalling. *Oncogene* 24: 8080-8084
50. Moustakas A, Heldin CH (2005) Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 118: 3573-3584
51. Jono H, Xu H, Kai H, Lim DJ, Kim YS, Feng XH, Li JD (2003) Transforming growth factor-beta-Smad signaling pathway negatively regulates nontypeable Haemophilus influenzae-induced MUC5AC mucin transcription via mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1-dependent inhibition of p38 MAPK. *J Biol Chem* 278: 27811-27819
52. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* 275: 36803-36810
53. Yu L, Hebert MC, Zhang YE (2002) TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J* 21: 3749-3759
54. Hubchak SC, Runyan CE, Kreisberg JJ, Schnaper HW (2003) Cytoskeletal rearrangement and signal transduction in TGF-beta1-stimulated mesangial cell collagen accumulation. *J Am Soc Nephrol* 14: 1969-1980
55. Fioletta VC, Lim MA, Soosairajah J, Kelly AP, Stanley EG, Shannon M, He W, Das S, Massague J, Bernard O (2003) Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J Cell Biol* 162: 1089-1098

Signaling pathways of transforming growth factor β family members

Małgorzata Zimowska 

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

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

Key words: TGF- β , Smad, signal transduction

ABSTRACT

Transforming growth factor β (TGF- β) signaling controls various of cellular processes, including cell proliferation, differentiation, fibrosis, apoptosis and specification of developmental fate during embryogenesis as well as in mature tissues. The members of TGF- β s family are secreted as inactive (latent) precursors, what prevents uncontrolled activation of the cognate receptors. After activation TGF- β ligand initiates signaling by binding to and bringing together type I and type II receptor serine/threonine kinases on the cell surface. Recent cellular, biochemical and structural studies have revealed significant insight into the mechanisms of the activation of TGF- β receptors through ligand binding, the activation of Smad proteins through phosphorylation as well as Smad independent pathways.

STRESZCZENIE

W ostatnim dziesięcioleciu odnotowano znaczny postęp na drodze poznania skomplikowanego mechanizmu, jakim jest przekazywanie sygnału hormonu wzrostu w komórce. Sygnał zainicjowany przez hormon wzrostu cechuje się uruchomieniem pewnych szlaków, włączając w to szlak kinazy regulowanej przez sygnały zewnątrzkomórkowe (ERK), szlak białek Stat i kinazy 3'-fosfatydyloinozytolu (PI₃). Artykuł przedstawia obowiązujący model, gdzie dimerizacja receptora, obrót podjednostek i aktywacja kinazy tyrozynowej JAK2 inicjują całą kaskadę zdarzeń. W dalszych etapach kompleks GH-(GHR)-(JAK2), może aktywować takie molekuly sygnałowe jak Stat, IRS-1 i IRS-2, a zwłaszcza całą kaskadę białek aktywujących kinazę MAP. Te szlaki regulują podstawowe funkcje komórki, włączając w to transkrypcję docelowych genów, aktywność enzymatyczną i transport metabolitów. Dlatego hormon wzrostu uważany jest za główny regulator postnatalnego wzrostu i metabolizmu, prawdopodobnie także wzrostu i rozwoju gruczołu mlecznego.

WPROWADZENIE

Olbrzymi potencjał, jaki przypisuje się hormonowi wzrostu (ang. *growth hormone* – GH), czyli somatotropinie, w doskonaleniu bydła w kierunku zwiększenia produkcji mleka sprawia, że niezbędne jest dokładne poznanie działania hormonu wzrostu zarówno na poziomie molekularnym, jak i komórkowym. Analiza molekularna genów osi somatotropowej (*GHRH*, *GH*, *GHR*, *IGF-I*), jak i aktywności szeregu innych ważnych mediatorów śródkomórkowych, dostarczyła już wystarczającego zestawu „narzędzi” do badań dotyczących przekazywania sygnału w komórkach docelowych przez hormon wzrostu. Na ich podstawie polepszyło się zrozumienie tego niezwykle złożonego i niekiedy tkankowo specyficznego procesu, zwłaszcza w zakresie początkowych zdarzeń w przenoszeniu sygnału przez hormon wzrostu.

HORMON WZROSTU

Hormon wzrostu wydzielany jest przez przedni płat przysadki mózgowej. Wydzielanie kontrolowane jest przez dwa neurohormony podwzgórza: somatoliberynę (pobudzanie wydzielania) i somatostatynę (hamowanie wydzielania). Hormon wzrostu działa na tkanki obwodowe zarówno bezpośrednio jak i pośrednio, a w dalszym przekazywaniu jego sygnał pośredniczy insulinopodobny czynnik wzrostu I (ang. *insulin-like growth factor* – IGF-I) [1]. 5 eksonów genu *GH1* koduje prekursor hormonu wzrostu składający się z 217 aminokwasów, a dojrzały hormon liczy sobie 191 reszt aminokwasowych. Taka dojrzała forma, o masie 22 kDa, składa się z czterech α -helis i z dwóch mostków dwusiarczkowych [2]. Stanowi ona około 85% puli krążącego w osoczu hormonu wzrostu. Resztę puli stanowią formy powstałe w wyniku różnicowego cięcia i składania mRNA, głównie (5–10 %) mniejsza forma 20 kDa pozbawiona piętnastu reszt aminokwasowych (reszty od 32 do 46 dojrzałego łańcucha hormonu wzrostu) [1]. W przypadku hormonu wzrostu człowieka helisy 1, 2, 3 i 4 zlokalizowane są odpowiednio w pozycjach 9–34, 72–92, 106–128 oraz 155 – 184 łańcucha aminokwasów. Mostki dwusiarczkowe zlokalizowano pomiędzy resztami Cys35–Cys165 oraz Cys182–Cys189. Hormon wzrostu zawiera także hydrofobowy rdzeń, składający się z około 20 reszt aminokwasowych [3]. Trzecią helisę uważa się za najbardziej istotną w biologicznej aktywności tego hormonu, a w jej obrębie resztę glicyny w pozycji 120 hormonu wzrostu człowieka (u bydła 119). Liczne badania wykorzystujące metodę mutacji punktowej wykazały, że zamiana tej reszty aminokwasowej na inną prowadzi do zahamowania, promującej wzrost, aktywności hormonu wzrostu [4].

BUDOWA RECEPTORA HORMONU WZROSTU

Specyficzna budowa przestrzenna hormonu wzrostu determinuje jego zależność od swoistego receptora (ang. *growth hormone receptor* – GHR), zaliczanego

Sławomir Zych[✉]

Iwona Szatkowska

Ewa Czerniawska-Piątkowska

Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających,
Akademia Rolnicza w Szczecinie, Szczecin

[✉]Zakład Cytogenetyki Molekularnej, Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających, Akademia Rolnicza w Szczecinie, ul. Doktora Judyma 12, 71-460 Szczecin; e-mail: slawomir.zych@biot.ar.szczecin.pl, tel. (091) 454 15 21 wew. 361

Artykuł otrzymano 15 marca 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 11 września 2006 r.

Słowa kluczowe: hormon wzrostu, receptor hormonu wzrostu, kinaza JAK2, kinaza MAP, białka Stat

Wykaz skrótów: GH – hormon wzrostu; GHR – receptor hormonu wzrostu; IGF-I – insulinopodobny czynnik wzrostu I; JAK2 – kinaza tyrozynowa z rodziny Janus; MAPK – kinaza serynowo-treoninowa; SH2 – domena homologiczna do produktu onkogenu Src; Stat – białka przenoszące sygnał i aktywujące transkrypcję

do klasy IA, grupy receptorów nie posiadających własnej kinazy tyrozynowej [5-7], stanowiących nadrodzinę receptorów cytokin/hematopoetyń. Receptory należące do tej grupy składają się z dwóch dużych łańcuchów polipeptydowych, połączonych krótkim łańcuchem transbłonowym. Domena zewnątrzkomórkowa jest odpowiedzialna za wiązanie hormonu wzrostu, natomiast domena wewnątrzkomórkowa określa właściwości katalityczne receptora. Rejon N-końcowy białka receptora znajduje się na zewnątrz komórki, zaś C-koniec w cytoplazmie [5]. U człowieka prekursorowy receptor hormonu wzrostu składa się z 638 reszt aminokwasowych (u bydła z 634 reszt), przy czym reszty 1-18 to peptyd sygnałowy, na domenę zewnątrzkomórkową przypadają reszty 19-264 (u bydła 19-260), region transbłonowy to struktura α -helisy składająca się z 24 reszt aminokwasów GHR₂₆₃₋₂₈₈ (u bydła GHR₂₆₁₋₂₈₄), pozostałe 350 reszt aminokwasowych buduje domenę wewnątrzkomórkową [3,8,9]. Masa cząsteczkowa receptora hormonu wzrostu człowieka to około 70 kDa, jakkolwiek obserwowano także formy o masie w zakresie 100 do 130 kDa. Spowodowane to może być odmienną potranslacyjną glikozylacją i ubikwitylacją [3].

Klasa IA (podrodzina receptora hormonu wzrostu) obejmuje, obok receptora hormonu wzrostu, także receptor prolaktyny (ang. *prolactin receptor* – PrLR), erytropoetyny (ang. *erythropoietin receptor* – EpoR) i czynnika pobudzającego kolonie granulocytów (ang. *granulocyte colony stimulating factor* – G-CSF). Charakterystyczny dla tej klasy receptorów jest region receptora na zewnątrz komórki, zawiera on bowiem dwie domeny fibronektyn typu III, a każda z nich posiada wyróżniający się motyw. N-końcowa domena fibronektyn zawiera siedem zachowanych w ewolucji reszt cysteiny (w tym sześć w parach, połączonych mostkami dwusiarczkowymi) i pojedynczą resztę tryptofanu. Druga domena fibronektyn, wykryta po raz pierwszy u myszy, jest definiowana przez tzw. sekwencję WSXWS (W – tryptofan, S – seryna, X – dowolny aminokwas, W – tryptofan, S – seryna) zazwyczaj zlokalizowaną proksymalnie względem błony komórkowej [10]. W receptorze hormonu wzrostu ssaków sekwencja taka nie występuje. Obecna jest natomiast sekwencja YXXFS (Y – tyrozyna, X – to jedna z reszt aminokwasowych: glicyna, seryna, lizyna lub kwas glutaminowy, F – fenyloalanina, S – seryna) [3]. U człowieka ekwiwalentem takiego motywu jest Y²⁴⁰-G-E-F-S²⁴⁴, zaś u bydła jest to sekwencja Y²³⁶-G-K-F-S²⁴⁰. Analiza analogicznego motywu w doświadczeniach na królikach wykazała, że substytucje, bądź delekcje, dotyczące reszty tyrozyny (pierwsza reszta aminokwasowa motywu) i reszty seryny (ostatnia reszta aminokwasowa tego motywu) drastycznie zaburzają przekazywanie sygnału hormonu wzrostu za pośrednictwem jego receptora [11]. Wyżej wymieniona sytuacja jest m.in. przyczyną zespołu Larona u człowieka [12]. Wielu pacjentów z tym zespołem cechuje się mutacjami genetycznymi w eksonach kodujących domenę zewnątrzkomórkową.

W domenie wewnątrzkomórkowej rozpoznano również u myszy charakterystyczne motywy reszt aminokwasowych. Motyw bogaty w reszty prolina, oznaczony jako box1, usytuowany jest w pobliżu błony komórkowej. Ma on długość 8 reszt aminokwasowych o sekwencji ψ XXXAIPXP (ψ – aminokwas hydrofobowy, X – dowolny aminokwas,

Al. – aminokwas alifatyczny, P – prolina) [10]. U człowieka ma on postać I²⁹⁷-L-P-P-V-P-V-P-K³⁰⁵ [13], zaś w przypadku receptora hormonu wzrostu bydła odpowiadającą mu sekwencją jest I²⁹³-L-P-P-V-P-V-P³⁰¹ [8,12]. Inny cytoplazmatyczny motyw (box2), usytuowany analogicznie jak box1, zaczyna się grupą aminokwasów hydrofobowych ułożonych na przemian z aminokwasami o charakterze kwasowym i kończy się jedną lub dwoma dodatnio naładowanymi resztami aminokwasowymi [10]. Dla człowieka są to reszty aminokwasowe 325-338 [8]. Uważa się, że box2 jest wymagany do pełnej aktywacji JAK2 przez hormon wzrostu. Analiza substytucji lub delekcji reszt aminokwasowych w obrębie box1 i/lub box2 w receptorze hormonu wzrostu, receptorze prolaktyny oraz receptorze erytropoetyny sugeruje, że regiony te odgrywają decydującą rolę w przenoszeniu sygnału przez te receptory [14-16]. Badania Rowland i wsp. [16] wykazały, że dystalny odcinek receptora hormonu wzrostu myszy (począwszy od reszty aminokwasowej 391) jest niezbędny do postnatalnego wzrostu, fosforylacji Stat5 oraz aktywacji IGF-I.

POCZĄTKOWY ETAP PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU

Jaka jest więc prawdopodobna kaskada zdarzeń następujących po sobie podczas przenoszenia sygnału hormonu wzrostu? Początkowo hormon zostaje przechwycony przez receptor poprzez oddziaływanie z miejscami o wysokiej swoistości przyłączania hormonu do receptora (tzw. „site 1”). Do tak związanego hormonu asocjuje drugi receptor, tym razem za pomocą innego miejsca, już o niskiej swoistości przyłączania do receptora (tzw. „site 2”) [17]. Związanie hormonu wzrostu indukuje więc homodimeryzację dwóch cząsteczek receptora hormonu wzrostu, co zwiększa powinowactwo każdej molekuly receptora hormonu wzrostu do kinazy JAK2 [18] i zbliża jednocześnie dwie molekuly JAK2 do siebie. Każda z JAK2 następnie transfosforyluje jedną lub więcej tyrozyn w odpowiedniej domenie kinazy w parze JAK2, w następstwie czego aktywuje sąsiednią JAK2. W tym samym czasie fosforylacji ulegają także tyrozyny zlokalizowane w domenie wewnątrzkomórkowej receptora [10,17]. Hormon wzrostu, jak i większość cytokin, wymaga dwóch cząsteczek kinaz JAK2 do przeniesienia sygnału [5]. Kinaza JAK2 jest członkiem cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych z rodziny Janus, która obejmuje: JAK1, JAK2, JAK3 i tyk2 [19,20]. Spośród nich jedynie kinaza JAK2 okazała się „wrażliwa” na obecność hormonu wzrostu i była wykrywana na wystarczająco wysokim poziomie we wszystkich badanych typach komórek [18,21]. Wykazano tylko nieznaczny stymulację fosforylacji tyrozyn w JAK1 [22], JAK3 [23] i tyk2 [20] w warunkach *in vitro*. We wcześniejszych badaniach nie wykryto zależnej od hormonu wzrostu fosforylacji tyk2 [21], chociaż taka aktywacja, występująca na bardzo niskim poziomie, mogłaby być przeoczona. Tyk2 uważa się raczej za główną kinazę szlaku sygnałowego IFN α [18]. Badania z użyciem skróconych (GHR₁₋₃₉₁) oraz GHR₁₋₄₅₄) bądź zmutowanych form receptora hormonu wzrostu pokazały, że bogaty w resztę prolina motyw box1 w receptorze jest niezbędny dla zależnej od hormonu wzrostu asocjacji GHR-JAK2 i dla fosforylacji tyrozyn w JAK2, przez co box1 jest mało tolerancyjny na mutacje. To sugeruje fakt bezpośredniego przyłączania JAK2 do motywu box1 receptora [15,17,19]. Postawiono więc hipotezę, jakoby aktywacja JAK2, obok dime-

ryzacji receptora, była inicjującym krokiem w przenoszeniu sygnału hormonu wzrostu przez jego receptor [14]. Brown i wsp. [24] oraz Waters i wsp. [25] uważają, że dimeryzacja receptora sama w sobie nie jest wystarczająca do jego pełnej aktywacji. Proponują dodatkowy mechanizm aktywacji, obejmujący zmiany konformacyjne receptora spowodowane obrotem jednej podjednostki względem drugiej w ramach ukształtowanego dimera receptora po przyłączeniu hormonu wzrostu. Podjednostki receptora położone są wówczas asymetrycznie względem siebie, przy czym podjednostka druga (połączona z „site 2”) jest bardziej zbliżona do błony komórkowej. Taka konformacja sprawia, że nieaktywna transbłonowa α -helisa zmienia swoją orientację w formę aktywną. To usztywnia krótki łącznik (S²⁸⁸-K-Q-Q-R-I-K-M-L-I-L²⁹⁸) między regionem transbłonowym a box1. Wówczas box1 ustawiony jest optymalnie dla JAK2, które przyłączają się i transfosforylują się wzajemnie, co inicjuje sygnał.

Box1 nie jest jedynym regionem receptora hormonu wzrostu, wchodzącym w interakcję z JAK2; dla maksymalnej fosforylacji wymaganych reszt tyrozyny niezbędny jest również udział pozostałej, proksymalnej do błony komórkowej, części receptora (mniej więcej 1/3 regionu cytoplazmatycznego) [10,14,15]. Dla receptora hormonu wzrostu człowieka (hGHR) i szczura (rGHR) jest to odcinek składający się z 85 reszt aminokwasowych (GHR₂₉₅₋₃₈₀) [14]. Na bazie analogii można przypuszczać, że u bydła jest to odcinek GHR₂₉₀₋₃₇₅ z box1 zlokalizowanym w regionie GHR₂₉₃₋₃₀₁. W samej cząsteczce JAK2, na którą składa się 1132 reszt aminokwasowych, miejsce, które oddziałuje z receptorem wydaje się być zlokalizowane w obszarze N-końcowym (region obejmujący około 1/3 cząsteczki JAK2, reszty aminokwasowe 37-380) (domeny FERM JH4 – 7), charakterystycznym dla wszystkich członków rodziny kinaz JAK z potencjalnym miejscem fosforylacji tyrozyn IDGYRYL. Środkową część kinazy JAK2 (reszty aminokwasowe 545-809) określa się jako domenę pseudokinazy (JH2), zaś właściwą aktywność kinazy ma domena JH1 składająca się z reszt aminokwasowych w pozycji 849-1124 (z potencjalnym motywem ulegającym autofosforylacji EYYKVK) [19,26]. Aktywność kinazy JAK2 regulowana jest przez białko SIRP α 1, mające zdolność asocjacji zarówno z kinazą JAK2, jak i z białkiem SHP [27]. Dzięki aktywności fosfatazy, jaką charakteryzuje się białko SHP, następuje defosforylacja reszt tyrozyny w cząsteczce JAK2 i wyciszenie jej aktywności.

Fosforylacja reszt tyrozyny, jako wyraz czynnościowej modyfikacji białek, często prowadzi do ich późniejszego wiązania z domeną SH2 (domeny homologiczne do produktu onkogenu Src, ang. *Src Homology 2*), co wyznacza aktywność specyficznych szlaków sygnałowych. Domena SH2, która ma około 100 reszt aminokwasowych, wiąże się z fosforem reszty tyrozyny w sposób sekwencyjnie istotny [5,7]. Badania prowadzone na różnych gatunkach wykazały, że domena cytoplazmatyczna receptora hormonu wzrostu posiada kilkanaście zachowanych w ewolucji reszt tyrozyny: Y³³³, Y³³⁸ [7,28], Y³⁴¹, Y³⁴⁶ [16], Y³⁹¹, Y⁴³⁷ [7], Y⁴⁸⁷ [15,29], Y⁴⁹⁸ [16], Y⁵³⁴, Y⁵⁶⁶, Y⁵⁹⁵, Y⁶²⁶ [10,29], mogących ulegać fosforylacji i tym samym przyłączać się do białek z domeną SH2, co prawdopodobnie odgrywa istotną rolę w zróżnicowanym działaniu receptora. Natomiast kinaza JAK2 zawiera aż 48 reszt tyrozyny (badania przeprowadzone na gryzoniach),

co umożliwia jej oddziaływanie z wieloma cząsteczkami sygnałowymi [18]. Niemniej jednak w przypadku cząsteczki JAK2 nie stwierdzono obecności typowej domeny SH2, która wiązałaby reszty fosfotyrozyny, czy SH3 [19], rozpoznającej i wiążącej motyw PXXP (prolina – dwa dowolne aminokwasy – prolina). Rolę taką przypisuje się domenom JH4 i JH3 (reszty aminokwasowe 401-482) w JAK2 [26]. Nie jest jeszcze wiadomym, które reszty tyrozyny (zarówno w receptorze, jak i w kinazie JAK2) są fosforylowane w odpowiedzi na tylko i wyłącznie jeden specyficzny sygnał hormonu wzrostu, co wynika z braku jednoznacznych wyników badań [6,7,28]. Sądzi się raczej, że wymagana jest kombinacja i współdziałanie wielu ufosforylowanych reszt tyrozyny, zarówno w części absolutnie niezbędnej do oddziaływania z kinazą JAK2 (4 reszty tyrozyny), jak i w zróżnicowanej gatunkowo, C-końcowej części receptora (6 reszt tyrozyny).

AKTYWACJA SZLAKU KINAZ MAP

Oddziaływanie z domeną SH2 aktywuje głównie szlak sygnałowy kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny (ang. *mitogen-activated protein kinase* – MAPK). Kinazy MAP są serynowo-treoninowymi kinazami, które wymagają do swej aktywacji zarówno fosforylacji reszt tyrozyny, jak i reszt treoniny w obrębie swojej cząsteczki [30]. Spośród ponad dwudziestu izoform kinazy MAP poznano cztery takie białka, które są gwałtownie fosforylowane i aktywowane w odpowiedzi na hormon wzrostu, mianowicie: ERK1 (kinaza MAP p44), ERK2 (kinaza MAP p42), jako główne kinazy, oraz kinazę p38 i kinazę JNK (ang. *c-Jun aminoterminal kinase*) [31]. Pierwszym elementem aktywacji kinaz ERK1/2 jest białko SHC, posiadające domenę SH2, które to asocjuje z kinazą JAK2 i jest przez nią fosforylowane [6,7,10]. Następnie już do ufosforylowanego i związanego białka SHC przyłącza się białko adaptorowe Grb2 (o budowie SH2-SH3-SH2). Ten etap także został potwierdzony doświadczalnie [6]. W przypadku sygnału hormonu wzrostu aktywacja pozostałych molekuł w tej kaskadzie sygnałowej, czyli sos (ang. *sons-of-sevenless*; wymiennik GDP-GTP dla Ras), Ras (jedno z białek G aktywne w formie Ras-GTP), Raf (kinaza treoninowo-serynowa) i MEK („kinazy kinaz”; fosforylują reszty tyrozyny i treoniny w MAPK) [6,30,32] nie została jeszcze dobrze poznana, zwłaszcza u bydła. Nie ulega jednak wątpliwości, że obecność aktywnej kinazy JAK2 i zaangażowanie białek SHC i Grb2 są wczesnymi wydarzeniami w zależnej od hormonu wzrostu aktywacji kinaz MAP. Kinazy MAP znane są z aktywowania wielu innych białek, m.in. fosfolipazy A₂, białek cytoszkieletu, kinaz białkowych (np. p70^{sk}, p90^{sk}) oraz czynników transkrypcyjnych (np. Elk-1, c-fos, spi 2.1, ATF-2) [6,10,28,30,31]. Ostatnie wyniki badań Zhu i wsp. [33] wskazują na inny, całkowicie niezależny od kinazy JAK2, szlak kinaz MAP. Mianowicie przyłączenie hormonu wzrostu do receptora może aktywować kinazę c-Src, która to angażuje w dalszych etapach tylko białka należące do tej samej rodziny co białka Ras (a są to białka Ra1A i Ra1B). Mają one potencjalną zdolność do kontynuowania wcześniej opisanego szlaku (raf, MEK, MAPK). Jest to (obok transportu Ca²⁺ przez jego kanał; reszty aminokwasowe 465-517 w receptorze hormonu wzrostu [16]) drugi przykład wykorzystania przez receptor hormonu wzrostu kinaz niezależnych od aktywnie działającej kinazy

JAK2. Być może i inne kinazy z rodziny kinaz Src (np. c-Fyn) są aktywowane niezależnie od kinazy JAK2. Jednak, aby nastąpiła pełna aktywacja RalA i RalB przez hormon wzrostu, wymagana jest obecność obu aktywnych kinaz (c-Src i pośrednio Jak2 aktywująca białko Ras).

Przypuszcza się również, że aktywacja innych enzymów, a mianowicie kinaz białkowych C (ang. *protein kinase C* – PKC), może również odbywać się bez udziału kinazy JAK2. W zależności od izoformy kinazy, do jej aktywacji niezbędne są 1,2-diacylglicerol (DAG) i/lub Ca^{2+} [10].

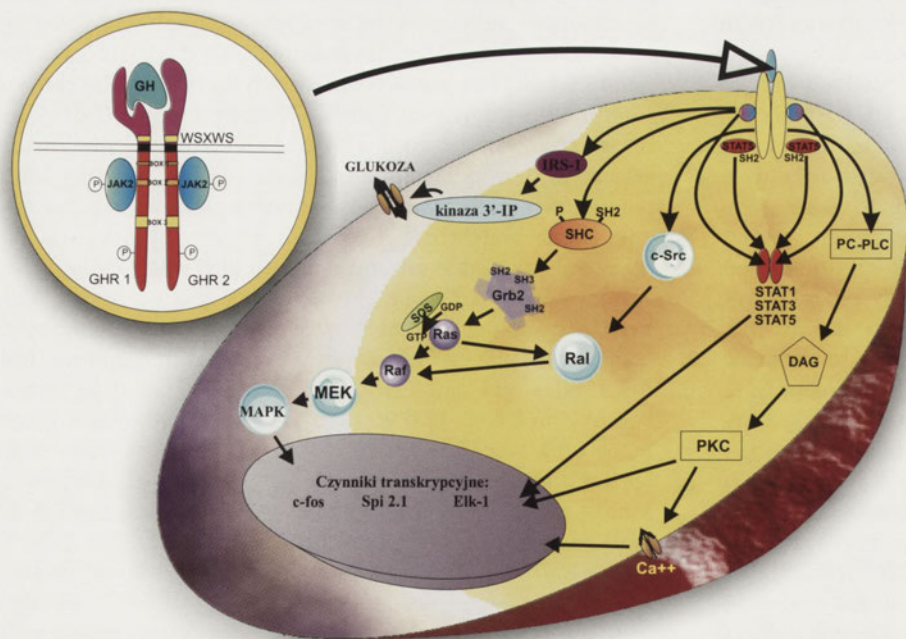
AKTYWACJA SZLAKU BIAŁEK STAT/IGF-I

Inny ważny szlak, przez który hormon wzrostu reguluje transkrypcję genów docelowych, to zaangażowanie w przenoszenie sygnału białek Stat (ang. *signal transducers and activators of transcription*). Białka Stat są „uśpionymi” cytoplazmatycznymi czynnikami transkrypcyjnymi. Działają przypuszczalnie przez oddziaływanie swych domen SH2 i SH3 z C-końcem receptora przy udziale kinazy JAK2 (już aktywnej). Białka te po fosforylacji jednej reszty tyrozynowej ulegają dimeryzacji. W tym stanie przemieszczają się do jądra, łączą z DNA i aktywują transkrypcję docelowych genów [34], po uprzednim rozpoznaniu sekwencji zgodnej GAS: TTNCNNNA (T – tymina, N – dowolna zasada azotowa, C – cytozyna, A – adenina) [5]. Dla hormonu wzrostu opisano indukowanie fosforylacji tyrozyny w cząsteczkach Stat1, Stat3 i Stat5 [10,28,29]. Szczególnie godny uwagi jest czynnik Stat5, nieodłącznie kojarzony z gruczołem mlecznym, który do swojej aktywacji wymaga dystalnego odcinka GHR (~ 40 reszt aminokwasowych w pozycji 477–516), definiowanego jako box3 [15] oraz przynajmniej jednej z czterech ufosforylowanych reszt tyrozyny (Y^{487} , Y^{534} , Y^{566} lub Y^{627}) w C-końcowej części receptora [29]. W grupie czynników transkrypcyjnych Stat5 wyróżnia się Stat5b – najlepiej poznane białko z tej rodziny – oraz Sta-

t5a – w 96% identyczne ze Stat5b. Stwierdzono, że oba te czynniki w znacznym stopniu pośredniczą w zależnej od somatotropiny aktywacji transkrypcji genu *IGF-I* w wątrobie [16,35] ponieważ w promotorze *IGF-I* stwierdzono obecność charakterystycznych sekwencji łączących się z białkiem Stat5 [36]. U człowieka Stat5 do swej aktywacji wymaga połączenia z Y^{469} i/lub Y^{516} w hGHR [13], zaś u myszy niezbędna jest tyrozyna Y^{498} oraz w mniejszym stopniu Y^{341} i Y^{346} [16]. Natomiast Stat1 wydaje się nie wymagać box3, ponieważ odnotowuje się jego działanie w obecności tylko box1 i aktywnej kinazy JAK2 [29]. Stat3 również wydaje się wymagać tylko aktywnej kinazy JAK2. Wiadomo, że kinaza JAK2 zawiera dwa motywy wiążące Stat3 (YXXQ). Jedynie mutacje w box1 redukowały istotnie aktywność Stat3 [13]. Aktywacja specyficznych Stat przez hormon wzrostu może różnić się w zależności od gatunku, jak i typu komórek docelowych [18]. Możliwe jest także oddziaływanie z białkami Ras, dlatego uważa się, że aktywacja Stat może być zależna, bądź niezależna od tych białek [32]. Wyciszenie sygnału GH-GHR-Stat5 odbywa się przy udziale białek SOCS (ang. *suppressor of cytokine signalling*), które mają zdolność kompetycji ze Stat5, a mianowicie łączą się one z resztą tyrozyny w pozycji 498 jak również z końcowym odcinkiem receptora hormonu wzrostu [16].

AKTYWACJA ELEMENTÓW SZLAKU INSULINY

Hormon wzrostu, poza opisanymi wcześniej właściwościami, znany jest również z insulino-podobnej aktywności, włączając w to podwyższenie transportu aminokwasów, transportu glukozy i lipogenezy [10]. Powyższe informacje mogą sugerować, że hormon wzrostu i insulina (jak również IGF-I, mający także swój własny skomplikowany szlak sygnałowy) aktywują pewne wspólne szlaki sygnałowe. Hormon wzrostu stymuluje fosforylację reszty tyrozyny w IRS-1 i IRS-2 (ang. *insulin receptor substrates 1 and 2*) [37]. Natura stymulowanego hormonem wzrostu



Rycina 1. Szlak sygnałowy hormonu wzrostu.

oddziaływania jego receptora z IRS-1 jest prawdopodobnie inna, niż analogiczne oddziaływanie z receptorem dla insuliny (IR). Być może wymagana jest obecność aktywnej kinazy JAK2. Fosforylacja reszty tyrozyny w IRS-1 i IRS-2 w odpowiedzi na insulinę lub hormon wzrostu umożliwia powstawanie miejsca wiązania dla specyficznych białek, zawierających domeny SH2, włączając w to SHPTP2 (ang. *SH2 protein-tyrosine phosphatase*), Grb2 oraz podjednostkę regulatorową kinazy 3'-fosfatydyloinozytolu (PI_3) o masie cząsteczkowej rzędu 85kDa [37]. Kinaza PI_3 bierze udział w takich procesach, jak stymulowany insuliną transport glukozy, synteza DNA, i aktywacja $p70^{S6}$ [10]. IRS-1 zawiera 20 reszt tyrozyny, mogących ulegać fosforylacji, z których przynajmniej osiem jest fosforylowanych po stymulacji insuliną [38]. Różnice w aktywacji kinaz przez IRS-1 (w zależności od liganda) mogą być rezultatem fosfory-

lacji unikalnych reszt tyrozyny. Taka wszechstronna możliwość oddziaływania IRS-1 i IRS-2 z wieloma molekułami sygnałowymi sprawia, że cząsteczki te prawdopodobnie są składowymi elementami szlaku sygnałowego hormonu wzrostu.

UWAGI KOŃCOWE

Jak zaprezentowano powyżej, szlak sygnałowy hormonu wzrostu to skomplikowany proces biochemiczny (Ryc.1), którego poszczególne elementy składowe nie zostały jeszcze do końca poznane. Pełne zrozumienie tego mechanizmu mogłoby umożliwić racjonalne wytłumaczenie laktogenego i galaktopoetycznego wpływu egzogenego hormonu wzrostu, jaki odnotowuje się po jego podaniu krowom. Ponadto pozwoliliby na zrozumienie ewentualnego wpływu mutacji punktowych, prowadzących do substytucji aminokwasów w poszczególnych cząsteczkach białkowych elementów szlaku osi somatotropowej, na ilość produkowanego mleka i jego skład. Specyficzne oddziaływanie (m.in. ograniczenie gatunkowe) między hormonem wzrostu a receptorem sprawia, że pole działania w tym względzie jest niezwykle ograniczone.

PIŚMIENNICTWO:

1. Salvatori R (2004) Growth hormone and IGF-I. *Endocrin Metab Disord* 5: 15-23
2. Zhu T, Goh EL, Graichen R, Ling L, Lobie PE (2001) Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell Signal* 13: 599-616
3. Kopchick JJ, Parkinson C, Stevens EC, Trainer PL (2002) Growth hormone receptor antagonists: discovery, development, and use in patients with acromegaly. *Endocrine Rev* 23: 623-646
4. Kopchick JJ (2003) Discovery and development of a new class of drugs: GH antagonists. *J Endocrinol Invest* 26 (10 Suppl): 16-26
5. Nowak JZ, Zawilska JB (1997) Receptory cytokin, W: Receptory: struktura, charakterystyka, funkcja. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 255-273
6. VanderKuur JA, Allevato G, Billestrup N, Norstedt G, Carter-Su C (1995) Growth hormone-promoted tyrosyl phosphorylation of SHC proteins and SHC association with Grb2. *J Biol Chem* 270: 7587-7593
7. VanderKuur JA, Wang X, Zhang L, Allevato G, Billestrup N, Carter-Su C (1995) Growth hormone-dependent phosphorylation of tyrosine 333 and/or 338 of the growth hormone receptor. *J Biol Chem* 270: 21738-21744
8. Milward A, Metherell L, Maamra M, Barahona MJ, Wilkinson IR, Camacho-Hubner C, Savage MO, Bidlingmaier CM, Clark AJL, Ross RJM, Webb SM (2004) Growth hormone (GH) insensitivity syndrome due to a GH receptor truncated after Box1, resulting in isolated failure of Stat5 signal transduction. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 1259-1266
9. Rosenfeld RG, Hwa V (2004) New molecular mechanism of GH resistance. *Europ J Endocrinol* 151: S11-S15
10. Argetsinger LS, Carter-Su C (1996) Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol Rev* 76: 1089-1107
11. Baumgartner JW, Wells CA, Chen C-M, Waters MJ (1994) The role of the WSXWS equivalent motif in growth hormone receptor function. *J Biol Chem* 269: 29094-29101
12. Jorge AA, Souza SC, Arnhold JJ, Mendonca BB (2004) The first homozygous mutation (S226I) in the highly-conserved WSXWS-like motif of the GH receptor causing Laron syndrome: suppression of GH secretion by GnRH analogue therapy not reversed by dihydrotestosterone administration. *Clin Endocrinol* 60: 36-40
13. Tiulpakov A, Rubtsov P, Dedov I, Peterkova V, Bezlepina O, Chrousos GP, Hochberg Z (2005) A novel C-terminal growth hormone receptor (GHR) mutation results in impaired GHR-Stat5 but normal Stat3 signaling. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 542-547
14. VanderKuur JA, Wang X, Zhang L, Campbell GS, Allevato G, Billestrup N, Norstedt G, Carter-Su C (1994) Domains of the growth hormone receptor required for association and activation of JAK2 tyrosine kinase. *J Biol Chem* 269: 21709-21717
15. Wang X, Souza SC, Kelder B, Cioffi JA, Kopchick JJ (1995) A 40-amino acid segment of the growth hormone receptor cytoplasmic domain is essential for GH-induced tyrosine-phosphorylated cytosolic proteins. *J Biol Chem* 270: 6261-6266
16. Rowland JE, Lichanska AM, Kerr LM, White M, D'Aniello EM, Maher SL, Brown R, Teasdale RD, Noakes PG, Waters MJ (2005) In vivo analysis of growth hormone receptor signalling domains and their associated transcripts. *Mol Cell Biol* 25: 66-77
17. Waters MJ, Shang CA, Behncken SN, Tam SP, Li H, Shen B, Lobie PE (1999) Growth hormone as a cytokine. *Clinic Experim Pharmacol Physiol* 26: 760-764
18. Silva CM, Lu H, Weber MJ, Thorner MO (1994) Differential tyrosine phosphorylation of JAK1, JAK2, and STAT1 by growth hormone and interferon- γ in IM-9 cells. *J Biol Chem* 269: 27532-27539
19. Frank SJ, Yi W, Zhao Y, Goldsmith JF, Gilliland G, Jiang J, Sakai I, Kraft AS (1995) Regions of the JAK2 tyrosine kinase required for coupling to the growth hormone receptor. *J Biol Chem* 270: 14776-14785
20. Hellgren G, Janson J-O, Carlson LMS, Carlson B (1999) The growth hormone receptor associates with Jak1, Jak2 and Tyk2 in human liver. *GH & IGF Res* 9: 212-218
21. Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvenninen O, Ihle JN, Carter-Su C (1993) Identification of Jak2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74: 237-244
22. Smit LS, Meyer DJ, Billestrup N, Norstedt G, Schwartz J, Carter-Su C (1996) The role of the growth hormone (GH) receptor and Jak1 and Jak2 kinases in the activation of Stats 1, 3, and 5 by GH. *Mol Endocrinol* 10: 519-533
23. Johnston JA, Kawamura M, Kirken RA, Chen YQ, Blake TB, Shibuya K, Ortaldo JR, McVicar DW, O'Shea JJ (1994) Phosphorylation and activation of the Jak-3 janus kinase in response to interleukin-2. *Nature* 370: 151-153
24. Brown RJ, Adams JJ, Pelekanos RA, Wan Y, McKinstry WJ, Palethorpe K, Seeber RM, Monks TA, Eidne KA, Parker MW, Waters MJ (2005) Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. *Nat Struct Mol Biol* 12: 814-821
25. Waters MJ, Hoang HN, Farlille DP, Pelekanos RA, Brown RJ (2006) New insights into growth hormone action. *J Mol Endocrinol* 36: 1-7
26. Saharinen P, Vihinen M, Silvenninen O (2003) Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol Biol Cell* 14: 1448-1459
27. Stofega MR, Argetsinger LS, Wang H, Ullrich A, Carter-Su C (2000) Negative regulation of growth hormone receptor/JAK2 signaling by Signal Regulatory Protein α . *J Biol Chem* 275: 28222-28229
28. Lobie PE, Allevato G, Nielsen JH, Norstedt G, Billestrup N (1995) Requirement of tyrosine residues 333 and 338 of the growth hormone (GH) receptor for selected GH-stimulated function. *J Biol Chem* 270: 21745-21750
29. Wang X, Darus CJ, Xu BC, Kopchick JJ (1996) Identification of growth hormone receptor (GHR) tyrosine residues required for GHR phosphorylation and JAK2 and STAT5 activation. *Mol Endocrinol* 10: 1249-1260
30. Hommers DW, Peppelenbosch MP, Van Deventer SJH (2003) Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* 52: 144-151
31. Zhu T, Lobie E (2000) Janus kinase 2-dependent activation of p38 mitogen-activated protein kinase by growth hormone. *J Biol Chem* 275: 2103-2114
32. Winston LA, Hunter T (1995) Jak2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated Kinase/Mitogen-activated protein kinase by growth hormone. *J Biol Chem* 270: 30837-30840
33. Zhu T, Ling L, Lobie P (2002) Identification of a JAK2-independent pathway regulating growth hormone (GH)-stimulated p44/42 mitogen-activated protein kinase activity. *J Biol Chem* 277: 45592-45603

34. Xu BC, Wang X, Darus CJ, Kopchick JJ (1996) Growth hormone promotes the association of transcription factor STAT5 with the growth hormone receptor. *J Biol Chem* 271: 19768-19773
35. Wang Y, Jiang H (2005) Identification of a distal Stat5-binding DNA region that may mediate growth hormone regulation of insulin-like growth factor-I gene expression. *J Biol Chem* 280: 10955-10963
36. Woelfle J, Chia DJ, Rotwei P (2003) Mechanism of growth hormone (GH) action. Identification of conserved Stat5 binding sites that mediate GH-induced insulin-like growth factor-I gene activation. *J Biol Chem* 278: 51261-51266
37. Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K, Kahn R (2001) Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1 and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol* 21: 26-38.
38. Sun XJ, Crimmins DL, Myers MG, Miralpeix M, White MF (1993) Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol* 13: 7418-7428

Growth hormone signaling pathways

Sławomir Zych[✉], Iwona Szatkowska, Ewa Czerniawska-Piątkowska

Laboratory of Molecular Cytogenetics, Department of Ruminant Science, Faculty of Biotechnology and Animal Science, Agriculture University of Szczecin, 12 Doktora Judyma St., 71-460 Szczecin, Poland

[✉]e-mail: slawomir.zych@biot.ar.szczecin.pl

Key words: growth hormone, growth hormone receptor, JAK2 kinase, MAP kinase, Stat proteins

ABSTRACT

The substantial improvement in the studies on a very complicated mechanism — growth hormone signaling in a cell, has been noted in last decade. GH-induced signaling is characterized by activation of several pathways, including extracellular signal-regulated kinase (ERK), the signal transducer and activator of transcription and phosphatidylinositol-3 kinase (PI₃) pathways. This review shows a current model of the growth hormone receptor dimerization, rotation of subunits and JAK2 kinase activation as the initial steps in the cascade of events. In the next stages of the signaling process, the GH-(GHR)₂-(JAK2)₂ complex may activate signaling molecules such as Stat, IRS-1 and IRS-2, and particularly all cascade proteins that activate MAP kinase. These pathways regulate basal cellular functions including target gene transcription, enzymatic activity and metabolite transport. Therefore growth hormone is considered as a major regulator of postnatal growth and metabolism, probably for mammary gland growth and development too.

Rola kanałów jonowych w procesie apoptozy

STRESZCZENIE

W błonie plazmatycznej oraz w mitochondrialnej błonie wewnętrznej i zewnętrznej występuje liczna grupa kanałów jonowych, które są odpowiedzialne nie tylko za prawidłowe funkcjonowanie komórek w warunkach fizjologicznych, ale uczestniczą również bezpośrednio w procesie apoptozy. W komórkach apoptotycznych aktywowane kanały potasowe i chlorkowe błony plazmatycznej kontrolują objętość komórek oraz pośredniczą w regulacji aktywności proteaz i nukleaz. Kanały obecne w błonie zewnętrznej i wewnętrznej mitochondriów uczestniczą w transporcie jonów oraz apoptogennych czynników z przestrzeni międzybłonowej do cytosolu. Podczas apoptozy bardzo ważną rolę w uprzepuszczeniu zewnętrznej błony mitochondrialnej pełnią białka rodziny Bcl-2. W artykule zamieszczono najnowsze dane o roli kanałów jonowych w komórkach apoptotycznych oraz o udziale białek Bcl-2 w regulacji apoptozy.

WPROWADZENIE

Apoptoza (programowana śmierć komórek) jest najbardziej powszechną formą śmierci komórek zarówno podczas rozwoju i dojrzewania wielokomórkowych organizmów jak i w procesach ich prawidłowego funkcjonowania. Rozróżnienia apoptozy od nekrotycznej śmierci komórek dokonujemy na podstawie specyficznych zmian morfologicznych i biochemicznych: zmiany objętości komórek oraz integralności błony plazmatycznej, asymetrii lipidów, powstawania ciałek apoptotycznych, zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, fragmentacji DNA i degradacji białek komórkowych [1].

Liczne publikacje na temat indukcji apoptozy przez różnego typu czynniki chemiczne oraz fizyczne są bogatym źródłem informacji o subkomórkowej i molekularnej regulacji tego procesu. Najbardziej intensywnie prowadzone do tej pory badania dotyczyły przede wszystkim poznania procesów uwalniania apoptogennych białek z mitochondriów, powstania apoptosomu, aktywacji kaspaz oraz oligonukleosomalnej degradacji DNA [2-4]. Natomiast znacznie mniej uwagi poświęcono roli i udziałowi białek transportujących jony poprzez błony komórkowe podczas apoptotycznej śmierci komórek. Badania uczonych różnych ośrodków naukowych wskazują, że mediatorami apoptozy są nie tylko proteazy, nukleazy i reaktywne formy tlenu, ale proces jest również regulowany przez jony komórkowe. Błona plazmatyczna jak i zewnętrzna i wewnętrzna błona mitochondrialna zawierają kanały potasowe, chlorkowe, wapniowe oraz kanały anionowe zależne od potencjału błonowego (VDAC) [5]. Kanały te nie tylko kontrolują objętość komórek, ale podczas apoptozy regulują także aktywność kaspaz i nukleaz [6-8]. W mitochondriach ponadto występują wielobiałkowe kompleksy zwane megakanałami (MPTP – ang. *mitochondrial permeability transition pore*), kanały MAC (ang. *mitochondrial apoptosis-induced channel*) oraz kanały utworzone przez białka rodziny Bcl-2. Wymienione kanały aktywowane są zarówno w zewnętrznym (receptorowym) jak i wewnętrznym (mitochondrialnym) szlaku apoptozy. Proces apoptozy z udziałem mitochondriów przebiega pod kontrolą regulatorowych białek rodziny Bcl-2 oraz modulowany jest przez białka cytoplazmatyczne i lipidy błonowe [9-11].

AKTYWACJA KANAŁÓW JONOWYCH BŁONY PLAZMATYCZNEJ W ZEWNĘTRZNYM SZLAKU APOPTOZY

W zewnętrznym szlaku apoptozy uczestniczą obecne w błonie plazmatycznej receptory śmierci rodziny TNF. Należy do niej najlepiej poznany receptor Fas (apo-1/CD95) oraz receptory TNF-R1, TRAMP (DR3), TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5) i DR6. Receptor Fas po przyłączeniu liganda FasL ulega trimeryzacji. Rozmieszczone w cytoplazmatycznych regionach Fas domeny śmierci w oddziaływaniu z białkiem adaptorowym FADD tworzą kompleks sygnalizacyjny

Zofia Józwiak[✉]

Agnieszka Marczak

Katedra Termobiologii, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

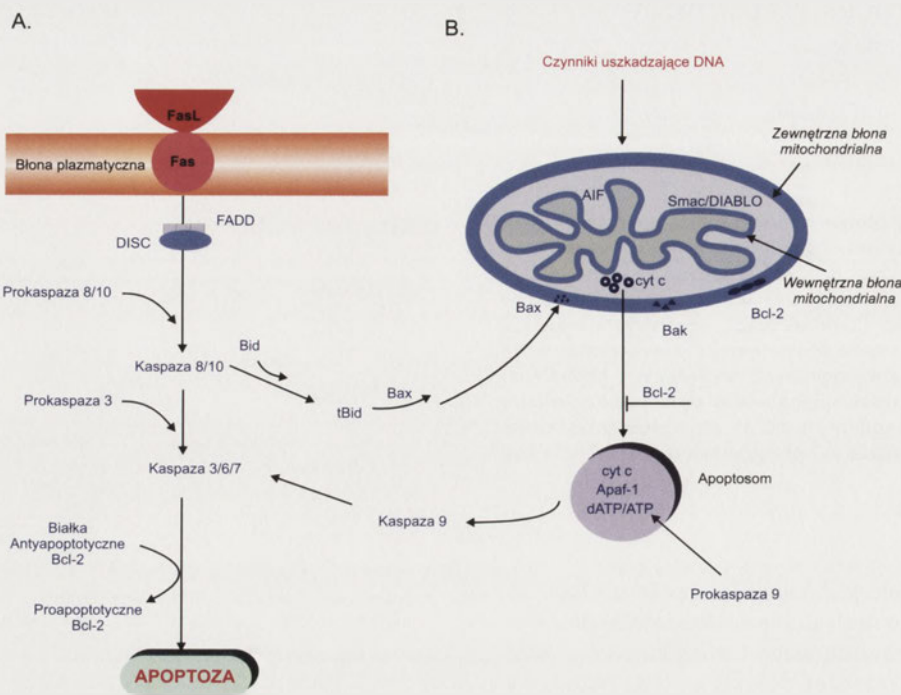
[✉]Katedra Termobiologii, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: zjozwiak@biol.uni.lodz.pl, tel. (042) 635 44 79

Artykuł otrzymano 9 marca 2006 r.

Artykuł zaakceptowano 20 kwietnia 2006 r.

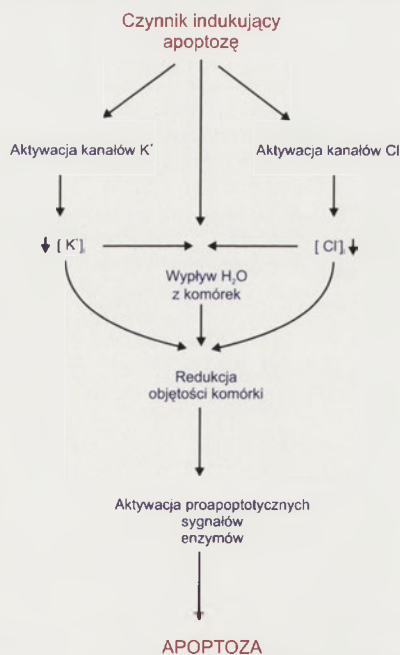
Słowa kluczowe: apoptoza, białka rodziny Bcl-2, błona plazmatyczna, cytochrom c, kanały jonowe, mitochondrialna błona wewnętrzna, mitochondrialna błona zewnętrzna

Wykaz skrótów: ANT (ang. *adenine nucleotide translocase*) – translokaza nukleotydów adeninowych; Apaf-1 (ang. *apoptosis protease-activating factor-1*) – czynnik 1 aktywujący proteazy w procesie apoptozy; AVD (ang. *apoptotic volume decrease*) – apoptotyczna redukcja objętości; Bcl-2 (ang. *B-cell leukemia/lymphoma 2*) – białko rodziny Bcl-2; BH (ang. *Bcl-2 homology domain*) – domena homologii białek rodziny Bcl-2; DISC (ang. *death inducing signaling complex*) – kompleks sygnalizacyjny, indukujący śmierć; FADD (ang. *Fas-associated death domain*) – Fas – zasocjowane białko z domeną śmierci; MAC (ang. *mitochondrial apoptosis-induced channel*) – kanał indukujący apoptozę w mitochondriach; PS (ang. *phosphatidylserine*) – fosfatydyloseryna; MPTP (ang. *mitochondrial permeability transition pore*) – mitochondrialny megakanał; TNF (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik nekrozy nowotworu; VDAC (ang. *voltage-dependent anion channel*) – kanał anionowy regulowany przez zmiany potencjału błonowego.



Rycina 1. Uproszczone dwa główne szlaki apoptozy. (A) Szlak receptorowy (zewnętrzny), rozpoczynający się w błonie plazmatycznej. (B) Szlak mitochondrialny (wewnętrzny), regulowany przez białka rodziny Bcl-2 obecne podczas apoptozy w zewnętrznej błonie mitochondrialnej.

ny DISC, który aktywuje prokaspazę 8/10 do enzymatycznie aktywnej kaspazy 8/10. Kaspaza 10 jest homologiem kaspazy 8, który występuje tylko w tkankach człowieka. (Ryc. 1A). Dalsze etapy apoptozy stymulowanej przez receptor Fas zależą od typu komórek. W komórkach zawierających wysoki poziom aktywnej kaspazy 8 dochodzi do bezpośredniej aktywacji wykonawczej kaspazy 3 i proteolitycznej kaskady reakcji bez udziału mitochondriów. W przypadku



Rycina 2. Udział kanałów K⁺ i Cl⁻ w indukcji apoptozy. Czynniki apoptotyczne aktywując kanały jonowe błony plazmatycznej prowadzą do wycieku jonów K⁺, Cl⁻ i wody do środowiska zewnętrznego oraz do apoptotycznej redukcji objętości komórki. Zmiany [K⁺]_i, [Cl⁻]_i jak i objętości komórki mogą pośredniczyć w aktywacji kaspaz i endonukleaz.

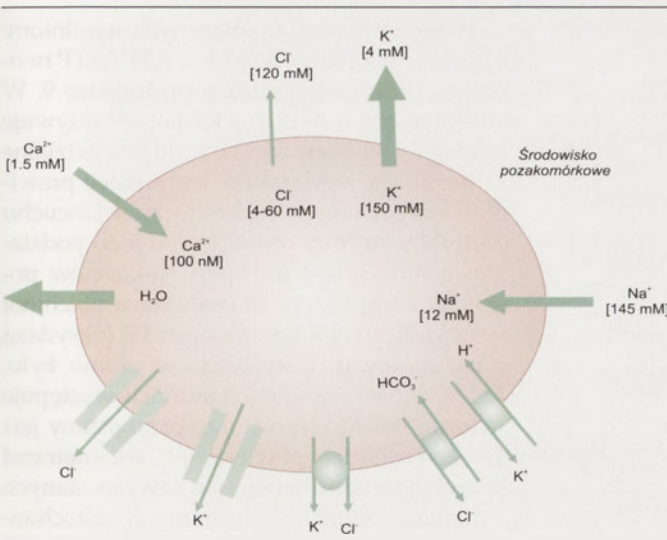
komórek zawierających małe ilości kaspazy 8, enzym trawi białko proapoptyczne Bad. Uwolniony aktywny poliipeptyd znany jako tBid zapoczątkowuje aktywację innych białek uczestniczących w procesie apoptozy zależnej od mitochondriów (Ryc. 1B). W nieobecności kaspazy 8, białko Bid aktywowane jest także przez kaspazę 10 [12,13].

Podczas apoptotycznej śmierci komórek błona plazmatyczna zachowuje integralność, pomimo iż zachodzą w niej liczne zmiany zarówno właściwości strukturalnych jak i funkcjonalnych. W błonie plazmatycznej w procesie apoptozy obserwowana jest eksternalizacja fosfatydyloseryny (PS) [14]. Translokacja PS z monowarstwy wewnętrznej błony do zewnętrznej monowarstwy wywołana jest wzrostem aktywności skramblazy aktywowanej przez jony Ca²⁺ oraz spadkiem aktywności translokazy aminofosfolipidów. Badania Ishii i wsp. [15] opublikowane w 2005 roku sugerują, że fosfatydyloseryna w komórkach apoptotycznych obecna jest w tych obszarach błony, w których występują również straty lipidowe.

Zaobserwowano, że kiedy dochodzi do uszkodzenia tratw równocześnie maleje liczba komórek apoptotycznych zawierających fosfatydyloserynę w warstwie powierzchniowej błony plazmatycznej. W komórkach apoptotycznych notowana jest także zmiana płynności błony plazmatycznej oraz aktywacja kanałów jonowych [7].

AKTYWACJA KANAŁÓW POTASOWYCH

We wczesnych etapach apoptozy komórki kurczą się i dochodzi do wycieku jonów K⁺, Cl⁻ oraz wody (Ryc. 2). Apoptotyczna redukcja objętości komórek (AVD) jest 2-etapowym procesem. Pierwsza faza zmiany objętości komórek obserwowana jest przed uwalnianiem cytochromu c z mitochondriów i aktywacją kaspaz [16,17]. Druga faza zmniejszenia rozmiarów komórki związana jest z fragmentacją jądra/DNA [18]. Oznacza to, że w komórkach apoptotycznych obie fazy AVD indukowane są na drodze różnych mechanizmów, podczas których w obu przypadkach dochodzi do aktywacji kanałów jonowych i transporterów. Krytyczną rolę w regulacji objętości komórek jak i w procesie apoptozy pełnią kanały potasowe oraz w mniejszym stopniu kanały chlorkowe. W komórkach apoptotycznych jony potasowe wyciekają z komórek zarówno poprzez kanały potasowe, jak i drogą symportu razem z jonami chlorkowymi, bądź związanego antyportu K⁺/H⁺-Cl⁻/HCO₃⁻ (Ryc. 3) [19]. Podczas apoptozy stężenie wewnątrzkomórkowego potasu [K⁺]_i maleje do 50 mM w fibroblastach [20] oraz do 35–50 mM w apoptotycznych tymocytach i limfocytach [21,22]. W większości przypadków komórki tolerują 20–30% spadek zawartości całkowitego stężenia jonów K⁺. Po przekroczeniu stężenia [K⁺]_i < 50% komórki wkraczają na drogę apoptozy [23]. Rycina 4 przedstawia w porządku chronologicznym procesy apoptotyczne w komórkach regulowane przez



Rycina 3. Rozmieszczenie jonów K^+ , Na^+ , Ca^{2+} i Cl^- po obu stronach błony plazmatycznej oraz kierunki ich przepływu w komórkach apoptotycznych. Jony wypływają z cytosolu poprzez kanały jonowe oraz drogą symportu i antyportu.

jonu K^+ . Inicjatorami apoptozy stymulowanej przez jony K^+ mogą być receptory śmierci $TNF\alpha$ i Fas, prowadzące do aktywacji kanałów potasowych w błonie plazmatycznej, a w kolejnych etapach apoptozy do zmiany przewodnictwa kanałów potasowych błony mitochondrialnej. Apoptotyczna redukcja objętości komórek poprzedzona jest szeregiem zmian zachodzących w mitochondriach: zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu (RFT), spadkiem zawartości ATP i zahamowaniem aktywności Na^+, K^+ -ATPazy. Kolejne etapy apoptozy, zarówno zależne od kaspazy jak i niezależne, dotyczą aktywacji procesów degradacji DNA i białek prowadzących do śmierci komórek.

Jony K^+ , pełniące funkcję regulatorów różnych enzymów w wielu typach komórek w procesie apoptozy wywierają również znaczący wpływ na białka odpowiedzialne za śmierć komórek. Hughes i wsp. [18,22] oraz Bortner i Cidlowski [24] donoszą, że spadek wewnątrzkomórkowego stężenia jonów K^+ nie tylko powoduje aktywację kaspazy 3 i endonukleazy, ale również przyspiesza uwalnianie cytochromu c z limfocytów. Aktywacja kaspazy i nukleazy była całkowicie hamowana w środowisku zawierającym fizjologiczne (~ 140 mM) stężenie $[K^+]_i$. Wysokie stężenia $[K^+]_i$ blokują także tworzenie apoptosomu oraz apoptozę indukowaną przez receptory śmierci [25,26]. W wielu typach komórek skutecznymi inhibitorami apoptozy są związki hamujące funkcjonowanie kanałów potasowych: sole tetrametylo-amoniowe (TEA), tetrapentylo-amoniowe (TPeA), 4-aminopirydyna (4-AP), chinina, chinidyna [22,23,27].

W błonach komórek apoptotycznych w procesie uwalniania jonów K^+ uczestniczą przede wszystkim kanały zależne od napięcia błony (K_v). Aktywacja kanałów potasowych jest jedną z pierwszych odpowiedzi komórek nowotworowych człowieka i gryzoni w procesie apoptozy indukowanej przez receptory śmierci TNF [28]. W proapoptotycznym wpływie jonów K^+ z komórek pośredniczą również kanały aktywowane przez Ca^{2+} (K_{Ca}) oraz kanały wrażliwe na ATP (K_{ATP}) [23]. Inhibitorami aktywacji kanałów potasowych są antyapoptotyczne białka Bcl-2 [29]. Mechanizmy interakcji

Bcl-2 z kanałami potasowymi nie są jeszcze poznane. Dotychczasowe wyniki badań nad rolą jonów K^+ w apoptozie nie pozwalają jednoznacznie określić czy spadek $[K^+]_i$ należy uznać za czynnik indukujący śmierć komórek czy przyjąć, że zaburzenia poziomu jonów K^+ są konsekwencją procesów towarzyszących procesowi apoptozy. Yu [23] na podstawie własnych badań oraz innych autorów [21,22] sugeruje, że, pomimo iż redukcja wewnątrzkomórkowego stężenia jonów K^+ jest konieczna i prawdopodobnie powszechna w apoptotycznej śmierci komórek, to w wielu przypadkach potrzebne są dodatkowe sygnały aktywujące apoptozę, aby wspólnie z obniżonym $[K^+]_i$ mogła być skutecznie realizowana programowana śmierć komórek.

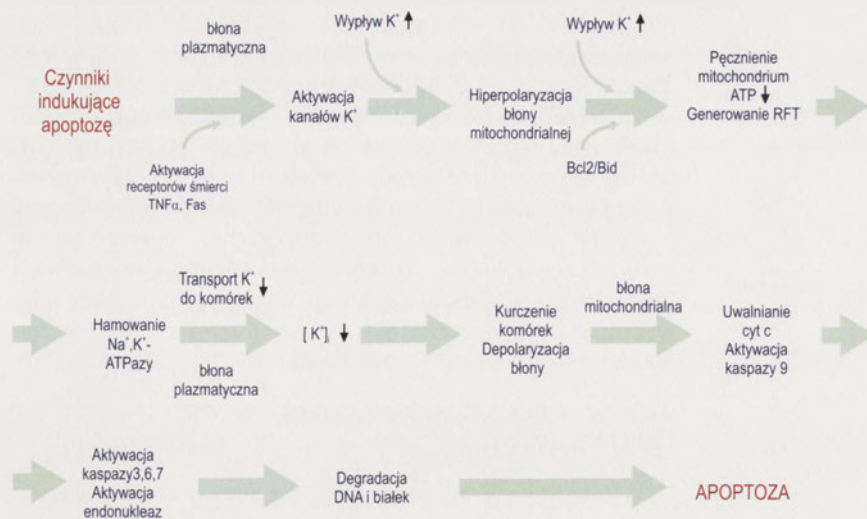
AKTYWACJA KANAŁÓW CHLORKOWYCH I WAPNIOWYCH

W komórkach apoptotycznych z wypływem jonów K^+ jednocześnie obserwowany jest wypływ jonów Cl^- . Wzrost zawartości pozakomórkowych jonów chlorkowych wywiera istotny wpływ na AVD i prawdopodobnie również na kolejne fazy apoptozy. W błonie plazmatycznej w procesie apoptozy udział biorą kanały chlorkowe aktywowane przez jony Ca^{2+} (Cl_{Ca}) i kanały wrażliwe na zmiany objętości komórek [7,16]. O udziale jonów Cl^- w apoptozie świadczą m. in. badania przeprowadzone w obecności związków blokujących aktywację kanałów. Szabo i wsp. [30] donoszą o hamowaniu przez DIDS i DPC apoptozy indukowanej przez receptor CD95 w limfocytach T. Antagoniści kanałów chlorkowych zapobiegają także uwalnianiu cytochromu c , aktywacji kaspazy 3 oraz fragmentacji DNA [31,32].

Aktywacja kanałów wapniowych w błonie plazmatycznej powoduje przede wszystkim zwiększony transport tych jonów do komórek, co prowadzi do wzrostu ich objętości, a w kolejnych etapach do nekrotycznej śmierci. Dane o udziale jonów Ca^{2+} w apoptozie są kontrowersyjne. Wynika z nich, że umiarkowany wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia $[Ca^{2+}]_i$, szczególnie w pierwszym okresie zmian, może pośredniczyć w przekazywaniu sygnałów indukujących apoptozę [33]. Natomiast wzrost $[Ca^{2+}]_i$ w ostatniej fazie apoptozy prowadzi do aktywacji proteaz i endonukleaz [34-36]. Powyższe spostrzeżenia sugerują, że jakkolwiek jony Ca^{2+} wywierają istotny wpływ na funkcjonowanie komórek, zmiana samego tylko stężenia $[Ca^{2+}]_i$ nie jest zdolna do bezpośredniej indukcji apoptozy. Jony Ca^{2+} mogą natomiast aktywnie uczestniczyć w przekazywaniu sygnałów apoptotycznych prowadzących do aktywacji kanałów K_{Ca} , Cl_{Ca} oraz transporterów tych jonów obecnych w błonie plazmatycznej komórek.

KANAŁY ANIONOWE REGULOWANE PRZEZ POTENCJAŁ BŁONOWY (VDAC)

W błonie plazmatycznej komórek prawidłowych oraz apoptotycznych wykryto kanał aniono-selektywny regulowany przez zmiany potencjału błonowego (VDAC1) będący izoformą 1 kanału VDAC dotychczas znanego w zewnętrznej błonie mitochondrialnej [8,37]. Izofornie zasadniczo zachowują podstawowe właściwości VDAC, ale w zależności od typu komórek mogą pełnić różne funkcje regulatorowe. Kanałowi VDAC1 błony plazmatycznej przypisywano zdolność wiązania plazminogenu [38],



Rycina 4. Regulacja apoptozy przez jony K^+ . Aktywacja kanałów potasowych przez receptory śmierci indukuje szereg zmian w błonie plazmatycznej i mitochondrialnej komórek, które prowadzą do uwalniania cytochromu c z mitochondrium, aktywacji kaspaz oraz degradacji DNA i białek [wg 23].

steroidów [39] oraz właściwości reduktazy NADH:żelazicyjanek [40]. Kolejne badania potwierdziły, że reduktaza NADH:żelazicyjanek, o masie cząsteczkowej około 35 kDa, wyizolowana z błon plazmatycznych jest identyczna z VDAC1. Białko może uczestniczyć w transporcie żelaza oraz regulując poziom NADH/NAD⁺ może także modyfikować proces apoptozy [41]. Kanały te są konstytutywnie obecne w błonie plazmatycznej komórek prawidłowych i apoptotycznych, ale w formie aktywnej występują tylko w komórkach, które wkroczyły na drogę apoptozy [42]. VDAC1 pełni różną funkcję w błonie plazmatycznej obu typów komórek. W komórkach prawidłowych jest odpowiedzialny za utrzymanie gradientu potencjału błonowego, zaś w komórkach apoptotycznych uczestniczy w transporcie anionów do środowiska zewnętrznego w pierwszych etapach apoptozy [42].

Elinder i wsp. [42] aktywację kanału VDAC1 obserwowali w błonie plazmatycznej dwóch linii komórek nerwowych, HT22 i SK-N-MC podczas apoptozy indukowanej przez 2,3-dimetoksy-1,4-naftochinon i 7,8-tlenek styrenu. W obu przypadkach inhibitory kanału, anty-VDAC1 przeciwciała, hamowały wyciek anionów oraz apoptotyczną śmierć komórek. Pomimo poczynionych znacznych postępów w badaniach właściwości VDAC1 błon plazmatycznych konieczne są dalsze prace, które wyjaśnią budowę i rolę kanału w komórkach prawidłowych a także funkcję jaką pełni białko w apoptozie indukowanej przez różne czynniki chemiczne i fizyczne w różnego typu komórkach.

AKTYWACJA KANAŁÓW JONOWYCH W WEWNĘTRZNYM SZLAKU APOPTOZY

Kluczową funkcję w wewnętrznym szlaku apoptozy pełnią mitochondria (Ryc. 1B). Pod wpływem czynników uszkodzających DNA oraz w obecności białka Bid, a właściwie jego aktywnej formy tBid, dochodzi do aktywacji mitochondriów, podczas której z przestrzeni międzybłonowej uwalniany jest do cytosolu cytochrom c oraz inne białka apoptogenne [43,44].

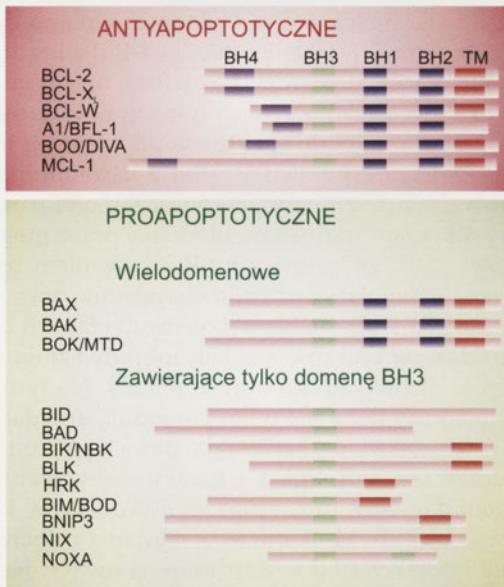
W komórkach apoptotycznych uwolniony cytochrom c razem z Apaf-1 i dATP/ATP tworzy apoptosom aktywujący prokaspazę 9. W kolejnym etapie aktywna kaspaza 9 aktywuje kaspazy wykonawcze 3,6,7 odpowiedzialne za destrukcję komórek. W komórkach prawidłowych cytochrom c uczestniczy w łańcuchu oddechowym mitochondriów, a jego podstawową funkcją jest transport elektronów pomiędzy kompleksem III (reduktaza ubichinol – cytochrom c) a kompleksem IV (oksydaza cytochromowa). Dotychczas wiadomo było, że cytochrom c w mitochondriach występuje w formie niezwiązanej oraz przyłączony jest do zewnętrznej powierzchni wewnętrznej błony mitochondrialnej. Ciekawych danych o rozmieszczeniu cytochromu c w mitochondrialnej błonie wewnętrznej dostarczyły badania Brdiczki i wsp. [45]. Na podstawie analizy subfrakcji mitochondriów nerek, otrzymanych metodą wirowania w gradiencie sacharozy, stwierdzono, że 25% cytochromu c zawierają

miejsca kontaktowe łączące błonę wewnętrzną z błoną zewnętrzną organelli. Pozostałe 75% białka występuje w kręstach mitochondrialnych.

Przepuszczalność błony zewnętrznej jak i wewnętrznej błony mitochondrialnej dla jonów i substratów regulowana jest przez dwa różne mechanizmy. Przepuszczalność błony wewnętrznej kontrolowana jest przez megakanał MPTP, a aktywacja kanału przez jony Ca^{2+} i czynniki indukujące stres oksydacyjny prowadzi do zaburzenia procesów energetycznych i nekrotycznej śmierci komórek. Proces uprzepuszczenia mitochondrialnej błony zewnętrznej regulowany jest przez białka rodziny Bcl-2. Białka te kontrolują zarówno uwalnianie białek apoptogennych z mitochondriów do cytosolu jak i regulują transport jonów w procesie apoptozy [46,47].

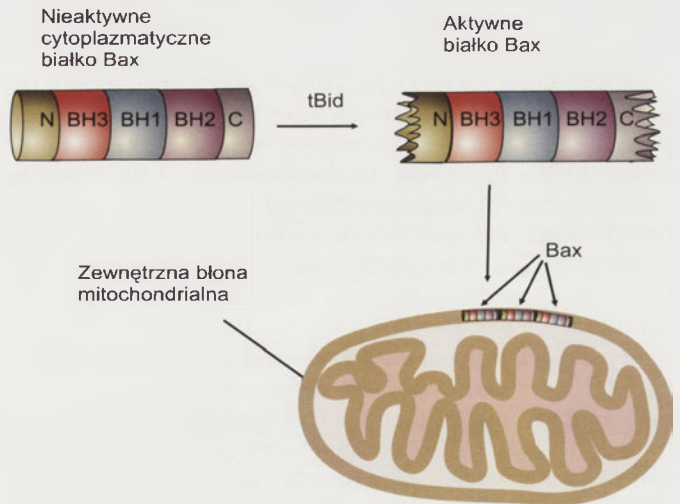
CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK RODZINY Bcl-2

Białka należące do rodziny Bcl-2 (ang. *B-cell lymphoma 2*) zbudowane są z 1-4 domen BH (ang. *Bcl-2 homology domains*), które decydują o właściwościach poszczególnych grup białek. W prawidłowych komórkach białka Bcl-2 występują w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, błonie jądrowej i siateczki śródplazmatycznej oraz w cytosolu. W komórkach apoptotycznych białka cytoplazmatyczne przemieszczają się do zewnętrznej błony mitochondrialnej [48,49]. Ze względu na strukturę i pełnione funkcje białka Bcl-2 dzielimy na 3 grupy: 1/ antyapoptotyczne, 2/ proapoptotyczne wielodomenowe i 3/ proapoptotyczne zawierające tylko domenę BH3 (Ryc. 5) [50,51]. Białka antyapoptotyczne nazywane są także białkami przeżycia. Do najbardziej znanych należą: Bcl-2, Bcl-X₁, Bcl-W, Mcl-1. Białka te zawierają domeny BH1-BH4, ale tylko domena BH4 konieczna jest do pełnienia funkcji antyapoptotycznych. Antyapoptotyczny mechanizm działania białek polega na bezpośrednim oddziaływaniu z białkami proapoptotycznymi. Przyłączenie białka Bcl-2 hamuje proces oligomeryzacji białek proapoptotycznych oraz tworzenie porów/kanałów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej [52,53]. Białka proapoptotyczne wielodomenowe zawierają



Rycina 5. Struktura białek rodziny Bcl-2. Białka pro- i antyapoptotyczne różnią się liczbą domen BH oraz występowaniem transbłonowej, hydrofobowej domeny TM. Obszary pomiędzy domeną BH4 i BH3 pełnią funkcję regulatorową. Za tworzenie kanałów odpowiedzialne są regiony BH1-BH2, a w procesie oligomeryzacji uczestniczą domeny BH1, BH2 i BH3.

BH1-BH3 domeny. W przeciwieństwie do białek antyapoptotycznych bezpośrednio uczestniczą w programowanej śmierci komórek. Do grupy tej należą białka Bax, Bak oraz Bok, Bcl-X_s [43]. Pomimo iż białka te zawierają identyczne, zachowane w ewolucji domeny, ich subkomórkowa lokalizacja jest całkowicie różna. Bak jest transbłonowym białkiem zewnętrznej błony mitochondrialnej i nie zmienia swojej lokalizacji w komórkach apoptotycznych. Z kolei Bax występuje głównie w cytosolu oraz jako peryferyczne białko mitochondrialne [54]. W warunkach fizjologicznych Bax występuje w stanie nieaktywnym. W odpowiedzi na apoptotyczne sygnały białko zmienia swoją konformację. Podczas aktywacji Bax dochodzi do odsłonięcia N-terminalnej domeny oraz modyfikowane są C-terminalne regiony białka (Ryc. 6). Aktywne białko Bax przenoszone jest do zewnętrznej błony mitochondrialnej, w

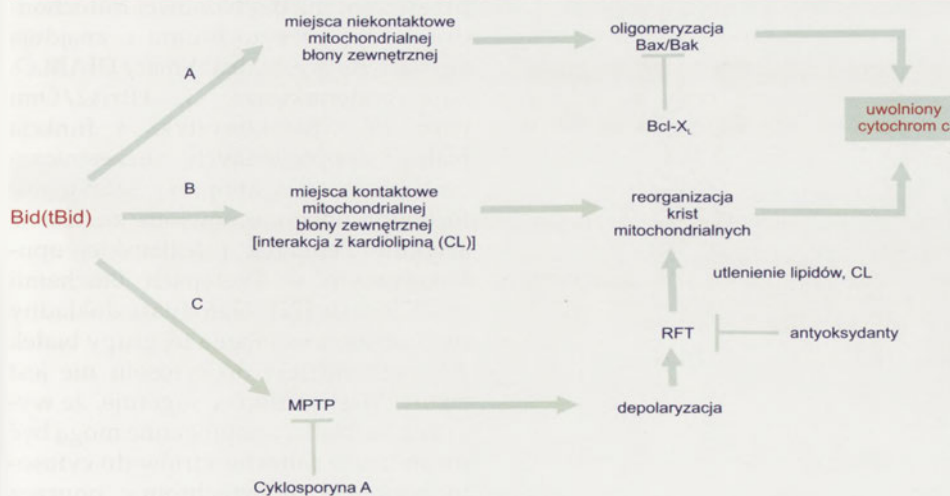


Rycina 6. Model aktywacji białka Bax. W komórkach prawidłowych Bax występuje w cytosolu, a jego C-terminalny region znajduje się w hydrofobowej kieszeni utworzonej przez domeny BH1, BH2 i BH3. W komórkach apoptotycznych Bax zmienia konformację po przyłączeniu aktywnej formy proapoptotycznego białka Bid (tBid). Aktywne białko Bax z odsłoniętym regionem N-terminalnym i zmodyfikowanym C-terminalnym przemieszcza się do zewnętrznej błony mitochondrialnej gdzie ulega oligomeryzacji.

której zarówno Bax jak i obecne w niej białko Bak ulegają oligomeryzacji i tworzą pory bądź kanały jonowe. Aktywację Bax i Bak stymuluje białko Bid a także białko p53, endofilina B1 i białko ASC [54-55]. Inhibitorami procesu aktywacji białek są: humanina, Ku70, białka ARC, 14-3-3 oraz białka szoku cieplnego Hsp60 i Hsp70 [54,56]. Do trzeciej grupy należą białka proapoptotyczne zawierające tylko domenę BH3 (białka domeny BH3). Białka nazywane są także mediatorami apoptozy, gdyż pośredniczą w przekazywaniu sygnałów śmierci do wielodomenowych białek proapoptotycznych Bax i Bak [57]. Większość białek grupy 3 (Bid, Bim, Bmf, Bad, Bik, Puma, Noxa) w odpowiedzi na proapoptotyczne sygnały po przekształceniu w aktywne cząsteczki przenoszona jest z cytosolu do mitochondrium [43]. Aktywowane transkrypcyjnie bądź potranslacyjnie białka domeny BH3 przyłączają się do proapoptotycznych i antyapoptotycznych białek, powodując odpowiednio ich oligomeryzację bądź inaktywację. Ważną rolę w procesie uprzepuszczelnienia zewnętrznej błony mitochondrialnej i wycieku cytochromu c do cytosolu pełni białko Bid [54,58].

KANAŁY UCZESTNICZĄCE W TRANSPORCIE CYTOCHROMU c

Znane są co najmniej dwa różne mechanizmy uwalniania cytochromu c z mitochondriów do cytosolu regulowane przez proapoptotyczne białko Bid [59]. W zależności od miejsca lokalizacji Bid w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, białko indukuje oligomeryzację wielodomenowych białek proapoptotycznych Bax/Bak bądź inicjuje procesy prowadzące do reorganizacji krist mitochondrialnych (Ryc. 7). Pierwszy mechanizm uwal-

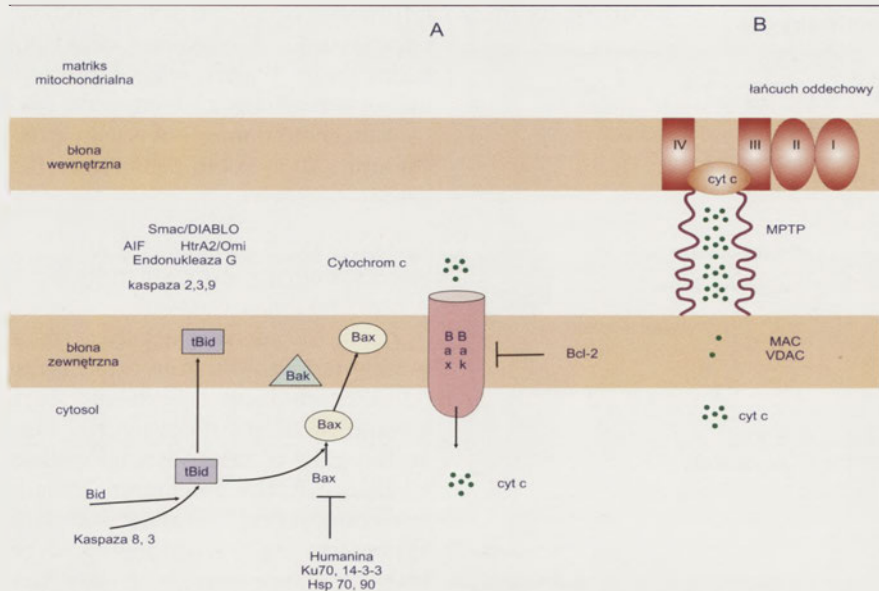


Rycina 7. Aktywacja mitochondriów przez białka proapoptotyczne Bid. tBid przyłącza się do mitochondrialnej błony zewnętrznej do obszarów bogatych w białka proapoptotyczne Bax/Bak (A) oraz do miejsc kontaktowych łączących mitochondrialną błonę wewnętrzną z błoną zewnętrzną. Miejsca kontaktowe zawierają tBid, kardiolinę i cytochrom c (B). tBid oddziałując z MPTP indukuje uwalnianie cytochromu c z krist mitochondrialnych po odłączeniu cytochromu c od utlenionej kardiolinę przez reaktywne formy tlenu (RFT) (C).

niania cytochromu *c* oparty jest na interakcji białko-białko w obszarach zewnętrznej błony mitochondrialnej bogatych w białka proapoptotyczne (Ryc. 7A). Proces oligomeryzacji białek Bax i Bak oraz kolejne etapy prowadzące do uprzepuszczelnienia błony zewnętrznej nie są dokładnie poznane. Z badań wielu autorów wynika, że proapoptotyczne białka Bax i Bak, aktywowane przez tBid tworzą w modelowych błonach lipidowych pory/kanały jonowe [60-62]. Rozmiary porów utworzonych przez Bax są wystarczająco duże dla cytochromu *c* ale nie dla większych białek uwalnianych z mitochondriów [62]. Białko Bax aktywowane przez tBid tylko w obecności lipidów tworzy w liposomach pory przepuszczalne dla 2 MDa dekstranu, poprzez które może być także uwalniany cytochrom *c* jak i inne apoptogenne czynniki [63]. Poprzez kanały Bax/Bak transportowany jest niezwiązany cytochrom *c*. Tworzenie kanałów oraz wyciek cytochromu *c* do cytosolu hamowane są przez konstytutywnie obecne w zewnętrznej błonie mitochondrialnej antyapoptotyczne białka Bcl-2 [46]. Rolę białek Bax/Bak w procesie uwalniania cytochromu *c* z mitochondriów do cytosolu jak i ich udział w regulacji apoptozy potwierdzono na komórkach myszy pozbawionych obu białek. W komórkach nie zawierających Bax i Bak, w odpowiedzi na sygnał śmierci, nie obserwowano uprzepuszczelnienia zewnętrznej błony mitochondrialnej [64]. W przypadku drugiego typu mechanizmu uwalniania cytochromu *c* z mitochondriów w procesie apoptozy mamy do czynienia z występowaniem interakcji białko-kardiolipina w regionach błony zewnętrznej zawierającej niewielkie ilości Bax i Bak [59]. Mając na uwadze, że tBid występuje tylko w zewnętrznej błonie mitochondrialnej a kardiolipina głównie w błonie wewnętrznej mitochondriów, interakcje tBid – kardiolipina w komórkach apoptotycznych mogą zachodzić w miejscach kontaktowych łączących obie błony mitochondrialne (Ryc. 7b). Obecność kardiolipiny w miejscach kontaktowych potwierdzono stosując barwnik, oraz 10-nonyl-akrydyny, selektywnie łączący się z fosfolipidem [65]. O występowaniu tBid w miejscach kontakto-

wych donoszą prace Luttera i wsp. [66] wykorzystujące do badań mikroskop elektronowy. Bezpośredniego dowodu na występowanie interakcji pomiędzy t-Bid a kardiolipiną w mitochondriach dostarczyły również oznaczenia lipidów wyekstrahowanych z mitochondriów traktowanych tBid w oparciu o metodę spektroskopii masowej [65]. Interakcje zachodzące pomiędzy t-Bid a kardiolipiną mogą także prowadzić do zmiany przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej, regulowanej przez megakanal MPTP (Ryc. 7c). Sprężone z funkcjonowaniem megakanalu procesy depolaryzacji mitochondriów oraz reakcje generowania RFT prowadzą w kolejnych etapach do utleniania lipidów, w tym również kardiolipiny i zmian strukturalnych krist mitochondrialnych [65,67]. Na tym etapie reaktywne formy tlenu nie tylko powodują utlenianie kardiolipiny, ale także przyspieszają dysocjację kompleksu cytochrom *c* – kardiolipina i uwalnianie cytochromu z miejsc kontaktowych oraz zmagazynowanego w kristach mitochondrialnych. Mechanizm uwalniania cytochromu *c* oparty na interakcji tBid – kardiolipina nie jest hamowany przez antyapoptotyczne białka Bcl-2, ale w obecności cyklosporyny A, inhibitora megakanalu [59,67].

Ostatnio zaproponowano nowy mechanizm uwalniania cytochromu *c* z przestrzeni międzybłonowej do cytosolu po odkryciu w zewnętrznej błonie mitochondrialnej kanału MAC (ang. *mitochondrial apoptosis-induced channel*). Kanał ten powstaje w mitochondriach podczas wczesnych etapów apoptozy i transportuje cytochrom *c* poprzez integralną zewnętrzną błonę mitochondrialną [68,69]. Ponadto wiadomo, że średnica kanału MAC wynosi > 5 nm i jest wystarczająco duża dla cząsteczek cytochromu *c* o średnicy ~ 3 nm, uwalnianych z mitochondriów. Aktywne kanały MAC wykryto w mitochondriach na szlaku wewnętrznym apoptozy fibroblastów embrionów myszy, komórek HeLa oraz w różnych klonach komórek hematopoetycznych FL512 [70]. Istnieją również dowody, że kanał MAC jest regulowany przez białka rodziny Bcl-2 [68,71].



Rycina 8. Mechanizm uprzepuszczelnienia mitochondrialnej błony zewnętrznej. Niezwiązany cytochrom *c* wycieka przez kanały Bax/Bak (A). Cytochrom *c* obecny w kristach mitochondrialnych uwalniany jest do cytosolu przez megakanal MPTP oraz poprzez kanały VDAC i MAC (B).

W komórkach apoptotycznych, w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, oprócz cytochromu *c* znajdują się następujące białka: Smac/DIABLO, AIF, endonukleaza G, HtrA2/Omi (Ryc. 8). Charakterystyka i funkcja białek apoptogennych, uczestniczących w procesie apoptozy szlaku mitochondrialnego, omówiona została w artykule Bednarek i Kiliańskiej opublikowanym w *Postępy Biochemii* w 2005 roku [72]. Natomiast dokładny mechanizm uwalniania tej grupy białek z mitochondriów do cytosolu nie jest znany. Wielu autorów sugeruje, że wymienione białka apoptogenne mogą być uwalniane z mitochondriów do cytosolu, podobnie jak cytochrom *c*, poprzez kanały utworzone przez proapoptotyczne wielodomenowe białka Bax/Bak jak również za pośrednictwem kanałów VDAC [73,74].

MITOCHONDRIALNY KANAŁ VDAC

W zewnętrznej błonie mitochondrialnej występuje kanał anionowy regulowany przez zmiany potencjału błonowego (VDAC). Kanał ten często jest utożsamiany z poryną, zachowanym w ewolucji, integralnym białkiem mitochondrialnym. Jednak Colombini, ze względu na niejasność pochodzenia ewolucyjnego VDAC, uważa, że nazwa „mitochondrialna poryna” jest zwodnicza [74]. Mitochondrialny kanał VDAC jest przepuszczalny dla cząsteczek o masie cząsteczkowej nie przekraczającej 5000 Da: ATP, ADP, fosfokreatyny, anionów, 1 i 2-wartościowych kationów. Metabolity i jony są przenoszone z przestrzeni międzybłonowej do cytosolu jak i w kierunku przeciwnym [75]. VDAC występuje w trzech stanach funkcjonalnych. Kanał w stanie otwartym (o dużym przewodnictwie) jest przepuszczalny głównie dla anionów. Kanał o niskim przewodnictwie, w stanie zamkniętym jest dostępny dla kationów [8]. Ostatnio wykryto nowy stan funkcjonalny VDAC, o dużym przewodnictwie, przepuszczalny dla kationów [76]. Strukturalne modyfikacje, zachodzące podczas zmiany stanu przewodnictwa kanału nie są znane.

Istnieją różne hipotezy na temat funkcjonowania VDAC w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i udziału kanału w przenoszeniu apoptogennych białek z mitochondriów do cytosolu. Vander Heiden i wsp. [77] sugerują, że proapoptotyczne białka z mitochondriów uwalniane są podczas stanu zamkniętego VDAC. W tym czasie zablokowana jest wymiana ATP i ADP pomiędzy cytosolem a matriks mitochondrialną oraz dochodzi do nagromadzenia fosfokreatyny w przestrzeni międzybłonowej. Akumulacja fosfokreatyny wskazuje, że to nie mitochondrialna błona wewnętrzna, ale błona zewnętrzna stanowi barierę dla przepływających cząsteczek. Nie jest wyjaśnione w jaki sposób dochodzi do uwolnienia białek apoptogennych poprzez zamknięty kanał VDAC. Badania wykonane na modelowych błonach lipidowych oraz po wprowadzeniu białek Bcl-X_L i Bid do synapsy

kałamarnicy olbrzymiej, wykazały, że VDAC regulowany jest przez rodzinę białek Bcl-2. Badania te sugerują, że antyapoptotyczne białko Bcl-X_L promuje otwarty stan VDAC oraz ułatwia przenikanie metabolitów przez zewnętrzną błonę mitochondrialną [78]. W przeciwieństwie do Bcl-X_L, proapoptotyczne białko Bid stymuluje stan zamknięty kanału [79]. Powyższe doniesienia wskazują, że metabolity i białka apoptogenne są przenoszone z przestrzeni międzybłonowej do cytosolu podczas różnych stanów funkcjonalnych VDAC. Transport metabolitów jak i białek jest hamowany przez NADH, który nie tylko moduluje właściwości kanału, ale także w określonych warunkach indukuje jego zamknięcie [74].

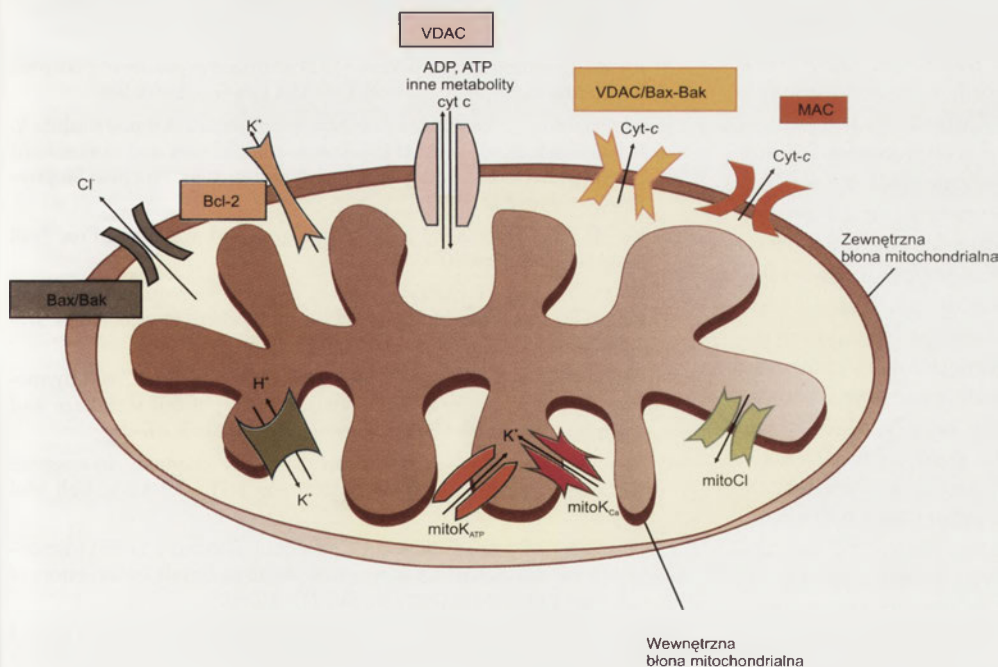
Kolejna hipoteza zakłada występowanie bezpośredniego oddziaływania pomiędzy proapoptotycznym białkiem Bax a VDAC. Badania przeprowadzone na liposomach oraz na płaskich błonach lipidowych sugerowały, że Bax oddziałując z VDAC tworzy nowy, duży kanał przepuszczalny dla cytochromu c [80]. Powstawanie tego typu kanałów kwestionuje Rostovtseva i wsp. [79]. Ta grupa badaczy uważa, że zarówno monomery jak i oligomery Bax nie oddziałują bezpośrednio z VDAC wyizolowanym z mitochondriów ssaków. Z kolei Shi z liczną grupą współpracowników sugerują, że przynajmniej *in vitro* białka Bcl-X_L i Bax, bezpośrednio oddziałując z VDAC1, tworzą heterotrimeryczny kompleks VDAC1/Bax/Bcl-X_L. Konformacja kanału VDAC1 w tym kompleksie regulowana jest przez stosunek Bax/Bcl-X_L [81].

Niektórzy autorzy łączą VDAC z megakanałem MPTP, który spaja mitochondrialną błonę wewnętrzną z błoną zewnętrzną. MPTP jest wielobiałkowym kompleksem, w skład którego oprócz VDAC wchodzi: translokaza nukleotydów adeninowych (ANT), obecna w błonie wewnętrznej, receptor benzodiazepiny, kinaza kreatynowa, heksokinaza oraz cyklofilina D [9,10]. Czynniki indukujące apoptozę, które powodują osmotyczne pęcznienie matriks, powodują tak-

że często rozerwanie zewnętrznej błony mitochondrialnej [10]. W tym przypadku VDAC może modulować przepuszczalność błony zewnętrznej, ale nie jest konieczny podczas uwalniania białek apoptogennych z przestrzeni międzybłonowej do cytosolu.

KANAŁY I PRZENOŚNIKI JONÓW W WEWNĘTRZNEJ BŁONIE MITOCHONDRIALNEJ

W wewnętrznej błonie mitochondrialnej na szczególną uwagę zasługują kanały chlorkowe (mitoCl) oraz kanały potasowe (mitoK) (Ryc. 9). Kanały chlorkowe, regulując przemieszczanie się komórkowych anionów, decydują o potencjale błonowym, wewnątrzkomórkowym pH i objętości komórek [82]. Ekspresja genów kanałów chlorkowych jest regulowana przez dwa czynniki proapoptotyczne, białko p53 i



Rycina 9. Kanały jonowe zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej uczestniczące w regulacji apoptozy. Kanały błony zewnętrznej uczestniczą w transporcie z mitochondrium do cytosolu zarówno jonów jak i apoptogennych czynników, w tym również cytochromu c /zmodyfikowany [wg 19]/.

TNF α a zmiany przepuszczalności wewnętrznej błony dla jonów Cl⁻ prowadzą do aktywacji kanałów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i do apoptozy [19,83].

W błonie wewnętrznej mitochondriów funkcjonują dwa typy kanałów potasowych, aktywowane przez jony Ca²⁺ (mitoK_{Ca}) oraz hamowane przez ATP (mitoK_{ATP}) [84,85]. Poprzez te kanały jony K⁺ transportowane są do matriks mitochondrialnej a ich nadmiar wydalany jest do przestrzeni międzybłonowej na drodze antyportu K⁺/H⁺ [86]. Mitochondrialne K_{ATP} wykryto w neuronach, kardiomiocytach oraz w wątrobie [87-89]. Kanały mitoK_{ATP} uczestniczą także w regulacji objętości mitochondriów oraz odpowiedzialne są za utrzymanie gradientu pH i transbłonowego potencjału. Czynniki apoptotyczne jak etopozyd powodują w komórkach HL-60 aktywację kanałów mitoK_{ATP} zwiększony transport jonów K⁺, pęcznienie mitochondriów oraz uwalnianie cytochromu c [90]. Transport jonów K⁺ do mitochondriów komórek apoptotycznych blokowany jest przez 5-hydroksydekanat, inhibitor kanałów mitoK_{ATP}. Białka rodziny Bcl-2 regulują stopień uszkodzenia mitochondriów oraz kontrolują poziom mitochondrialnych jonów K⁺. Antyapoptotyczne białko Bcl-2 stymuluje wydalanie jonów K⁺ z mitochondriów. Z kolei proapoptotyczne białko Bid, które podczas apoptozy przemieszcza się do zewnętrznej błony mitochondrialnej, przyspiesza transport jonów do wnętrza organelli oraz uwalnianie cytochromu c do cytosolu [90].

Kanały mitoK_{Ca} podobnie jak mitoK_{ATP} transportują jony K⁺ do wnętrza mitochondriów. W procesie apoptozy aktywowane kanały mitoK_{Ca} w neuronach indukują wzrost przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej dla jonów i przyspieszają wyciek międzybłonowych białek apoptogennych do cytosolu. Specyficzny inhibitor kanału, charydotoksyna, opóźnia apoptotyczną śmierć komórek [91].

UWAGI KOŃCOWE

W procesie apoptozy szlaku zewnętrznego w błonie plazmatycznej aktywowane są kanały potasowe, chlorkowe i wapniowe. Kanały te odpowiedzialne są przede wszystkim za zmiany objętości komórek. Zmiany strukturalne i funkcjonalne mitochondrialnej błony wewnętrznej i błony zewnętrznej podczas apoptozy są znacznie większe niż błony plazmatycznej. Aktywowane są konstytutywnie obecne w wewnętrznej błonie mitochondrialnej kanały potasowe i chlorkowe, a w błonie zewnętrznej kanały anionowe regulowane przez zmiany potencjału błonowego. Kanały błon mitochondrialnych uczestniczą zarówno w transporcie jonów jak i apoptogennych białek. W transporcie cytochromu c z mitochondriów do cytosolu udział biorą kanały Bax/Bak, VDAC oraz MAC. Wymienione kanały regulowane są przez białka rodziny Bcl-2, ale do pełnej ich aktywacji konieczne są także lipidy [92,93]. W procesie apoptotycznej śmierci komórek ważną funkcję pełnią oddziaływania białek proapoptotycznych i antyapoptotycznych z kardiopiliną. Mechanizmy uwalniania innych białek apoptogennych z przestrzeni międzybłonowej do cytosolu są nieznane. Wielu autorów uważało, że istotną funkcję w procesie apoptozy pełni nieselektywny megakanał MPTP, po otwarciu którego, poprzez uszkodzoną zewnętrzną błonę mitochondrialną uwalniane są międzybłonowe, apoptogenne

czynniki [94,95]. W 2005 roku, dwa różne zespoły naukowe opublikowały w *Nature* prace w których przedstawiły, że megakanały MPTP nie uczestniczą w apoptotycznej śmierci komórek ale indukują nekrozę, która nie jest regulowana przez białka rodziny Bcl-2 [96,97]. Autorzy wykryli, że *in vitro* mitochondria myszy nie zawierające cyklofiliny D, jednego ze składników megakanału, są odporne na działanie cyklosporyny A, specyficznego inhibitora kanału.

PIŚMIENNICTWO

1. Saraste A, Pilkki K (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45: 528-537
2. Zamzami N, Kroemer G (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 67-71
3. Bratton SB, Cohen GM (2001) Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends Pharmacol Sci* 22: 306-315
4. Salvesen GS (2002) Caspases and apoptosis. *Essays Biochem* 38: 9-19
5. Dołowy K, Szewczyk A, Piśkuła S (2003) Błony biologiczne. Wydawnictwo „Śląsk”.
6. Hughes FM Jr, Cidlowski JA (1999) Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes *in vitro* and *in vivo*. *Adv Enzyme Regul* 39: 157-171
7. Yu SP, Canzoniero L, Choi D (2001) Ion homeostasis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 13: 405-411
8. Lawen A, Ly J, Lane D, Zarschler K, Messina A, De Pinto V (2005) Voltage-dependent anion-selective channel 1 (VDAC1) — a mitochondrial protein, rediscovered as a novel enzyme in the plasma membrane. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 277-282
9. Desagher S, Martinou JC (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10: 369-377
10. Halestrap A, McStay G, Clarke S (2002) The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84: 153-166
11. Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ (2004) Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* 1644: 107-113
12. Schmitz I, Kirchhoff S, Kramer PH (2000) Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 1123-1136
13. Dimanche-Boitrel M-T, Meurette O, Rebillard A, Lacour S (2005) Role of early plasma membrane events in chemotherapy-induced cell death. *Drug Resist Updates* 8: 5-14
14. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers E (2005) Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci* 62: 971-988
15. Ishii H, Mori T, Shiratsuchi A, Nakai Y, Shimada Y, Ohno-Iwashita Y, Nakanishi Y (2005) Distinct localization of lipid rafts and externalized phosphatidylserine at the surface of apoptotic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 94-99
16. Yu SP, Choi DW (2000) Ions, cell volume and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9360-9362
17. Okada Y, Maeno E (2001) Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem Physiol A* 130: 377-387
18. Hughes FM Jr, Cidlowski JA (1998) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis: protease-dependent activation of cell shrinkage and DNA fragmentation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65: 207-217
19. Remillard C, Yuan X-J (2004) Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L49-L67
20. Barbiero G, Durant F, Bonelli G, Amenta J, Baccino F (1995) Intracellular ionic variations in the apoptotic death of L cells by inhibitors of cell cycle progression. *Exp Cell Res* 217: 410-418
21. Bortner C, Hughes FM Jr, Cidlowski J (1997) A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem* 272: 32436-32442
22. Hughes FM Jr, Bortner C, Purdy G, Cidlowski J (1997) Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem* 272: 30567-30576

23. Yu SP (2003) Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog Neurobiol* 70: 363-386
24. Bortner C, Cidlowski J (1999) Caspase independent/dependent regulation of K⁺, cell shrinkage and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem* 274: 21953-21962
25. Cain K, Langlais C, Sung X-M, Brown D, Cohen G (2001) Physiological concentrations of K⁺ inhibit cytochrome *c*-dependent formation of the apoptosome. *J Biol Chem* 276: 41985-41990
26. Thompson G, Langlais C, Cain K, Conley E, Cohen G (2001) Elevated extracellular [K⁺] inhibits death-receptor and chemical-mediated apoptosis prior to caspase activation and cytochrome *c* release. *Biochem J* 357: 137-145
27. Wang X, Xiao A, Ichinose T, Yu SP (2000) Effects of tetraethylammonium analogues on apoptosis and membrane currents in cultured cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 524-530
28. Penning L, Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Schipper R, Vandenebelee P (2000) A role for potassium in TNF-induced apoptosis and gene-induction in human and rodent tumour cell lines. *Cytokine* 12: 747-750
29. Ekhterae D, Platoshyn O, Krick S, Yu Y, McDaniel S, Yuan J (2001) Bcl-2 decreases voltage-gated K⁺ channel activity and enhances survival in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C157-C165
30. Szabo I, Lepple-Wienhues A, Kaba KN, Zoratti M, Gulbins E, Lang F (1998) Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD 95 – induced apoptosis in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6169-6174
31. Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Akihiro H, Okada Y (2000) Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9487-9492
32. Rasola A, Farahi Far D, Hofman P, Rossi B (1999) Lack of internucleosomal DNA fragmentation is related to Cl⁻ efflux impairment in hematopoietic cell apoptosis. *FASEB J* 13: 1711-1723
33. Lynch K, Fernandez G, Pappalardo A, Peluso J (2000) Basic fibroblast growth factor inhibits apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells by regulating intracellular free calcium levels through a protein kinase Cdelta-dependent pathway. *Endocrinology* 11: 4209-4217
34. Juin P, Pelletier M, Oliver L, Tremblais K, Gregoire M, Meflah K, Vallette F (1998) Induction of caspase-3 like activity by calcium in normal cytosolic extracts triggers nuclear apoptosis in a cell-free system. *J Biol Chem* 273: 17559-17564
35. Tombal B, Denmeade S, Isaacs J (1999) Assessment and validation of a microinjection method for kinetic analysis of [Ca²⁺]_i in individual cells undergoing apoptosis. *Cell Calcium* 25: 19-28
36. Robertson J, Orrenius S, Zhivotovsky B (2000) Review: nuclear events in apoptosis. *J Struct Biol* 129: 346-358
37. De Pinto V, Messina A, Accardi R, Aiello R, Guarino F, Tommasello M, Tommasino M, Tasco G, Casadio R, Benz R, De Giorgi F, Ichas F, Baker M, Lawen A (2003) New functions of an old protein: The eukaryotic porin or voltage dependent anion selective channel (VDAC). *Ital J Biochem* 52: 17-24
38. Gonzalez-Gronow M, Kalfa T, Johnson C, Gawdi G, Pizzo S (2003) The voltage-dependent anion channel is a receptor for plasminogen kringle 5 on human endothelial cells. *J Biol Chem* 278: 27312-27318
39. Darbandi-Tonkabon R, Manion B, Hastings W, Craigen W, Akk G, Bracamontes J (2004) Neuroactive steroid interactions with voltage-dependent anion channels: lack of relationship to GABA_A receptor modulation and anesthesia. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 502-511
40. Ly JD, Lawen A (2003) Transplasma membrane electron transport: Enzymes involved and biological function. *Redox Rep* 8: 3-21
41. Baker MA, Lane DJ, Ly JP, DePinto V, Lawen A (2004) VDAC1 is a trans-plasma membrane NADH:Ferricyanide reductase. *J Biol Chem* 279: 4811-4819
42. Elinder F, Akanda N, Tofighi R, Shimizu S, Tsujimoto Y, Orrenius S, Ceccatelli C (2005) Opening of plasma membrane voltage-dependent anion channels (VDAC) precedes caspase activation in neuronal apoptosis induced by toxic stimuli. *Cell Death Differ* 12: 1134-1140
43. Antonsson B (2004) Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol Cell Biochem* 256/257: 141-155
44. Granville DJ, Gottlieb RA (2002) Mitochondria: Regulators of cell death and survival. *Sci World J* 2: 1569-1578
45. Brdiczka DG, Zorov DB, Sheu S-S (2006) Mitochondrial contact sites: Their role in energy metabolism and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1762: 148-163.
46. Armstrong JS (2006) Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bio Essays* 28: 253-260.
47. Armstrong JS (2006) Mitochondria: a target for cancer therapy. *Br J Pharmacol* 147: 239-248
48. Belka C, Budach W (2002) Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *Int J Radiat Biol* 78: 643-658
49. Borner C (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 39: 615-647
50. Tsujimoto Y (2003) Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol* 195: 158-167
51. Kirkin V, Joos S, Zörnig M (2004) The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1644: 229-249
52. Cheng E, Wei M, Weiler S, Flavell R, Mak T, Lindsten T, Korsmeyer S (2001) Bcl-2, Bcl-X(L) sequester BH3 domain – only molecules preventing BAX-and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8: 705-711
53. Kowaltowski A, Fiskum G (2005) Redox mechanisms of cytoprotection by Bcl-2. *Antioxid Redox Sign* 7: 508-514
54. Lucken-Ardjomande S, Martinou J-C (2005) Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. *C.R.Biologies* 328: 616-631
55. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou J-C (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20: 929-935
56. Zhai D, Luciano F, Zhu X, Guo B, Satterthwait AC, Reed JC (2005) Humanin binds and nullifies Bid activity by blocking its activation of Bax and Bak. *J Biol Chem* 280: 15815-15824
57. Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, Frumkin D, Grammatikakis N, Reuveny E, Gross A (2002) tBid homo-oligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem* 277: 12237-12245
58. Willis S, Adams J (2005) Life in the balance: how BH3 – only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17: 617-625
59. Yin X-M (2006) Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene* 369: 7-19
60. Kroemer G, Reed JC (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6: 513-519
61. Korsmeyer S, Wei M, Saito M, Weiler S, Oh K, Schlesinger P (2000) Proapoptotic cascade activates BID which oligomerizes BAK or BAX into pores that results in the release of cytochrome *c*. *Cell Death Differ* 7: 1166-1173
62. Saito M, Korsmeyer S, Schlesinger P (2000) Bax-dependent transport of cytochrome *c* reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* 2: 553-555
63. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green D, Newmeyer DD (2002) Bid, Bax and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111: 331-342.
64. Esposti DM, Dive c (2003) Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 455-461.
65. Kim TH, Zhao Y, Ding WX, Shin JN, He X, Seo YW, Chen J, Rabinovich H, Amoscato AA, Yim XM (2004) Bid-cardiolipin interaction at mitochondrial contact site contributes to mitochondrial cristae organization and cytochrome *c* release. *Mol Biol Cell* 15: 3061-3072.
66. Lutter M, Perkins GA, Wang X (2001) The proapoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC Cell Biol* 8: 2-22.

67. Scorano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer S (2002) A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome *c* during apoptosis. *Dev Cell* 2: 55-67.
68. Martinez-Caballero S, Dejean LM, Jonas EA, Kinnally KW (2005) The role of the mitochondrial apoptosis induced channel MAC in cytochrome *c* release. *J Bioenerg Biomembr* 37: 155-164.
69. Guo L, Pietkiewicz D, Pavlov EV, Grigoriev S, Kasianowicz J, Dejean L, Korsmeyer S, Antonsson B, Kinnally K (2004) Effects of cytochrome *c* on the mitochondrial apoptosis-induced channel MAC. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1109-C1117
70. Pavlov EV, Priault M, Pietkiewicz D, Cheng E, Antonsson B, Manon S, Korsmeyer S, Mannella C, Kinnally K (2001) A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol* 155: 725-732.
71. Dejean L, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally K (2006) Regulation of the mitochondrial apoptosis – induced channel, MAC, by Bcl-2 family proteins. *Biochim Biophys Acta* 1762: 191-201.
72. Bednarek J, Kiliańska Z (2005) Białka przestrzeni między błonowej mitochondriów uczestniczące w procesie apoptozy. *Postępy Biochem* 51: 447-458.
73. Bras M, Queenan B, Susin SA (2005) Programmed cell death *via* mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Moscov)* 70: 284-293.
74. Colombini M (2004) VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem* 256-257: 107-115
75. Shoshan-Barmatz V, Gincel D (2003) The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys* 39: 279-292
76. Pavlov E, Grigoriev S, Dejean L, Zweihorn Ch L, Mannella C, Kinnally K (2005) The mitochondrial channel VDAC has a cation-selective open state. *Biochim Biophys Acta* 1710: 96-102.
77. Vander Heiden MG, Chandel NS, Li XX, Schumacker PT, Colombini M, Thompson CB (2000) Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4666-4671.
78. Vander Heiden M, Li X, Gottleib E, Hill R, Thompson C, Colombini M (2001) Bcl-X_i promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 276: 19414-19419
79. Rostovtseva T, Tan W, Colombini M (2005) On the role of VDAC in apoptosis: Fact and fiction. *J Bioenerg Biomembr* 37: 129-142
80. Shimizu S, Ide T, Yanagida T, Tsujimoto Y (2000) Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome *c*. *J Biol Chem* 275: 12321-12325
81. Shi Y, Chen J, Weng C, Chen R, Zheng Y, Chen Q, Tang H (2003) Identification of the protein-protein contact site and interaction mode of human VDAC1 with Bcl-2 family proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 989-996
82. Suh KS, Yuspa SH (2005) Intracellular chloride channels: Critical mediators of cell viability and potential targets for cancer therapy. *Curr Pharm Design* 11: 2753-2764
83. Fernandez-Salas E, Sagar M, Cheng C, Yuspa S, Weinberg W (1999) p53 and tumor necrosis factor α regulate the expression of a mitochondrial chloride channel protein. *J Biol Chem* 274: 36488-36497
84. Ardehali H (2005) Cytoprotective channels in mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 37: 171-177
85. Ardehali H, O'Rourke B (2005) Mitochondrial K_{ATP} channels in cell survival and death. *J Mol Cell Biol* 39: 7-16
86. Garlid KD, Paucek P (2001) The mitochondrial potassium cycle. *IUBMB Life* 52: 153-158
87. Liu D, Lu C, Wan R, Anyeung W, Mattson M (2002) Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome *c* release. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 431-443
88. Holmuhamedov E, Jovanović S, Dzeja P, Jovanović A, Terzić A (1998) Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels modulate cardiac mitochondrial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275: H1567-H1576
89. Inoue I, Hagase H, Kishi K, Higuti T (1991) ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352: 244-247
90. Eliseev RA, Salter JD, Gunter KK, Gunter TE (2003) Bcl-2 and tBid proteins counter-regulate mitochondrial potassium transport. *Biochim Biophys Acta* 1604: 1-5
91. Pena C, Pendergast M, Pilar G (2002) Selective membrane channels involved in developmental neuronal death. *Soc Neurosci Abstr* 9: 631
92. Esposti DM (2002) Lipids, cardiolipin and apoptosis: a greasy licence to kill. *Cell Death Differ* 9: 234-236
93. Cristea I, Esposti DM (2004) Membrane lipids and cell death: an overview. *Chem Phys Lipids* 129: 133-160
94. Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312
95. Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, Haeflner A, Hirsch F, Geuskens M, Kroemer G (1996). Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med* 184: 1155-1160
96. Baines C, Kaiser R, Purcell N, Blair N, Osinska H, Hambleton M, Brunskill E, Sayen M, Gottlieb R, Dorn G, Robbins J, Molkenin J (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434: 658-662
97. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y (2005) Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434: 652-658

The role of ion channels in apoptosis

Zofia Józwiak[✉], Agnieszka Marczak

Department of Thermobiology, University of Łódź, 12/16 Banacha Str. 90-237 Łódź, Poland

[✉]e-mail: zjozwiak@biol.uni.lodz.pl

Key words: apoptosis, Bcl-2 family proteins, ion channels, plasma membrane, mitochondrial inner membrane, mitochondrial outer membrane

ABSTRACT

The plasma membrane as well as the mitochondrial outer and inner membranes contain a number of ion channels that are responsible not only for existence of cells under physiological conditions but they also participate directly in apoptosis. In the apoptotic cells the activated K⁺, Cl⁻ channels of plasma membrane control the cell volume and mediate the regulation of protease and nuclease activities. The mitochondrial channels are involved in the ionic movements and leakage of apoptogenic factors from the intermembrane space to cytosol. During apoptosis, an important role in the permeabilization of the outer mitochondrial membrane play Bcl-2 family proteins. In this review the recent findings on the function of ion channels in apoptotic cells and the role played by Bcl-2 proteins in the control of apoptosis are discussed.

Pleiotropowy efekt fosforylacji białek wiążących RNA bogatych w serynę i argininę

STRESZCZENIE

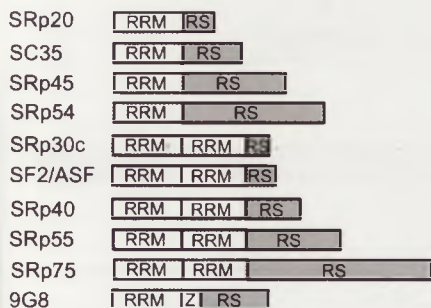
Białka wiążące RNA, tzw. białka SR (ang. *serine-arginine rich proteins*), biorą udział w formowaniu spliceosomu, dynamicznego kompleksu katalizującego wycinanie intronów z pre-mRNA. Wyniki najnowszych badań wykazały, że białka SR biorą również udział w innych procesach metabolizmu RNA, w transporcie transkrypcyjnego do cytoplazmy i w translacji. Zidentyfikowano kilka kinaz białkowych fosforylujących białka SR. Fosforylacja jest powszechną modyfikacją potranslacyjną wielu białek, jednak w przypadku białek SR ma znaczenie szczególne. Reakcja ta, katalizowana przez liczne kinazy białkowe, ograniczona jest do stosunkowo wąskiego rejonu domeny bogatej w reszty seryny i argininy (RS). Nagromadzenie reszt fosforanowych na obszarze zaledwie kilkudziesięciu reszt aminokwasowych wpływa decydująco na wszystkie aspekty funkcjonowania białek SR, począwszy od lokalizacji komórkowej, po wybór procesów, w których białka te uczestniczą.

BIAŁKA SR: BUDOWA I FUNKCJA

Białka SR odgrywają istotną rolę w składaniu pierwotnego transkrypcyjnego, w eksporcie mRNA z jądra komórkowego i w translacji. Białka z tej grupy występują w wszystkich przebadanych do tej pory zwierzętach tkankowych i roślin [1-8]. U człowieka zidentyfikowano do tej pory 10 białek SR (Ryc. 1). Białka SR charakteryzują się obecnością jednej lub dwóch domen wiążących RNA (zwanymi RRM, ang. *RNA recognition motif*; RBD, ang. *RNA binding domain* i RNP, ang. *ribonucleoprotein domain* [9]), zlokalizowanych w części N-końcowej oraz C-końcowej domeny RS, bogatej w reszty seryny i argininy (w białku SF2/ASF reszty te stanowią 76% wszystkich reszt domeny). Uważa się, że główną rolą domeny RS jest pośredniczenie w oddziaływaniach z innymi białkami, również posiadającymi domeny RS [10]. Istnieją jednak odstępstwa od tej reguły [11,12]. Reszty seryny w domenie RS podlegają intensywnej fosforylacji przez kilka kinaz białkowych. Modyfikacja ta ma istotne znaczenie dla funkcjonowania białek.

Fizjologiczne znaczenie białek SR potwierdza szereg doświadczeń przeprowadzanych *in vivo*. Wykazano, że białko SF2/ASF jest niezbędne do przeżycia linii komórek kurczaka DT40 [13], a brak tego białka powoduje utratę stabilności genomu i fragmentację DNA [14]. Dysrupcja genu SRp55/B52 u *Drosophila melanogaster* [15], SRp20, SC35 i SF2/ASF u myszy jest letalna dla embrionów [16,17,18]. Podobny efekt daje wyciszenie genu białka CeSF2/ASF u *Caenorhabditis elegans* [19].

Początkowo funkcjonowanie białek SR ograniczano jedynie do udziału w składaniu pierwotnego transkrypcyjnego. Najnowsze badania pokazują jednak, że białka SR odgrywają też rolę w eksporcie mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy oraz w translacji. Wszystkie te procesy podlegają regulacji przez następujące po sobie reakcje fosforylacji i defosforylacji białek SR.



Rycina 1. Białka SR człowieka [wg 72, zmienione]. RRM – domena wiążąca RNA; RS – domena bogata w reszty argininy i seryny; Z – motyw palca cynkowego.

Agnieszka Piekiełko-Witkowska

Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; e-mail: pieklo@cmkp.edu.pl, tel. (022) 569 38 18

Artykuł otrzymano 6 marca 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 7 czerwca 2006 r.

Słowa kluczowe: składanie pre-mRNA, białka SR, spliceosom, fosforylacja, kinazy białek SR

Wykaz skrótów: 3'ss – miejsce różnicowego składania 3'; 5'ss – miejsce różnicowego składania 5'; IGC – skupiska ziarnistości wewnątrz chromatyny; RRM – domena wiążąca RNA; RS – domena bogata w reszty seryny i argininy, SR (ang. *serine-arginine rich proteins*) – białka wiążące RNA zawierające domeny bogate w reszty seryny i argininy

W artykule wykorzystano materiały zawarte we wstępie do pracy doktorskiej wykonanej w Instytucie Biochemii UW pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Staronia

KINAZY FOSFORYLUJĄCE BIAŁKA SR

Kinazy fosforylujące białka SR można podzielić na kilka grup: kinazy SRPK, Clk, PRP4, topoizomeraza I i kinaza cdc2 (Tab. 1).

Między kinazami z grupy Clk/Sty i SRPK istnieją interesujące podobieństwa w budowie domeny kinazowej. Kinazy Clk/Sty należą do grupy kinaz zawierających motyw LAMMER, decydujący najprawdopodobniej o

Tabela 1. Kinazy fosforylujące białka SR.

Nazwa kinazy	Lokalizacja	Piśmiennictwo
Kinazy SRPK: SRPK1, SRPK2	cytoplazma, jądro	[23,45,67]
Kinazy Clk (Cdc2-like kinase): Clk1/Sty, Clk2, Clk3, Clk4	jądro	[20,69-71]
PRP4	jądro	[30]
Topoizomeraza I	jądro	[34]
cdc2	cytoplazma, jądro	[40]

specyficzności substratowej enzymu [20]. Porównanie sekwencji kinaz Clk/Sty i SRPK1 pokazuje, że wprawdzie w sekwencji SRPK1 cały motyw nie jest zachowany, niemniej konserwowany jest charakterystyczny układ aminokwasów (Ryc. 2). Oprócz tego zachowane są kluczowe aminokwasy w pętli katalitycznej (subdomena 6): arginina, która jest wysoko konserwowana u większości innych kinaz białkowych, zastąpiona jest przez treoninę w Clk/Sty i SRPK1 (Thr286 w Clk/Sty). Obie kinazy posiadają również konserwowaną resztę argininy, odpowiadającą pozycji 345 w sekwencji Clk/Sty. Wymienione konserwowane aminokwasy znajdują się w kieszeni stanowiącej miejsce wiązania substratu. Pomimo opisanych wyżej podobieństw w budowie (domeny kinazowe Clk/Sty i SRPK1 zachowują 30% podobieństwo na poziomie sekwencji), specyficzność substratowa kinazy SRPK1 jest znacznie węższa niż Clk/Sty [22]. Tylko kinaza Clk/Sty jest w stanie fosforylować zasadowe białka, takie jak histon H1 i zasadowe białko mieliny, chociaż w mniejszym stopniu niż SF2/ASF. Nie fosforyluje bardziej kwaśnych substratów takich jak β -kazeina, enolaza i N-końcowy rejon c-Jun. Kinaza Clk/Sty posiada w części N-końcowej domenę bogatą w reszty seryny i argininy, za pośrednictwem której oddziałuje z białkami SR [20], oddziaływanie to jednak ma najprawdopodobniej charakter słaby i przejściowy, w odróżnieniu od silnie wiążących się z SF2/ASF kinaz SRPK [23].

Obie kinazy mają zdolność fosforylacji tego samego białka SF2/ASF, lecz kinaza SRPK1 jest 150 razy bardziej aktywna wobec tego substratu niż Clk/Sty [22]. Każda z kinaz fosforyluje inny rejon domeny RS białka SF2/ASF. Kinaza Clk/Sty fosforyluje reszty seryny zlokalizowane w rejonie między 220 a 248 aminokwasem białka SF2/ASF [24]. Decydującą rolę w reakcji katalizowanej przez SRPK1 odgrywa motyw dokujący zlokalizowany pomiędzy 184 a 197 aminokwasem białka SF2/ASF (Ryc. 3). Obecność tego motywu powoduje ograniczenie fosforylacji przez kinazę SRPK1 do rejonu między 197 a 219 aminokwasem domeny RS substratu. Delecja motywu powoduje, że fosforylacji przez SRPK1

SRPK1	DED H IALI I ELL G KV P RK L IV 582
SRPK2	DED H IA H I I ELL G S I PR H FAL 602
Clk/Sty	S K E H L A M M E R I L G L P L PK H M I Q 404
	* * * * *

Rycina 2. Porównanie sekwencji kinaz Clk/Sty, SRPK1 i SRPK2 w rejonie Clk/Sty zawierającym motyw LAMMER. Aminokwasy identyczne we wszystkich sekwencjach zaznaczono gwiazdkami. Poniżej sekwencji kinazy Clk/Sty zaznaczono motyw LAMMER. Porównanie sekwencji wykonano za pomocą programu ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) [73]. Numery dostępu sekwencji białek w bazie Entrez/Protein: Clk/Sty: NP_004062, SRPK1: S45337, SRPK2: AAC29140.

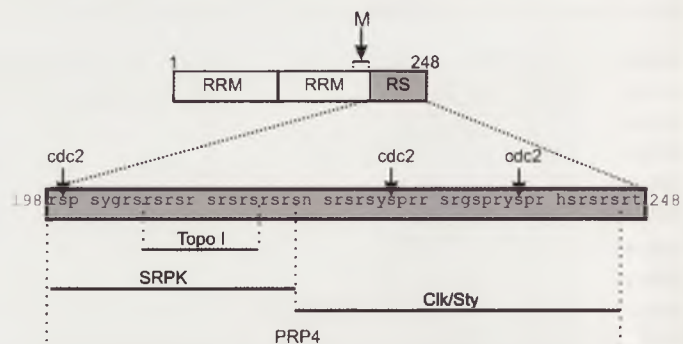
ulegają reszty seryny na całej długości domeny RS. Oddziaływanie między motywem substratu a rowkiem dokującym w strukturze SRPK1 umożliwia procesywny charakter reakcji, co oznacza, że enzym pozostaje związany z substratem aż do ukończenia fosforylacji wszystkich dostępnych reszt seryny [24,25]. Procesywność reakcji katalizowanej przez SRPK1 jest cechą wyjątkową wśród kinaz białek SR.

Głównym miejscem działania kinaz SRPK jest cytoplazma, chociaż enzymy te lokalizuje się również w nukleoplazmie [27], podczas gdy kinazy Clk/Sty funkcjonują wyłącznie w jądrze [20]. Różny jest efekt ekspresji nieaktywnych katalitycznie mutantów obu kinaz. Podczas gdy ekspresja nieaktywnej formy SRPK2 powoduje gromadzenie się białka SF2/ASF w cytoplazmie [23], ekspresja nieaktywnej formy Clk/Sty nie powoduje większych zmian w lokalizacji białka SF2/ASF [24,264].

Kinazę PRP4 zidentyfikowano początkowo jako białko biorące udział w składaniu pre-mRNA u drożdży *Schizosaccharomyces pombe* [28], później odkryto jej homologi u myszy i człowieka [29,30]. Kinaza PRP4, podobnie jak kinaza Clk/Sty ma zdolność fosforylacji reszt seryny/treoniny oraz tyrozyny [31], podlega również autofosforylacji [32]. N-końcowy rejon kinazy PRP4 zawiera domenę RS oraz sygnał lokalizacji jądrowej [30].

Funkcja kinazy PRP4 nie została jeszcze dokładnie poznana. Badania ostatnich lat wskazują głównie na rolę kinazy PRP4 w formowaniu spliceosomu z udziałem białek nie zawierających domeny RS [32,33] oraz w regulacji struktury chromatyny przez białka tworzące kompleksy z receptorami jądrowymi hormonów [32]. Wiadomo jednak, że kinaza PRP4 lokalizuje się w skupiskach ziarnistości wewnątrzchromatynowych wraz z zawierającym domenę RS białkiem SF2/ASF [30]. W odróżnieniu od kinaz SRPK i Clk/Sty nadekspresja kinazy PRP4 nie wpływa na przemieszczanie się białek SR [30]. Z kolei jądrowa lokalizacja kinazy PRP4 jest regulowana przez kinazę Clk/Sty, która katalizuje fosforylację w obrębie domeny RS kinazy PRP4. Efektem fosforylacji jest przemieszczanie się kinazy PRP4 z ziarnistości na obszar całego jądra komórkowego [30].

Wśród wszystkich kinaz białkowych fosforylujących białka SR topoizomeraza I jest enzymem szczególnym. Wyróżniają ją dwie cechy: zdolność katalizowania dwóch



Rycina 3. Rejony białka SF2/ASF fosforylowane przez różne kinazy białkowe. Kinazy SRPK, Clk/Sty i topoizomeraza I (Topo I) fosforyluje seryny w dipeptydach SR, kinaza cdc2 fosforyluje seryny w dipeptydach SP. M – położenie motywu dokującego dla kinazy SRPK1, na podstawie [21,22,24,30,35,40].

rodzajów reakcji (kinazowej i relaksacyjnej) oraz brak kanonicznych motywów wiążących ATP. Pomimo braku takiego motywu topoizomeraza I wiąże ten nukleotyd ze stałą dysocjacji 50 nM, co odpowiada wartości stałych dysocjacji innych kinaz białkowych [34]. Topoizomeraza I jako kinaza jest bardzo wąsko wyspecjalizowana: jej substratami są wyłącznie białka SR. Podobnie jak kinazy z grupy SRPK i Clk/Sty, topoizomeraza I fosforyluje reszty seryny znajdujące się w obrębie dipeptydów SR, przy czym sekwencja konsensusowa musi składać się z co najmniej pięciu powtórzeń takich dipeptydów [35].

Fosforylacja białek SR przez topoizomerazę I ma istotne znaczenie fizjologiczne. W hodowli komórek mysich pozbawionych topoizomerazy I następuje gromadzenie białek SR o niskim poziomie fosforylacji (hipofosforylowanych). W konsekwencji, w komórkach tych następuje upośledzenie alternatywnego składania zależnego od sekwencji ESE [36]. Zahamowanie aktywności topoizomerazy I w ekstrakcie komórek HeLa za pomocą specyficznego inhibitora (NB-506) powoduje brak fosforylacji białka SF2/ASF oraz zatrzymanie formowania spliceosomu na etapie kompleksu A [37]. W odróżnieniu od pozostałych kinaz fosforylujących białka SR, oddziaływanie między topoizomerażą I a SF2/ASF ma charakter dwukierunkowy. Jego efektem jest nie tylko fosforylacja białka SF2/ASF, ale i przełączanie aktywności enzymu z relaksacji DNA na aktywność kinazową [38,39].

Informacje na temat fosforylacji białek SR przez kinazę cdc2 są skąpe i ograniczają się do jednej pracy opublikowanej w 1998 roku przez Okamoto i wsp. [40]. W cytowanej pracy autorzy wykazali, że kinaza cdc2 fosforyluje białko SF2/ASF *in vitro*, zaś nadekspresja kinazy cdc2 w komórkach Sf9 powoduje pojawienie się ufosforylowanych form białek SR.

WPŁYW FOSFORYLACJI NA FUNKCJONOWANIE BIAŁEK SR

Głównym miejscem fosforylacji są reszty seryny w dipeptydach SR, fosforylowane przez kinazy z grupy SRPK, Clk/Sty i topoizomerazę I (Ryc. 3). Fosforylacji podlegają też seryny położone w sąsiedztwie proliny (reakcja katalizowana przez kinazy cyklu komórkowego) [40]. W sekwencji aminokwasowej białka SF2/ASF znajdują się też potencjalne miejsca fosforylacji przez kinazy PKC i PKA, jednak nie wiadomo czy fosforylacja ta zachodzi *in vivo*.

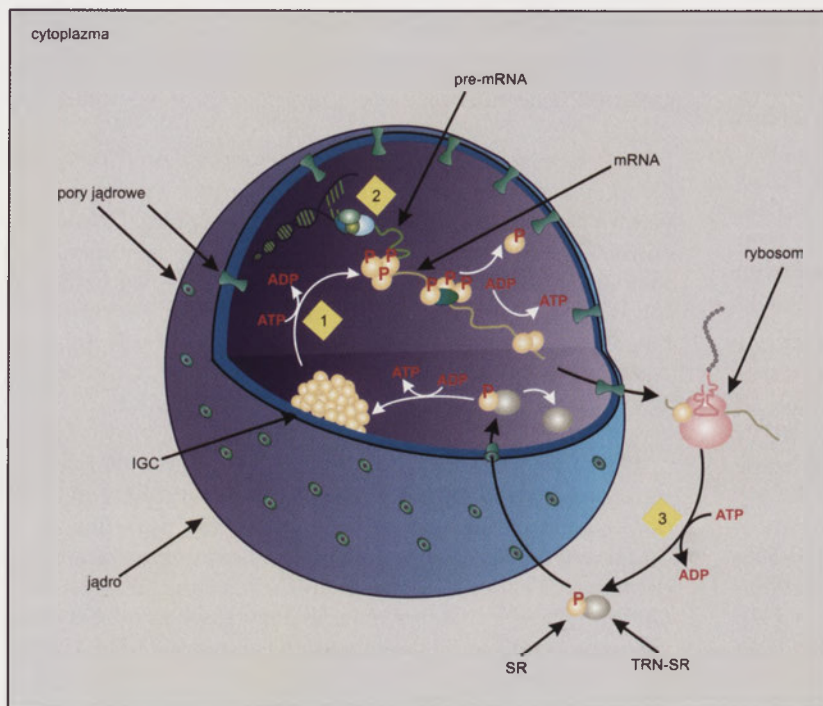
Fizjologiczne znaczenie kinaz fosforylujących białka SR zostało potwierdzone w licznych eksperymentach *in vivo*. Przykładem są badania prowadzone nad homologiem kinazy Clk/Sty człowieka u *Drosophila melanogaster*, kinazą Doa [41]. Substratem Doa są białka SR: RBP1, Tra i Tra2. Mutacja w genie Doa powoduje zahamowanie składania pre-mRNA genu *doublesex*, natomiast nie ma żadnego wpływu na składania pre-mRNA genu *fruitless*. W składaniu produktów obu genów biorą udział białka Tra, Tra2 i RBP1, z tym, że w przypadku genu *doublesex* regulują wybór miejsca 3'ss, natomiast w przypadku genu *fruitless*, wpływają na wybór miejsca 5'ss. Obserwacja ta sugeruje, że proces składania z udziałem miejsc 3'ss i 5'ss wymaga innego ufosforylowania domeny RS białek SR.

BIAŁKA SR JAKO CZYNNIKI UCZESTNICZĄCE W PROCESIE SKŁADANIA mRNA

W procesie składania pre-mRNA białka SR funkcjonują jako czynniki uczestniczące w regulacji tego procesu oraz biorą udział w formowaniu spliceosomu – dynamicznego kompleksu, katalizującego wycinanie intronów z pre-mRNA. W skład spliceosomu wchodzi pięć cząsteczek małych, jądrowych RNA (snRNA) i około trzysta białek [42]. Cząsteczki snRNA tworzą z częścią białek kompleksy, formując tzw. małe, jądrowe cząstki rybonukleinowo-białkowe (snRNP): U1, U2, U4, U5 i U6 snRNP. Formowanie spliceosomu przebiega z utworzeniem kompleksów przejściowych: E, A, B. Aktywny katalitycznie spliceosom (kompleks C) powstaje w wyniku oddziaływań RNA-RNA i RNA-białko.

Białka SR biorą udział w konstytutywnym i alternatywnym procesie składania mRNA. W konstytutywnym składaniu pierwotnego transkrypty białka SR pośredniczą w oddziaływaniach elementów spliceosomu przyłączonych do miejsc 3'ss (ang. 3' splice site) i 5'ss (ang. 5' splice site). Uważa się, że oddziaływania te pozwalają na odróżnienie eksonów (które są na ogół krótkimi sekwencjami) od intronów, znacznie od nich dłuższych. W procesie alternatywnego składania pre-mRNA białka SR mogą regulować wybór miejsc 3'ss i 5'ss. Wiążąc się do specyficznych sekwencji ESE (ang. *exon splicing enhancer*) stymulują wycinanie sąsiadujących intronów [43]. Najprawdopodobniej dzieje się to poprzez rekrutację pozostałych komponentów spliceosomu do tzw. „słabych” miejsc składania mRNA (ang. *weak splice site*) dzięki oddziaływaniu za pośrednictwem domeny RS [10]. Określenie miejsca składania jako „słabe” oznacza, że trakt polipirymidynowy nie jest do końca zgodny z sekwencją zachowaną w ewolucji.

Podstawą funkcjonowania białek SR jest ich zdolność do oddziaływania z innymi białkami oraz z RNA. Fosforylacja może w różny sposób wpływać na oddziaływania SF2/ASF z białkowymi partnerami, powodując ich wzmocnienie (tak dzieje się w przypadku oddziaływania z U1-70K [44,45,46]), bądź osłabienie (oddziaływanie z SRp40, hTra2 α , SF2/ASF [47], p32 [48], TAP [49]). Fosforylacja zapobiega również niespecyficznemu wiązaniu się białek z RNA [46]. Wzmacnianie bądź osłabianie tych oddziaływań przekłada się bezpośrednio na funkcjonowanie białek SR w procesach obróbki mRNA. Zarówno nadmierna fosforylacja, jak i zbyt niski jej poziom uniemożliwiają funkcjonowanie białek SR w procesie składania [50,51,52]. Defosforylacja białek SR człowieka, obserwowana podczas infekcji adenowirusem komórek HeLa, prowadzi do zmniejszenia aktywności białek SR w składaniu pierwotnego transkrypty [50]. Podczas wczesnego rozwoju embrionów glisty ludzkiej (*Ascaris lumbricoides*) zaobserwowano niską aktywność białek SR robaka. Wykazano, że na tym etapie rozwoju glisty białka SR występują w wysoko ufosforylowanej (hiperufosforylowanej) formie. Dalszym etapom rozwoju glisty towarzyszy częściowa defosforylacja białek, powodująca ich aktywację [52]. Wykazano, że tylko ufosforylowana forma SF2/ASF aktywuje składanie pre-mRNA tat wirusa HIV [46] oraz wydajnie zastępuje białka SR w ekstrakcie komórek HeLa pozbawionych tych białek, aktywując składanie pre-mRNA [53].



Rycina 4. Wpływ fosforylacji na funkcjonowanie białek SR. Nieufosforylowane białka SR są gromadzone w ziarnistościach IGC, z których uwalniane są dzięki fosforylacji przez kinazę Clk/Sty (oznaczona 1). Ufosforylowane białka biorą udział w procesie składania mRNA. Na tym etapie zachodzi fosforylacja przez topoisomerase I (oznaczona 2). W czasie obróbki pre-mRNA zachodzi defosforylacja i białka SR z grupy „wędrującej” wiążą się z gotowymi do eksportu cząstkami mRNP. Białka „niewędrujące” nie ulegają fosforylacji i oddysocjują z kompleksów mRNP. Wraz z mRNA białka SR opuszczają jądro. W cytoplazmie wiążą się z rybosomami i biorą udział w translacji. Następnie, wskutek fosforylacji katalizowanej przez kinazę SRPK1 (oznaczona 3) oddysocjują z kompleksów translacyjnych, wiążą się z białkami transportującymi TRN-SR i powracają do jądra.

REGULACJA LOKALIZACJI WEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ I WEWNĄTRZJĄDROWEJ

Białka SR są głównie zlokalizowane w jądrze komórkowym, jednak pewna ich pula wędruje nieustannie między jądrem a cytoplazmą [26]. Wykazano, że fosforylacja jest wymagana do translokacji białka SF2/ASF z cytoplazmy do jądra komórkowego, a także do rekrutacji z jądrowych struktur, zwanych IGC (ang. *interchromatin granule clusters*, skupiska ziarnistości wewnątrz chromatyny) (Ryc. 4). Struktury te, określane również jako ang. „*speckles*” (cętki, łatki), są swoistymi jądrowymi magazynami cząstek snRNP oraz białek uczestniczących w składaniu pierwotnego transkrypty [54]. Transkrypcja nie odbywa się w IGC, a czynniki uczestniczące w procesie składania są uwalniane z tych struktur dzięki fosforylacji domeny RS [55]. Nadekspresja aktywnych form kinaz z grupy SRPK i Clk/Sty powoduje rozpraszanie białek SR z ziarnistości na obszar nukleoplazmy [20,67-70]. Zastąpienie reszt seryny resztami glicyny, uniemożliwiające fosforylację, powoduje, że białko SF2/ASF gromadzi się w ziarnistościach i nie jest stamtąd uwalniane po indukcji transkrypcji.

Kinazy z grupy SRPK, zlokalizowane głównie w cytoplazmie i kinaza jądrowa Clk/Sty, odgrywają różną rolę w przemieszczaniu się białek SR w komórce. Jak wspomniano wyżej, oddziaływanie między białkiem SF2/ASF a kinazą SRPK1 determinuje motyw dokujący zlokalizowany między domenami RRM a domeną RS substratu [24]. Obecność tego motywu powoduje, że kinaza SRPK1 fosforyluje jedynie

reszty seryny na obszarze połowy domeny RS, zlokalizowanej bliżej motywu (Ryc. 3). Zgodnie z modelem zaproponowanym przez Ngo i wsp. [24], znajdujące się w cytoplazmie białko SF2/ASF podlega częściowej fosforylacji przez kinazę SRPK1, po czym oddysocjuuje od enzymu i wiąże się z białkiem transportującym, transportyną SR, a następnie cały kompleks wędruje do jądra komórkowego (Ryc. 4). W jądrze transportyna SR oddysocjuuje od białka SF2/ASF, które gromadzi się w strukturach IGC, skąd uwalniane jest po ufosforylowaniu pozostałych reszt seryny domeny RS przez kinazę Clk/Sty.

Fosforylacja reguluje również przemieszczanie się białka SF2/ASF między jądrem a cytoplazmą. Ekspresja w komórkach HeLa zmutowanej formy SF2/ASF, w której dipeptydy RS zostały zamienione w KS (co uniemożliwia fosforylację), powoduje gromadzenie się białka w cytoplazmie, a także w powiększonych strukturach IGC [44]. Wędrowka nieufosforylowanego białka SF2/ASF do cytoplazmy ma związek z transportem mRNA. Proces ten szerzej omawiany jest niżej.

UDZIAŁ BIAŁEK SR W EKSPORCIE mRNA Z JĄDRA

Synteza i obróbka eukariotycznego mRNA następuje w jądrze komórkowym, skąd transkrypt jest transportowany do cytoplazmy, gdzie podlega translacji. Podczas transkrypcji mRNA tworzy kompleksy z tzw. heterogennymi jądrowymi rybonukleoproteinami (hnRNP, ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*), tworząc cząstki mRNP [56]. Po zakończeniu składania pre-mRNA do utworzonych kompleksów mRNP dołączają się czynniki eksportujące, umożliwiające transport z jądra do cytoplazmy. Najlepiej do tej pory scharakteryzowanym czynnikiem eksportu mRNA z jądra jest białko NXF1/TAP, oddziałujące bezpośrednio z białkami tworzącymi kompleksy poru jądrowego [57].

Jak wspomniano wyżej, wśród białek SR daje się wyodrębnić pewna grupa, wędrująca nieustannie między jądrem a cytoplazmą [26]. Badania z wykorzystaniem linii komórkowej HeLa i oocytów *Xenopus* wykazały, że białka z grupy „wędrującej” (ang. *shuttling*), SRp20 i 9G8 biorą udział w eksporcie mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy [58]. Stwierdzono również, że białka te mogą funkcjonować jako adaptory w jądrowym eksporcie złożonego pre-mRNA, wiążąc się z białkiem NXF1/TAP [49,59,60]. Część spośród wędrujących między jądrem a cytoplazmą białek SR oddziałuje bezpośrednio z czynnikiem eksportu jądrowego NXF1/TAP poprzez sekwencje zlokalizowane w obrębie domen RRM, ale interakcja ta wymaga defosforylacji C-końcowej domeny RS.

W 2005 r. Lin i wsp. wykazali, że białka SR z grupy „wędrującej” i „niewędrującej” odgrywają inną rolę podczas dojrzewania mRNA [61]. Analizując skład różnych jądrowych i cytoplazmatycznych frakcji izolowanych z linii nieśmier-

telniowych embrionalnych mysich fibroblastów wykazali, że białka „wędrujące” (np. SF2/ASF) pozostają związane z mRNA i biorą udział w transporcie transkryptu do cytoplazmy. Białka „niewędrujące” (np. SC35) oddysocjują od gotowego transkryptu i nie biorą udziału w dalszych etapach dojrzewania mRNA. Do utworzenia kompleksów z mRNA konieczna jest fosforylacja domeny RS białek SR. Do eksportu kompleksu SR-mRNA wymagana jest defosforylacja białka SR, co prawdopodobnie umożliwia oddziaływanie z innymi czynnikami ułatwiającymi transport z jądra. Z niewyjaśnionych do tej pory przyczyn defosforylacja białek z grupy „niewędrującej” nie jest możliwa. Autorzy pracy zaproponowali model, w którym potencjalnymi czynnikami determinującymi oporność na działanie fosfatazy mogą być następujące po fosforylacji zmiany konformacyjne tej grupy białek SR, bądź przyłączenie jakiegoś czynnika, który blokuje defosforylację. W efekcie „niewędrujące” białka SR pozostają ufosforylowane, oddysocjują od mRNA i mogą wziąć udział w następnej rundzie składania.

W cytowanej pracy opisano również zaskakującą obserwację: w komórkach pozbawionych białka SF2/ASF lub syntetyzujących białko pozbawione możliwości przemieszczania się między jądrem a cytoplazmą nie stwierdzono żadnych zaburzeń w eksporcie mRNA. Autorzy podają kilka możliwych przyczyn takiego stanu rzeczy, m.in. zastąpienie funkcji SF2/ASF w transporcie mRNA przez inne białka „wędrujące”, bądź hipotezę, że białka SR stymulują eksport mRNA lecz nie są w tym procesie czynnikami niezbędnymi. Obserwacja ta czeka na wyjaśnienie w dalszych badaniach.

Po wyeksportowaniu transkryptu do cytoplazmy powrót białek SR do jądra odbywa się za pośrednictwem receptorów importu TRN-SR1 i TRN-SR2 [62,63,64]. Co najmniej w przypadku TRN-SR2 oddziaływanie z białkami SR odbywa się w sposób zależny od fosforylacji [63,64]. Wykazano, że TRN-SR2 wiąże się wyłącznie z ufosforylowaną domeną RS, a w wyniku tego oddziaływania następuje jądrowa akumulacja białek SR. Co więcej, opisywany w cytowanych pracach jądrowy import białek SR jest możliwy wyłącznie w obecności ekstraktu cytosolowego i ATP, co wskazuje na rolę zlokalizowanych w cytoplazmie kinaz SRPK. Zanim białka SR powrócą do jądra komórkowego, biorą udział w jeszcze co najmniej jednym procesie.

BIAŁKA SR I TRANSLACJA mRNA

Udział białek SR w metabolizmie mRNA nie kończy się na towarzyszeniu eksportowi z jądra. W 2004 r. Sanford i wsp. wykazali, że dwa białka należące do grupy „wędrującej”, SF2/ASF i SRp20, oddziałują z przeprowadzającymi translację rybosomami oraz stymulują translację reporterowego mRNA *in vitro* i *in vivo* [65]. Rok później ten sam zespół badaczy wykazał, że udział białek SR w procesie translacji mRNA jest regulowany stopniem ufosforylowania domeny RS [66]. Białko SF2/ASF wiązało się z maszyną translacyjną komórki w stanie niepełnej fosforylacji (hipoufosforylowane). Nadekspresja kinaz fosforylujących białko SF2/ASF, Clk/Sty i SRPK2, powodowała zmniejszenie translacji genu reporterowego. Jednocześnie wykazano, że mutacje w domenie RS (zamiana dipeptydów

RS na RG), naśladujące efekt niepełnej fosforylacji białka SF2/ASF powodowały wzmocnienie oddziaływania białka z cytoplazmatycznym mRNA. Autorzy pracy postulują, że nieufosforylowana domena białka RS może działać jako „kotwica jonowa”, unieruchamiająca SF2/ASF na mRNA. Co ciekawe, sama domena RS nie bierze bezpośredniego udziału w translacji, ponieważ białko SF2/ASF pozbawione domeny RS stymuluje translację genu reporterowego. Z kolei domena RRM2, a dokładnie zachowany w ewolucji układ aminokwasów SWQDLKD jest niezbędny do aktywacji translacji przez SF2/ASF, ponieważ zamiana trójki aminokwasów WQD na AAA powoduje znaczne zmniejszenie aktywacji.

PODSUMOWANIE

Z opisanych powyżej wyników badań nad funkcjonowaniem białek SR wynika, że podstawowym czynnikiem, decydującym o tym, w którym rejonie komórki, w jakim procesie i w jaki sposób białka SR biorą udział, jest fosforylacja (Ryc. 4). Podczas różnicowego cięcia i składania pre-mRNA w jądrze komórkowym fosforylacja domeny RS przez kinazę Clk/Sty stymuluje rekrutację białek SR z IGC do miejsc aktywnych transkrypcyjnie. Fosforylacja domeny RS powoduje wzmocnienie oddziaływań białko-białko między czynnikami biorącymi udział w składaniu zawierającymi domeny RS oraz ułatwia specyficzne wiązanie sekwencji ESE przez domeny RRM, prawdopodobnie powodując neutralizację dodatnio naładowanych reszt argininy i stąd powodując zmniejszenie niespecyficznych oddziaływań z pre-mRNA. Fosforylacja determinuje też różną rolę białek „wędrujących” i „niewędrujących” w transporcie gotowego transkryptu z jądra. Białka z grupy „niewędrującej”, odporne na działanie fosfataz, pozostają ufosforylowane i oddysocjują z kompleksów mRNP. Białka z grupy „wędrującej” ulegają defosforylacji i wraz z transkryptem migrują z jądra do cytoplazmy, gdzie biorą też udział w translacji. Powrót do jądra komórkowego jest możliwy po ponownej fosforylacji domeny RS, tym razem przez kinazę SRPK1. Dzięki oddziaływaniu z motywem dokującym w obrębie substratu, kinaza SRPK1 fosforyluje jedynie część seryn domeny RS, pozostawiając pozostałe miejsca fosforylacji dostępne dla kinazy Clk/Sty zlokalizowanej w jądrze. Częściowo ufosforylowane białka SR w kompleksie z receptorami transportu TRN-SR powracają do jądra komórkowego, gdzie po oddysocjowaniu transportyny gromadzą się w strukturach IGC, skąd uwalniane są po ufosforylowaniu przez kinazę Clk/Sty.

Wylaniający się z dotychczasowych badań model regulacji funkcjonowania białek SR przez fosforylację jest nadal niepełny. Nie ma na razie odpowiedzi na wiele pytań, np.: jak istotny jest udział nieufosforylowanych białek SR w transporcie mRNA, skoro brak białka SF2/ASF nie powoduje zaburzeń tego transportu? Czy, analogicznie do kinaz białkowych, specyficznych dla białek SR, istnieją też specyficzne fosfatazy? Na wyjaśnienie czeka też dokładna rola innych kinaz fosforylujących białka SR: topoizomerazy I i hPRP4. Pomimo tych luk już obecna wiedza na temat białek SR pozwala dostrzec, w jak precyzyjny sposób modyfikacja potranslacyjna jednego tylko typu zawiaduje funkcjonowaniem białek tej grupy w skomplikowanych procesach obróbki mRNA.

1. Ge H, Zuo P, Manley JL (1991) Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with *Drosophila* regulators. *Cell* 66: 373-382
2. Krainer AR, Conway GC, Kozak D (1990) Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes Dev* 4: 1158-1171
3. Zahler AM, Lane WS, Stolk JA, Roth MB (1992) SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev* 6: 837-847
4. Lazar G, Schaal T, Maniatis T, Goodman HM (1995) Identification of a plant serine-arginine-rich protein similar to the mammalian splicing factor SF2/ASF. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7672-7676
5. Lopato S, Mayeda A, Krainer AR, Barta A (1996) Pre-mRNA splicing in plants: characterization of Ser/Arg splicing factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3074-3079
6. Lopato S, Waigmann E, Barta A (1996) Characterization of a novel arginine/serine-rich splicing factor in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8: 2255-2264
7. Golovkin M, Reddy AS (1998) The plant U1 small nuclear ribonucleoprotein particle 70K protein interacts with two novel serine/arginine-rich proteins. *Plant Cell* 10: 1637-1648
8. Golovkin M, Reddy AS (1999) An SC35-like protein and a novel serine/arginine-rich protein interact with *Arabidopsis* U1-70K protein. *J Biol Chem* 274: 36428-36438
9. Bourgeois CF, Lejeune F, Stevenin J (2004) Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 78: 37-88
10. Wu JY, Maniatis T (1993) Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* 75: 1061-1070
11. Dauksaite V, Akusjarvi G (2004) The second RNA-binding domain of the human splicing factor ASF/SF2 is the critical domain controlling adenovirus E1A alternative 5'-splice site selection. *Biochem J* 381: 343-350
12. Xiao SH, Manley JL (1997) Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev* 11: 334-344
13. Wang J, Takagaki Y, Manley JL (1996) Targeted disruption of an essential vertebrate gene: ASF/SF2 is required for cell viability. *Genes Dev* 10: 2588-2599
14. Li X, Manley JL (2005) Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell* 122: 365-378.
15. Ring HZ, Lis JT (1994) The SR protein B52/SRp55 is essential for *Drosophila* development. *Mol Cell Biol* 14: 7499-7506
16. Jumaa H, Wei G, Nielsen PJ (1999) Blastocyst formation is blocked in mouse embryos lacking the splicing factor SRp20. *Curr Biol* 9: 899-902
17. Wang HY, Xu X, Ding JH, Bermingham JR Jr, Fu XD (2001) SC35 plays a role in T cell development and alternative splicing of CD45. *Mol Cell* 7: 331-342
18. Xu X, Yang D, Ding JH, Wang W, Chu PH, Dalton ND, Wang HY, Bermingham JR Jr, Ye Z, Liu F, Rosenfeld MG, Manley JL, Ross J Jr, Chen J, Xiao RP, Cheng H, Fu XD (2005) ASF/SF2-regulated CaMKII δ alternative splicing temporally reprograms excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Cell* 120: 59-72
19. Longman D, Johnstone IL, Caceres JF (2000) Functional characterization of SR and SR-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 19: 1625-1637
20. Colwill K, Pawson T, Andrews B, Prasad J, Manley JL, Bell JC, Duncan PI (1996a) The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J* 15: 265-275
21. Velazquez-Dones A, Hagopian JC, Ma CT, Zhong XY, Zhou H, Ghosh G, Fu XD (2005) Mass spectrometric and kinetic analysis of ASF/SF2 phosphorylation by SRPK1 and Clk/Sty. *J Biol Chem* 280: 41761-41768
22. Colwill K, Feng LL, Yeakley JM, Gish GD, Caceres JF, Pawson T, Fu XD (1996) SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. *J Biol Chem* 271: 24569-24575
23. Koizumi J, Okamoto Y, Onogi H, Mayeda A, Krainer AR, Hagiwara M (1999) The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J Biol Chem* 274: 11125-11131
24. Ngo JC, Chakrabarti S, Ding JH, Velazquez-Dones A, Nolen B, Aubol BE, Adams JA, Fu XD, Ghosh G (2005) Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2. *Mol Cell* 20: 77-89
25. Aubol BE, Chakrabarti S, Ngo J, Shaffer J, Nolen B, Fu XD, Ghosh G, Adams JA (2003) Processive phosphorylation of alternative splicing factor/splicing factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12601-12606
26. Caceres JF, Sreaton GR, Krainer AR (1998) A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev* 12: 55-66
27. Nikolakaki E, Kohen R, Hartmann AM, Stamm S, Georgatsou E, Giannakouros T (2001) Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR protein kinase 1 that interacts specifically with scaffold attachment factor-B. *J Biol Chem* 276: 40175-40182
28. Alahari SK, Schmidt H, Kaufer NF (1993) The fission yeast prp4+ gene involved in pre-mRNA splicing codes for a predicted serine/threonine kinase and is essential for growth. *Nucleic Acids Res* 21: 4079-4083
29. Gross T, Lutzelberger M, Weigmann H, Klingenhoff A, Shenoy S, Kaufer NF (1997) Functional analysis of the fission yeast Prp4 protein kinase involved in pre-mRNA splicing and isolation of a putative mammalian homologue. *Nucleic Acids Res* 25: 1028-1035
30. Kojima T, Zama T, Wada K, Onogi H, Hagiwara M (2001) Cloning of human PRP4 reveals interaction with Clk1. *J Biol Chem* 276: 32247-32256
31. Huang Y, Deng T, Winston BW (2000) Characterization of hPRP4 kinase activation: potential role in signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 456-463
32. Dellaire G, Makarov EM, Cowger JJ, Longman D, Sutherland HG, Luhrmann R, Torchia J, Bickmore WA (2002) Mammalian PRP4 kinase copurifies and interacts with components of both the U5 snRNP and the N-CoR deacetylase complexes. *Mol Cell Biol* 22: 5141-5156
33. Bottner CA, Schmidt H, Vogel S, Michele M, Kaufer NF (2005) Multiple genetic and biochemical interactions of Brr2, Prp8, Prp31, Prp1 and Prp4 kinase suggest a function in the control of the activation of spliceosomes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* 48: 151-161
34. Rossi F, Labourier E, Forne T, Divita G, Derancourt J, Riou JF, Antoine E, Cathala G, Brunel C, Tazi J (1996) Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature* 381: 80-82
35. Labourier E, Rossi F, Gallouzi IE, Allemand E, Divita G, Tazi J (1998) Interaction between the N-terminal domain of human DNA topoisomerase I and the arginine-serine domain of its substrate determines phosphorylation of SF2/ASF splicing factor. *Nucleic Acids Res* 26: 2955-2962
36. Soret J, Gabut M, Dupon C, Kohlhagen G, Stevenin J, Pommier Y, Tazi J (2003) Altered serine/arginine-rich protein phosphorylation and exonic enhancer-dependent splicing in mammalian cells lacking topoisomerase I. *Cancer Res* 63: 8203-8211
37. Pilch B, Allemand E, Facompre M, Bailly C, Riou JF, Soret J, Tazi J (2001) Specific inhibition of serine- and arginine-rich splicing factors phosphorylation, spliceosome assembly, and splicing by the anti-tumor drug NB-506. *Cancer Res* 61: 6876-6884
38. Kowalska-Loth B, Girstun A, Trzcinska AM, Piekliko-Witkowska A, Staron K (2005) SF2/ASF protein binds to the cap region of human topoisomerase I through two RRM domains. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 398-403
39. Kowalska-Loth B, Girstun A, Piekliko A, Staron K (2002) SF2/ASF protein inhibits camptothecin-induced DNA cleavage by human topoisomerase I. *Eur J Biochem* 269: 3504-3510
40. Okamoto Y, Onogi H, Honda R, Yasuda H, Wakabayashi T, Nimura Y, Hagiwara M (1998) cdc2 kinase-mediated phosphorylation of splicing factor SF2/ASF. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 872-878

41. Du C, McGuffin ME, Dauwalder B, Rabinow L, Mattox W (1998) Protein phosphorylation plays an essential role in the regulation of alternative splicing and sex determination in *Drosophila*. *Mol Cell* 6: 741-750
42. Jurica MS, Moore MJ (2003) Pre-mRNA splicing: a wash in a sea of proteins. *Mol Cell* 12: 5-14
43. Lam BJ, Hertel KJ (2002) A general role for splicing enhancers in exon definition. *RNA* 8: 1233-1241
44. Yeakley JM, Tronchere H, Olesen J, Dyck JA, Wang HY, Fu XD (1999) Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *J Cell Biol* 145: 447-455
45. Wang HY, Lin W, Dyck JA, Yeakley JM, Songyang Z, Cantley LC, Fu XD (1998) SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J Cell Biol* 140: 737-750
46. Xiao SH, Manley JL (1997) Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev* 11: 334-344
47. Xiao SH, Manley JL (1998) Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2. *EMBO J* 17: 6359-6367
48. Petersen-Mahrt SK, Estmer C, Ohrmalm C, Matthews DA, Russell WC, Akusjarvi G (1999) The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation. *EMBO J* 18: 1014-1024
49. Lai MC, Tarn WY (2004) Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins. *J Biol Chem* 279: 31745-31749
50. Kanopka A, Muhlemann O, Petersen-Mahrt S, Estmer C, Ohrmalm C, Akusjarvi G (1998) Regulation of adenovirus alternative RNA splicing by dephosphorylation of SR proteins. *Nature* 393: 185-187
51. Prasad J, Colwill K, Pawson T, Manley JL (1999) The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing. *Mol Cell Biol* 19: 6991-7000
52. Sanford JR, Bruzik JP (1999) Developmental regulation of SR protein phosphorylation and activity. *Genes Dev* 13: 1513-1518
53. Cao W, Jamison SF, Garcia-Blanco MA (1997) Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro. *RNA* 3: 1456-1467
54. Lamond AI, Spector DL (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 605-612
55. Misteli T, Caceres JF, Clement JQ, Krainer AR, Wilkinson MF, Spector DL (1998) Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo. *J Cell Biol* 143: 297-307
56. Aguilera A (2005) Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Curr Opin Cell Biol* 17: 242-250
57. Dimaano C, Ullman KS (2004) Nucleocytoplasmic transport: integrating mRNA production and turnover with export through the nuclear pore. *Mol Cell Biol*. 24: 3069-3076
58. Huang Y, Steitz JA (2001) Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol Cell* 7: 899-905
59. Huang Y, Gattoni R, Stevenin J, Steitz JA (2003) SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol Cell* 11: 837-843
60. Huang Y, Yario TA, Steitz JA (2004) A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9666-9670
61. Lin S, Xiao R, Sun P, Xu X, Fu XD (2005) Dephosphorylation-dependent sorting of SR splicing factors during mRNP maturation. *Mol Cell* 20: 413-425
62. Kataoka N, Bachorik JL, Dreyfuss G (1999) Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *J Cell Biol* 145: 1145-1152
63. Lai MC, Lin RI, Huang SY, Tsai CW, Tarn WY (2000) A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J Biol Chem* 275: 7950-7957
64. Lai MC, Lin RI, Tarn WY (2001) Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10154-10159
65. Sanford JR, Gray NK, Beckmann K, Caceres JF (2004) A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev* 18: 755-768
66. Sanford JR, Ellis JD, Cazalla D, Caceres JF (2005) Reversible phosphorylation differentially affects nuclear and cytoplasmic functions of splicing factor 2/alternative splicing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15042-15047
67. Gui JF, Lane WS, Fu XD (1994) A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* 369: 678-682
68. Kuroyanagi N, Onogi H, Wakabayashi T, Hagiwara M (1998) Novel SR-protein-specific kinase, SRPK2, disassembles nuclear speckles. *Biochem Biophys Res Commun* 242: 357-364
69. Duncan PI, Stojdl DF, Marius RM, Bell JC (1997) In vivo regulation of alternative pre-mRNA splicing by the Clk1 protein kinase. *Mol Cell Biol* 17: 5996-6001
70. Duncan PI, Stojdl DF, Marius RM, Scheit KH, Bell JC (1998) The Clk2 and Clk3 dual-specificity protein kinases regulate the intranuclear distribution of SR proteins and influence pre-mRNA splicing. *Exp Cell Res* 241: 300-308
71. Nayler O, Stamm S, Ullrich A (1997) Characterization and comparison of four serine- and arginine-rich (SR) protein kinases. *Biochem J* 326: 693-700
72. Graveley BR (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 6: 1197-1211
73. Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31: 3497-3500

Phosphorylation of serine-arginine rich proteins – pleiotropic effect of one type posttranslational modification

Agnieszka Piekietko-Witkowska 

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical Centre of Postgraduate Education, 99, Marymoncka St., 01-813 Warszawa, Poland

e-mail: pieklo@cmkp.edu.pl

Key words: pre-mRNA splicing, SR proteins, spliceosome, phosphorylation, SR protein kinases

ABSTRACT

SR proteins are components of the spliceosome, a dynamic complex catalysing removal of pre-mRNA introns during splicing reaction. Recent studies have shown additional functions for SR proteins in mRNA transport and translation. Several protein kinases have been identified that can phosphorylate SR proteins. Phosphorylation is a common posttranslational modification among proteins. However in the case of SR proteins it has got a special meaning. Phosphorylation of serine residues clustered in a narrow area of RS domains affects all aspects of SR proteins functions. It influences subcellular localization and determines process in which the proteins take part.

Degradacja mRNA niosących przedwczesny kodon stop (NMD) – na straży jakości mRNA

Agnieszka Dzikiewicz[✉]

Zofia Szweykowska-Kulińska

Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

[✉]Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań; e-mail: agnieszkadzikiewicz@o2.pl, tel. (061) 829 27 34

Artykuł otrzymano 21 kwietnia 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 7 sierpnia 2006 r.

Słowa kluczowe: degradacja mRNA niosących przedwczesny kodon stop (NMD), przedwczesny kodon stop (PTC), eksonowy kompleks łącznikowy (EJC), składanie RNA

Wykaz skrótów: CBC (ang. *cap-binding complex*) – białka wiążące się z kapem; DSE (ang. *downstream sequence element*) – sekwencja zlokalizowana poniżej; EJC (ang. *exon-exon junction complex*) – eksonowy kompleks łącznikowy; NMD (ang. *nonsense-mediated mRNA decay*) – degradacja mRNA niosących przedwczesny kodon stop; PTC (ang. *premature termination codon*) – przedwczesny kodon stop; UTR (ang. *untranslated region*) – rejon nie ulegający translacji

STRESZCZENIE

Degradacja mRNA niosących przedwczesny kodon stop (NMD, ang. *nonsense-mediated mRNA decay*) jest procesem kontroli jakości mRNA. Dzięki niemu z transkryptów zawierających przedwczesny kodon stop (PTC, ang. *premature termination codon*) nie powstają skrócone białka, które mogłyby być szkodliwe dla komórki. NMD podlegają nie tylko wadliwe mRNA zawierające PTC jako wynik mutacji w obrębie genu, błędów w transkrypcji czy nieprawidłowego składania RNA, ale również około 10% prawidłowych transkryptów, których ekspresja wydaje się być regulowana przez NMD. NMD jest obecny u wszystkich, badanych dotąd, organizmów eukariotycznych (ssaki, drożdże, nicienie, owady i rośliny), a kluczowe czynniki zaangażowane w ten proces charakteryzują się dużą ewolucyjną zachowawczością. Jednak mechanizm NMD różni się w szczegółach między gatunkami.

WPROWADZENIE

Degradacja mRNA niosących przedwczesny kodon stop (NMD) jest procesem kontroli jakości mRNA, który wykrywa i niszczy transkrypty zawierające przedwczesny kodon stop (PTC). PTC mogą powstać w wyniku mutacji, błędów w transkrypcji czy nieprawidłowego składania mRNA. Translacja takich mRNA prowadziłaby do powstania skróconych wersji białek, z których część mogłaby nadal pełnić swoje funkcje, ale większość stałaby się niefunkcjonalna. Produkcja takich białek byłaby w najlepszym razie stratą energii, ale częściej – szkodliwa dla komórki. Jednak NMD podlegają też pewne naturalne transkrypty, których ekspresja jest w ten sposób regulowana. Szczególną rolę odgrywa NMD w regulacji poziomu mRNA będących produktami różnicowego cięcia i składania mRNA.

Choć NMD jest procesem występującym u wszystkich dotąd zbadanych organizmów eukariotycznych (ssaki, drożdże, nicienie, owady i rośliny), szczegóły przebiegu tego procesu różnią się między gatunkami. Różnice dotyczą czynników zaangażowanych w NMD, mechanizmu rozpoznania PTC, lokalizacji procesu w czasie i przestrzeni oraz sposobu degradacji mRNA zawierających PTC.

Czynniki biorące udział w NMD są też zaangażowane w szereg innych procesów komórkowych związanych z translacją, cyklem komórkowym oraz zabezpieczaniem stabilności informacji genetycznej. Różnorodność procesów, w jakie zaangażowany jest NMD oraz inne funkcje pełnione przez czynniki biorące udział w NMD sprawia, że badania nad nim mają dużą wartość poznawczą. Natomiast znaczenie NMD w przebiegu pewnych chorób u człowieka nadaje badaniom również charakter użytkowy.

Niniejszy artykuł przedstawia obecny stan wiedzy na temat procesu NMD, podkreślając podobieństwa i różnice między gatunkami.

mRNA PODLEGAJĄCE PROCESOWI NMD

Proces NMD zapewnia szybką degradację mRNA zawierających przedwczesny kodon stop. PTC mogą powstawać w wyniku np. mutacji: substytucji wprowadzających kodon stop czy insercji lub delecji zmieniających ramkę odczytu. Również błędy w transkrypcji oraz nieprawidłowe składanie mRNA mogą spowodować powstanie PTC. Oprócz niszczenia takich wadliwych transkryptów, uważa się, że NMD bierze udział w regulacji pewnych „normalnych” mRNA, kodujących funkcjonalne białka. Badania prowadzone na liniach komórkowych ssaków [1], muszki owocowej [2], na drożdżach [3] i nicieniach [4] pozbawionych pewnych komponentów NMD wykazały istnienie szerokiej gamy transkryptów, których ekspresja jest regulowana przez ten proces. mRNA te można podzielić na kilka klas w zależności od posiadanej cechy, która wywołuje NMD: 1) mRNA zawierające otwarte ramki odczytu

położone w rejonie 5' UTR (uORF, ang. *upstream ORF*); 2) mRNA z PTC wprowadzonymi przez alternatywne składanie (u człowieka nawet 1/3 produktów alternatywnego składania może być substratami dla NMD [5]); 3) mRNA zawierające introny w 3' UTR; 4) mRNA selenoprotein, w przypadku których kodon dla selenocysteiny (będący kodonem stop), przy braku selenu odczytywany jest jako PTC; 5) mRNA podlegające nieprecyzyjnemu skanowaniu (ang. *leaky scanning*) podczas inicjacji translacji, w wyniku czego prawidłowy kodon start jest pomijany, a translacja zaczyna się od następnego, w innej ramce odczytu; 6) mRNA, które w wyniku nieprawidłowej obróbki zachowują introny po eksporcie do cytoplazmy; 7) mRNA, których translacja zachodzi z przesunięciem ramki odczytu o +1 nukleotydy; 8) policistronowe mRNA; 9) mRNA, w których dochodzi do pominięcia kodonu stop (ang. *read-through*), a zatem kodon terminacyjny odczytywany jest jako kodujący i nie zachodzi terminacja; oraz 10) mRNA kodowane przez transpozony, retrowirusy lub pseudogeny. W tabeli 1 zestawiono typy naturalnych substratów NMD zaobserwowane u różnych organizmów.

Oprócz wyżej wymienionych cech mRNA wywołujących NMD sprawdzano, czy zidentyfikowane mRNA charakteryzują się innymi właściwościami, odróżniającymi je od innych transkryptów. W przypadku drożdży stwierdzono jedynie, że w komórkach dzikiego typu występują one na dużo niższym poziomie niż w komórkach pozbawionych któregoś z czynników biorących udział w NMD. Jest to zrozumiałe, jeżeli podlegają one niszczeniu na drodze NMD. Geny tych mRNA wykazywały też tendencję do nielosowego rozkładu na chromosomach, gromadząc się w pobliżu telomerów [3]. Natomiast w badaniach nad *Drosophila* zauważono, że oprócz niskiego poziomu ekspresji w komórkach typu dzikiego, transkrypty regulowane na drodze NMD są dłuższe i zawierają więcej intronów niż inne mRNA, a ich geny są nadreprezentowane na chromosomie IV [2].

mRNA regulowane naturalnie przez NMD są kodowane przez szeroką gamę genów związanych z różnymi funkcjami [1-3]. Jednak porównanie takich mRNA o podwyższonej ekspresji przy braku aktywnego NMD u ssaków, muszek owocowych i drożdży wykazało istnienie tylko dwóch mRNA reprezentowanych we wszystkich organizmach, dodatkowo ośmiu wspólnych dla *Drosophila* i drożdży oraz dziesięciu występujących u *Drosophila* i ssaków [2]. Wynika stąd, że choć NMD bierze udział w regulacji ekspresji

pewnych genów we wszystkich badanych organizmach, to spektrum genów regulowanych przez NMD różni się między gatunkami. Mendell i wsp. [1] zauważyli, że wśród naturalnych substratów NMD u ssaków wyraźnie nadreprezentowane są transkrypty genów zaangażowanych w metabolizm aminokwasów i odpowiedź na głód aminokwasowy.

CZYNNIKI BIORĄCE UDZIAŁ W NMD

NMD jest kompleksowym procesem, w który zaangażowanych jest wiele białek. Czynniki biorące udział w NMD zostały po raz pierwszy zidentyfikowane u *S. cerevisiae* i *C. elegans*. Ortologi trzech z nich: Upf1, Upf2 i Upf3 (u *C. elegans* odpowiednio: Smg2, Smg3 i Smg4) występują we wszystkich organizmach, u których stwierdzono NMD i są kluczowymi czynnikami w tym procesie. Upf3 jest białkiem głównie jądrowym, choć kursuje między jądrem a cytoplazmą i oddziałuje z Upf2 oraz czynnikiem uwalniającym eRF3. U ludzi występuje w dwóch izoformach: Upf3a i Upf3b i łączy się w jądrze z dojrzałym mRNA przez interakcje z eksonowym kompleksem łącznikowym (EJC, ang. *exon-exon junction complex*). Jest to kompleks białek lokalizujący się około 20-24 nukleotydy powyżej miejsca łączenia eksonów [6]. Upf2 jest białkiem okołojądrowym, które oddziałuje z Upf3 i Upf1 oraz eRF3 [6]. Upf1 to białko występujące w cytoplazmie, będące helikazą RNA grupy I, posiadające aktywność RNA-zależnej ATPazy i ATP-zależnej 5'→3' helikazy. Łączy się ono z Upf2 oraz eRF1 i eRF3, a cykl jego fosforylacji-defosforylacji jest kluczowy dla procesu NMD. Dowiedziono, że o ile u drożdży i nicieni brak białka Upf1 nie jest letalny, o tyle mysie zarodki pozbawione genu dla tego białka nie przeżywają [7]. U roślin dotychczas potwierdzono udział tylko białka Upf3 w procesie NMD [8].

Drugą grupę czynników zaangażowanych w NMD tworzą białka odpowiedzialne za fosforylację i defosforylację Upf1. Są to wykryte u *C. elegans* białka Smg1 oraz Smg5-7. Ich ortologi nie występują u drożdży, są natomiast obecne u ssaków oraz *D. melanogaster* (oprócz Smg7). U roślin istnieją potencjalne ortologi białek Smg, lecz ich funkcja nie została jak dotąd zbadana. Kinaza Smg1 występuje zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie, należy do rodziny kinaz podobnych do kinazy 3-fosfo-fosfatydyloinozytolu (ang. *phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase)-related kinase* – PIKK). Jej rola w NMD polega na fosforylacji Upf1 [9,10]. Ufosforylowane białko Upf1 podlega defosforylacji przez białko

Smg5-7. Białka te są podobne do siebie, wszystkie zawierają domenę podobną do występującej w białkach z rodziny 14-3-3, które wiążą fosfoforynę. Białka Smg5-7 mogą łączyć się z ufosforylowanym Upf1. Smg7 wydaje się być tym białkiem, które wiąże dwa etapy procesu NMD: rozpoznanie transkryptu zawierającego PTC i jego degradację [11,12] (patrz podrozdział *Od rozpoznania PTC do*

Tabela 1. Cechy naturalnych substratów dla NMD określone jak dotąd u różnych organizmów eukariotycznych.

Cecha wywołująca NMD	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>A. thaliana</i>
uORF	+	+		+	
Alternatywne składanie				+	+
Intron w 3' UTR				+	
Selenoproteiny				+	
Nieprecyzyjne skanowanie	+			+	
pre-mRNA w cytoplazmie	+				
Przesunięcie ramki odczytu +1 nt	+				
Policistronowe mRNA	+				
Pominięcie kodonu stop			+		
Transpozony, pseudogeny, retrowirusy	+	+		+	

Tabela 2. Czynniki biorące udział w NMD u różnych organizmów eukariotycznych. + bierze udział, – brak udziału/czynnik nie występujący w danym organizmie, ? brak wyników.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>A. thaliana</i>
Czynniki NMD					
Upf1	+	+	+	+	?
Upf2	+	+	+	+	?
Upf3	+	+	+	+	+
Smg1	-	+	+	+	?
Smg5	-	+	+	+	?
Smg6	-	+	+	+	?
Smg7	-	+	-	+	?
Składniki kompleksu EJC					
eIF4AIII	-	-	-	+	?
Magoh	-	-	-	+	?
Y14	-	-	-	+	?
RNPS1	-	-	-	+	?
MLN51/Barentsz	-	-	-	+	?
PYM	-	-	-	+	?
Czynniki degradujące mRNA					
Dcp1	+	?	-	+	?
Dcp2	+	?	-	+	?
Xrn1	+	?	+	+	?
Ski kompleks	+	?	+	+	?
Egzosom	+	?	+	+	?
PARN	-	?	?	+	?

degradacji mRNA). Pewna rozbieżność istnieje w przypadku roli Smg1 u muszek owocowych. Gatfield i wsp. [13] pokazali, że wyciszenie każdego z białek Upf lub Smg1, 5 i 6 powodowało stabilizację transkrypty zawierającego PTC, przy czym dla Smg1 efekt był najsłabszy. Natomiast Chen i wsp. [14] wykazują, że Smg1 jest zbędny dla przebiegu NMD u *D. melanogaster*. Być może znaczenie ma tu fakt, iż pierwszy eksperyment wykonywany był na liniach komórkowych S2, a drugi na dorosłych muszkach oraz zastosowanie różnych metod badawczych.

Trzecia grupa czynników biorących udział w NMD to białka tworzące kompleks EJC. U drożdży i *Drosophila* ich obecność nie jest konieczna dla przebiegu NMD, natomiast u ssaków ich brak hamuje ten proces. Część składników EJC ssaków występuje tylko w jądrze, odłącza się od dojrzałego mRNA zanim znajdzie się on w cytoplazmie i nie bierze udziału w NMD. Należą tutaj Aly/REF, Srm160 i UAP56 [15]. Pozostałe składniki EJC są zaangażowane w proces NMD. eIF4AIII łączy się bezpośrednio z mRNA w jądrze i sugeruje się, że tworzy platformę, na której zakotwiczą się pozostałe komponenty kompleksów EJC [16]. Jednak dynamika powstawania kompleksów EJC nie została jak dotąd dokładnie poznana. Do eIF4AIII wiąże się białko MLN51/Barentsz oraz heterodimer Y14-Magoh. Z heterodimerem Y14-Magoh oddziałują też białka PYM oraz RNPS1. Wszystkie te składniki są niezbędne dla przebiegu NMD u ssaków, co pokazały między innymi eksperymenty z wyciszaniem ich genów [9,17]. Z heterodimerem Y14-Magoh i białkiem RNPS1 wiąże się też Upf3, stanowiąc pomost między białkami EJC a rdzeniem NMD. U drożdży białkiem, które spełnia podobną do EJC rolę znakowania transkryptów, choć nie wykazującym homologii do żadnego składnika EJC, jest białko podobne do hnRNP-Hrp1p. Mutacje w tym białku

większają stabilność transkryptów zawierających PTC. Hrp1p łączy się specyficznie z mRNA oraz oddziałuje z Upf1 [18].

Białka uczestniczące w ostatnim etapie NMD – degradacji mRNA – tworzą kolejną grupę istotnych czynników. Należą tu enzymy usuwające kap (Dcp1 i Dcp2 u ssaków i drożdży), deadenylazy (PARN u ssaków) oraz endo- i egzozonukleazy (Xrn1 oraz egzozom i kompleks Ski u ssaków, drożdży i muszek) [6]. Zestawienie czynników biorących udział w procesie NMD u różnych organizmów eukariotycznych przedstawia tabela 2.

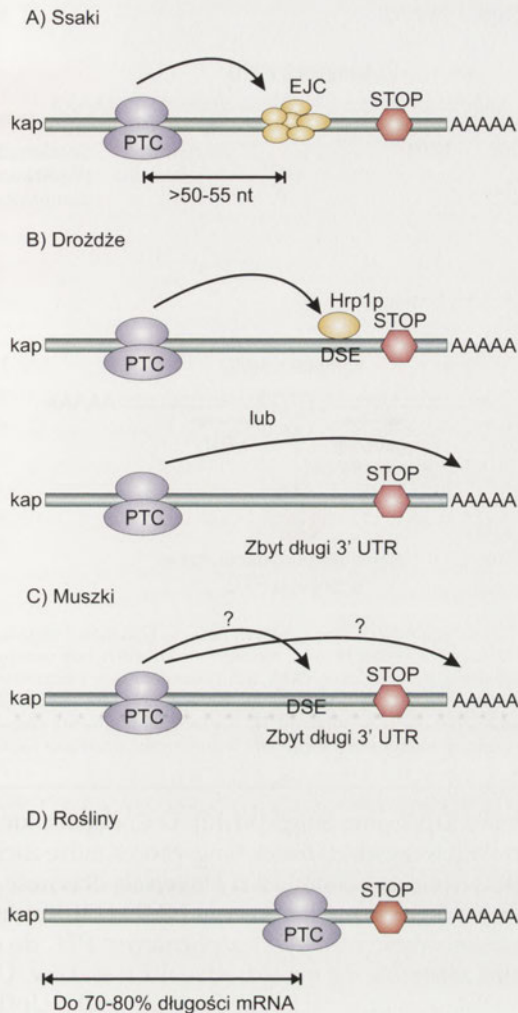
PRZEBIEG PROCESU NMD

Chociaż NMD występuje powszechnie u *Eucaryota*, przebieg tego procesu różni się między gatunkami. Różnice te dotyczą zarówno rozpoznania przedwczesnego kodonu stop jak i lokalizacji procesu w czasie i

przestrzeni oraz sposobu degradacji mRNA zawierającego PTC.

ROZPOZNANIE PRZEDWCZESNEGO KODONU STOP

Odróżnienie przedwczesnego kodonu stop od normalnego opiera się na kontekście w jakim kodon terminacyjny się znajduje i zależy od pewnych sygnałów działających w *cis* (patrz Ryc. 1). U ssaków zauważono, że procesowi NMD podlegają tylko mRNA wywodzące się z genów zawierających introny; transkrypty genów bezintronowych nie są degradowane na tej drodze [19]. Wynika to stąd, że sygnałem dla rozpoznania kodonu stop jako przedwczesnego jest obecność na mRNA kompleksu EJC, który w czasie składania lokalizuje się nieco powyżej każdego miejsca łączenia eksonów. Podczas pierwszej rundy translacji EJC, kiedy znajdzie się około 50-55 nukleotydów powyżej każdego z nich. Kiedy rybosom napotka kodon terminacyjny, przyłączają się czynniki uwalniające eRF1 i eRF3, a wraz z nimi białka Upf1 i Smg1. Jeśli poniżej kodonu stop nie ma już żadnego kompleksu EJC, to zachodzi terminacja translacji. Jeśli jednak 50-55 lub więcej nukleotydów poniżej kodonu terminacyjnego znajduje się kompleks EJC, Upf1 oddziałuje z Upf2 związanym z EJC i uruchamiany jest proces NMD. Od tej reguły są wyjątki: transkrypt β receptora komórek T (TCR- β) podlega NMD nawet jeśli kodon stop znajduje się mniej niż 50-55 nt powyżej EJC. Jak dotąd, brak wyjaśnienia tego zjawiska. Z kolei mRNA formy jelitowej apolipoproteiny B, który w wyniku redagowania ma wprowadzony kodon stop mniej więcej w połowie transkrypty, nie podlega NMD, mimo że reguła 55 nukleotydów jest spełniona. Najprawdopodobniej białka



Rycina 1. Mechanizm rozpoznania przedwczesnego kodonu stop zależy od oddziaływania między rybosomem zatrzymanym na kodonie stop a sygnałami położonymi poniżej. A) U ssaków sygnałem jest białkowy eksonowy kompleks łącznikowy (EJC), jeżeli znajduje się >50-55 nt poniżej przedwczesnego kodonu stop (PTC). B) U drożdży sygnałem jest białko Hrp1p wiążące się do sekwencji DSE (ang. *downstream sequence element*) lub nadmierna długość 3' UTR. C) U owadów i nicieni mechanizm rozpoznania PTC nie jest znany, ale przypuszcza się, że jest podobny do tego u drożdży, gdyż kompleks EJC nie jest konieczny do przebiegu NMD u muszek. D) U roślin mechanizm także nie jest znany. Wiadomo, że NMD podlegają transkrypty, w których PTC znajduje się w rejonie odpowiadającym maksymalnie 70-80% długości mRNA.

biorące udział w redagowaniu mRNA chronią go przed rozpoznaniem jako substrat NMD [20].

W przeciwieństwie do ssaków, u drożdży, nicieni, muszek i roślin mRNA będące produktami genów nie posiadających intronów podlegają NMD. Inne muszą być więc tutaj sygnały decydujące o rozpoznaniu kodonu stop jako przedwczesnego. Jak dotąd, taki sygnał zidentyfikowano tylko u drożdży. Jest to specyficzna sekwencja znajdująca się poniżej kodonu stop (ang. *downstream sequence element* – DSE): TGYGATGYYYYY, gdzie Y=T lub C. Im więcej razy ta sekwencja jest powtórzona, tym efektywniej wywołany jest proces NMD [21]. Z sekwencją DSE wiąże się białko Hrp1p, które jest konieczne dla przebiegu NMD u drożdży. Inny model zakłada, że sygnałem dla rozpoznania kodonu stop jako przedwczesnego jest nadmiernie długi 3' UTR – być może pewne oddziaływania czynników terminacyjnych z końcem 3' są niezbędne do prawidłowego za-

kończenia translacji [22]. U muszek i nicieni kompleks EJC nie jest zaangażowany w proces NMD, więc rozpoznanie PTC może przebiegać podobnie jak u drożdży; przypuszczenie to wymaga jednak potwierdzenia doświadczalnego.

U roślin procesowi NMD podlegają zarówno produkty genów zawierających introny [8] jak i bezintronowych [23,24]. W przypadku genów bezintronowych znaczenie miało miejsce, w którym wprowadzono przedwczesny kodon stop: wstawienie PTC w rejonie odpowiadającym maksymalnie 70-80% długości mRNA powodowało NMD, natomiast transkrypty z PTC bliżej 3' końca nie podlegały temu procesowi [23,24]. Z kolei w innym badaniu stwierdzono, że dla zajścia NMD konieczne było wycięcie intronu, ale znajdującego się nie – jak u ssaków – poniżej PTC, lecz powyżej [25]. Być może więc, u roślin występują obie drogi rozpoznawania przedwczesnych kodonów stop: jedna podobna do tej obecnej u drożdży, a druga – do ssacej.

LOKALIZACJA NMD W CZASIE I PRZESTRZENI

U wszystkich organizmów eukariotycznych proces NMD przebiega w czasie translacji i może być hamowany przez antybiotyki będące inhibitorami translacji (np. cykloheksamid, puromycyna), inaktywację czynników inicjujących translację lub przez obecność supresorowych tRNA [20]. Różnice dotyczą natomiast czasu, w którym NMD może zajść: czy zachodzi tylko w trakcie pierwszej czy także kolejnych rund translacji oraz lokalizacji tego procesu w komórce: w jądrze czy w cytoplazmie. Szczegóły dotyczące tych kwestii zostały jak dotąd poznane tylko u ssaków i drożdży.

Model postulowany dla ssaków zakłada, że NMD zachodzi tylko podczas pierwszej (ang. *pioneer*) rundy translacji. Od kolejnych rund translacji pierwsza różni się tym, że zachodzi na mRNA, który na końcu 5' ma białka wiążące się z kapem (CBC): CBP20 i CBP80, a na końcu 3' – białko wiążące się z ogonem poliA – PABP2. Po pierwszej rundzie translacji białka te zastępowane są odpowiednio przez: eIF4E oraz PABP1. Ponieważ u ssaków do przebiegu NMD konieczne są białka wchodzące w skład kompleksów EJC, logiczne wydaje się, że proces ten może zachodzić tylko podczas pierwszej rundy translacji, gdyż potem EJC nie są już związane z mRNA. Pierwszych wskazań, że faktycznie tak się dzieje, dostarczyły badania Ishigaki i wsp. [26], w których pokazano, że mRNA związane z CBC podlegają translacji, oraz że degradacja mRNA zawierających PTC zachodzi, gdy są one związane z CBP80. W testach immunoprecypitacyjnych mRNA zawierające PTC i związane z CBP80 stanowiły 17% mRNA typu dzikiego (czyli nie zawierającego PTC), natomiast udział mRNA niosących PTC i związanych z eIF4E był zredukowany do 12% poziomu mRNA typu dzikiego. Różnica ta mieści się w granicach błędów eksperymentalnego, ale nie można wykluczyć, że część transkryptów podlega NMD także wtedy, gdy jest związana z eIF4E. Za tym, że NMD zachodzi podczas pierwszej rundy translacji przemawiają kolejne fakty. Inhibitor translacji 4E-BP1, który wiąże się z eIF4E, hamuje późniejszą translację, nie ma natomiast wpływu na NMD. Również eIF4AIII, czynnik zaangażowany w NMD, związany jest tylko z mRNA z przyłączonym CBP80 [27]. Można więc przyjąć, że NMD u ssaków zachodzi podczas specyficznej, pierwszej rundy translacji, która

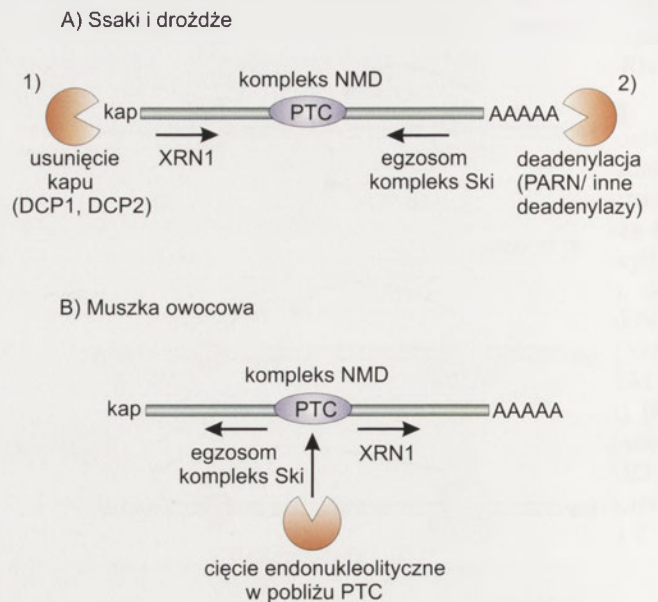
różni się od kolejnych rund translacji. Nie wiadomo jednak, czy białka CBC biorą udział w NMD, czy też NMD tylko zachodzi na mRNA związanych z tymi białkami, a one same w proces ten nie są zaangażowane. Niedawno została opublikowana praca, która wskazuje, że CBP80 może brać czynny udział w NMD [28].

U drożdży NMD również podlegają transkrypty związane z CBC, jednak pod nieobecność białek CBC proces ten nie jest zahamowany i może zachodzić na mRNA z przyłączonym eIF4E [29]. Nie ma też ograniczenia co do czasu, w jakim NMD może zachodzić – nie tylko podczas pierwszej rundy translacji, ale też podczas kolejnych. Świadczy o tym fakt, że mRNA zawierające PTC (które akumulują się gdy szlak NMD jest wyłączony) są szybko degradowane po przywróceniu aktywności NMD [30].

Lokalizacja procesu NMD w komórce jest jeszcze kwestią sporną. Sugeruje się, że u ssaków pewne transkrypty podlegają NMD w cytoplazmie, ale inne – w jądrze. Jądrowa lokalizacja translacji budzi kontrowersje [31], ale obserwuje się, że niektóre mRNA zawierające przedwczesny kodon stop występują we frakcji jądrowej. Może być jednak tak, że ich translacja nie zachodzi w jądrze, lecz podczas ich eksportu do cytoplazmy, kiedy nadal są z jądrem związane. Jak dotąd brak danych, które jednoznacznie stwierdziłyby, czy przy całkowicie zablokowanym eksporcie mRNA z jądra zachodzi proces NMD. U drożdży natomiast wykazano, że proces NMD może mieć miejsce tylko w cytoplazmie, gdyż jest on hamowany przez zablokowanie eksportu mRNA [32].

OD ROZPOZNANIA PTC DO DEGRADACJI mRNA

Obecnie wiadomo, w jaki sposób PTC są rozpoznawane u różnych organizmów, znane są też drogi degradacji mRNA, które zawierają PTC. Natomiast to, jak transkrypt z rozpoznaniem przedwczesnym kodonem stop jest kierowany do degradacji, zostało jak dotąd bliżej – choć jeszcze nie do końca – scharakteryzowane tylko u ssaków. Dla zajścia procesu NMD kluczowy jest cykl fosforylacji-defosforylacji białka Upf1. Fosforylację przeprowadza kinaza Smg1, natomiast defosforylacja zależna jest od białek Smg5, Smg6 i Smg7, które tworzą kompleks i wiążą fosfatazę białkową PP2A. Jakże dokładnie zmiany i reorganizacje w obrębie kompleksu NMD wywołuje fosforylacja/defosforylacja Upf1 – nie wiadomo. Stwierdzono jednak, że Smg7 może być tym białkiem, które wiąże dwa etapy procesu NMD: rozpoznanie PTC z kierowaniem mRNA do degradacji [11]. Smg7 gromadzi się w tzw. ciałkach P, w których zachodzi degradacja mRNA, a jego nadekspresja sprawia, że również Smg5 i Upf1 są tam gromadzone. Białko Smg7 byłoby więc czynnikiem doprowadzającym transkrypty z rozpoznaniem przedwczesnym kodonem stop do miejsc, gdzie mogą one ulec zniszczeniu. Rolę Smg7 w kierowaniu mRNA do degradacji potwierdzają eksperymenty, w których białko Smg7 na stałe związane do mRNA powodowało jego szybki rozkład, nawet jeśli powyżej miejsca związania nie było kodonu stop. Sugeruje to, że Smg7 działa w późnej fazie NMD, gdy PTC został już rozpoznany i kieruje taki transkrypt do degradacji. Do wywołania takiego efektu wystarcza C-końcowa domena Smg7, natomiast koniec N, który zawiera domenę podobną do białek z rodziny 14-3-3,



Rycina 2. Degradacja mRNA zawierających PTC. A) U ssaków i drożdży degradacja mRNA może zachodzić przez 1) niezależne od deadenylicacji usunięcie kapu i degradację przez egzonukleazę XRN1 lub 2) deadenylicację i degradację przez egzosom i kompleks Ski. B) U muszki owocowej rozkład inicjowany jest przez endonukleolityczne cięcie w pobliżu PTC, a powstałe fragmenty degradowane są od obu nowo utworzonych końców bez konieczności usuwania kapu czy deadenylicacji.

oddziałuje z Upf1 oraz Smg5 [11,12]. U *C. elegans*, który posiada ortologi wszystkich białek Smg, proces może zachodzić w podobny sposób. Natomiast u *Drosophila* obecność białka Smg7 nie jest konieczna dla procesu NMD [13]. Tak więc, u owadów kierowanie mRNA z rozpoznaniem PTC do degradacji może zachodzić na innej drodze niż u ssaków. U drożdży nie występują ortologi białek Smg, ale białko Upf1 także może być fosforylowane [33]. Nie wiadomo jednak, czy ma to znaczenie dla przebiegu NMD.

Kiedy transkrypt zawierający rozpoznany PTC zostanie skierowany do degradacji, jego rozkład może przebiegać różnymi drogami (Ryc. 2). U drożdży i ssaków mRNA może być degradowany od obu końców. Częściej zachodzi degradacja od końca 5', którą zapoczątkowuje niezależne od deadenylicacji usunięcie kapu przez enzymy Dcp1 i Dcp2. Dalej następuje degradacja przez egzonukleazę Xrn1. Druga możliwość to deadenylicacja mRNA przeprowadzana u ssaków przez enzym PARN (poliA rybonukleaza), a u drożdży przez inną, jak dotąd nie scharakteryzowaną, deadenylazę. Następnie mRNA jest degradowany przez egzosom (kompleks 3'→5' egzonukleaz) i kompleks Ski [6]. Inaczej wygląda rozkład mRNA u *Drosophila*. Degradacja jest inicjowana przez endonukleolityczne cięcie w pobliżu PTC, a powstałe fragmenty mRNA są degradowane od nowo powstałych 5' i 3' końców przez Xrn1 w kierunku 5'→3' oraz egzosom i kompleks Ski w kierunku 3'→5'. Nie ma konieczności usuwania kapu czy deadenylicacji mRNA [34].

INNE FUNKCJE CZYNNIKÓW BIORĄCYCH UDZIAŁ W PROCESIE NMD

Białka Upf i Smg, pełniące kluczową rolę w procesie NMD, oraz białka wchodzące w skład kompleksu EJC okazują się być zaangażowane także w inne procesy komór-

Tabela 3. Inne funkcje, w które zaangażowane są czynniki biorące udział w NMD.

Funkcja	Białko
Stymulacja translacji	Upf1, Upf2, Upf3, Y14, Magoh, RNPS1
Zwiększenie poziomu mRNA	RNPS1
Prawidłowa terminacja translacji	Upf1, Upf2, Upf3
Regulacja cyklu komórkowego	Upf1, Smg1
Replikacja/naprawa DNA	Upf1
Utrzymanie telomerów	Smg6

kowe (Tab. 3). Zauważono, że obecność jednego lub więcej intronów w genie zwiększa poziom dojrzałej mRNA, a także ilość białka [35]. Za ten efekt odpowiedzialne są właśnie białka zaangażowane w proces NMD. Upf1, Upf2 i Upf3 oraz heterodimer Y14-Magoh zwiększają wydajność translacji, a RNPS1 stymuluje translację i podnosi poziom mRNA. Natomiast te białka kompleksu EJC, które nie są zaangażowane w proces NMD, nie mają wpływu na translację. Białka Upf zwiększają też wierność terminacji translacji – ich brak powoduje odczytanie kodonu stop jako sensownego i powstawanie białek o wydłużonym końcu C. Prawdopodobnie znaczenie ma tu fakt, że białka Upf mogą się wiązać z czynnikami uwalniającymi: Upf1 oddziałuje z eRF1 oraz eRF3, a Upf2 i Upf3 – tylko z eRF3 [36].

Białko Upf1 jest też zaangażowane w przebieg cyklu komórkowego oraz naprawę DNA. Komórki pozbawione Upf1 zatrzymują się w fazie S cyklu komórkowego. Nie ma to związku z NMD, ponieważ podobny efekt nie był obserwowany, gdy wyciszono Upf2. Obserwowano, że pod wpływem promieniowania γ wzrasta ilość białka Upf1, zwłaszcza we frakcji związanej z chromatyną. Istotna jest tutaj fosforylacja Upf1 przez kinazę ATR (należącą do tej samej rodziny kinaz PIKK co Smg1) ponieważ w komórkach pozbawionych ATR nie obserwowano związania Upf1 z chromatyną. Nie wiadomo jak dotąd, jakie funkcje pełni białko Upf1 związane z chromatyną, ale postuluje się, że bierze udział w zabezpieczeniu stabilności informacji genetycznej przez udział w replikacji i/lub naprawie DNA. Potwierdza to fakt, że Upf1 oddziałuje z polimerazą DNA δ [37].

W zabezpieczeniu stabilności informacji genetycznej bierze też udział kinaza Smg1. Jest ona aktywowana pod wpływem promieniowania jonizującego oraz światła UV i charakteryzuje się zdolnością do fosforylowania białka p53, ważnego regulatora cyklu komórkowego. Pozbawienie komórek białka Smg1 powodowało wzrost uszkodzeń DNA, zwiększoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące oraz zatrzymywało komórki w fazie G_2 [38].

Inne białko Smg, Smg6, jest homologiem drożdżowego białka Est1, zaangażowanego w utrzymywanie telomerów. Nie wiadomo, na czym dokładnie polega jego rola w wydłużaniu telomerów; proponowane są dwa modele: Est1 umożliwia związanie telomerazy do 3' końca telomeru lub telomeraza jest tam ciągle obecna, a białko Est1 ją tylko aktywuje. Testy immunoprecypitacyjne wskazują na występowanie Smg6 w kompleksie z telomerazą, a jego nadekspresja powoduje takie zmiany w budowie zakończeń telomerowych chromosomów, które umożliwiają telomerazie dostęp

do tych struktur. Zmiany te najprawdopodobniej obejmują obecność/brak pewnych białek związanych z zakończeniami telomerowymi lub zmiany w strukturze DNA wyższego rzędu (np. obecność pętli itp.) [39]. Problemy te wymagają jeszcze dalszych badań.

W związku z zaangażowaniem czynników biorących udział w NMD w inne procesy komórkowe można postawić pytanie, czy wyewoluowały one jako składniki procesu NMD, czy też dla pełnienia innych funkcji, a NMD jest tylko korzystnym produktem ubocznym?

NMD A INTERFERENCJA RNA I MIKRO RNA

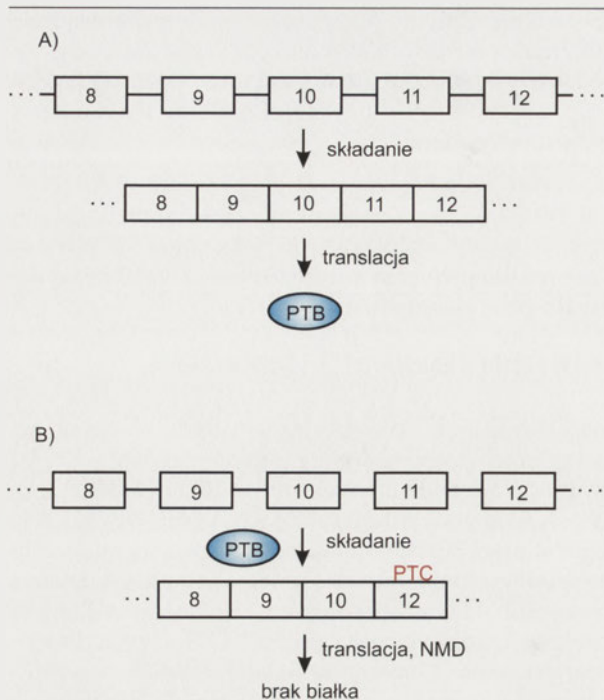
Oprócz NMD potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów zachodzi też m. in. na drodze interferencji RNA (RNAi) oraz przy udziale endogennych mikro RNA (miRNA). W procesie RNAi krótkie interferujące RNA (siRNA), w pełni komplementarne do docelowych mRNA, przyłączają się do nich i powodują ich degradację. Natomiast miRNA działają w różny sposób u zwierząt i u roślin. U zwierząt miRNA są tylko częściowo komplementarne do 3' UTR swych docelowych transkryptów i hamują translację. U roślin zaś miRNA są niemal całkowicie komplementarne do docelowych cząsteczek mRNA i powodują ich degradację, podobnie jak podczas interferencji RNA. Aby spełniać swoją funkcję, siRNA i miRNA muszą połączyć się z kompleksem wyciszającym (RISC), w skład którego wchodzi między innymi białko z rodziny Argonaute [41]. Białka te, podobnie jak czynniki zaangażowane w NMD (Smg5, Smg7 i Upf1), lokalizują się w ciałkach P. Tam też znajdują się białka potrzebne do degradacji mRNA w kierunku 5'→3': enzymy usuwające kap (Dcp1 i Dcp2) oraz egzonukleaza Xrn1. Powstaje więc pytanie, czy wyciszanie RNA za pomocą siRNA i miRNA oraz proces NMD są w jakiś sposób ze sobą powiązane?

Zagadnienie to zostało sprawdzone doświadczalnie u nicienia [42] i muszki owocowej [43]. O ile u *C. elegans* wyciszenie Upf1, Smg5 i Smg6 zniósło efekt interferencji RNA, o tyle u *D. melanogaster* nie wykazano zależności między procesami NMD, RNAi oraz regulacją ekspresji na drodze miRNA. Mimo wspólnej lokalizacji przebiegu końcowych etapów tych procesów, zakłócenie jednego z nich nie hamuje innych. Kwestia ta wymaga jednak dalszych badań u innych organizmów.

ZNACZENIE PROCESU NMD U CZŁOWIEKA

O istotności NMD najlepiej świadczą różnorodne procesy, w jakie jest on zaangażowany. Ponieważ NMD został najdokładniej poznany u ssaków, najpełniejszy obraz dla przedstawienie przykładów znaczenia NMD u człowieka.

NMD jest postrzegane przede wszystkim jako mechanizm kontroli jakości mRNA, dzięki któremu nie powstają białka niepełnej długości. Kontrola jakości mRNA dotyczy również produktów alternatywnego składania, które umożliwia produkcję zróżnicowanych białek z jednego pre-mRNA, jednak nie zawsze prowadzi do powstania funkcjonalnych białek. Uważa się, że około jedna trzecia produktów alternatywnego składania generuje PTC i jest usuwana w drodze NMD [5]. Szczególnie istotne jest to w przypadku



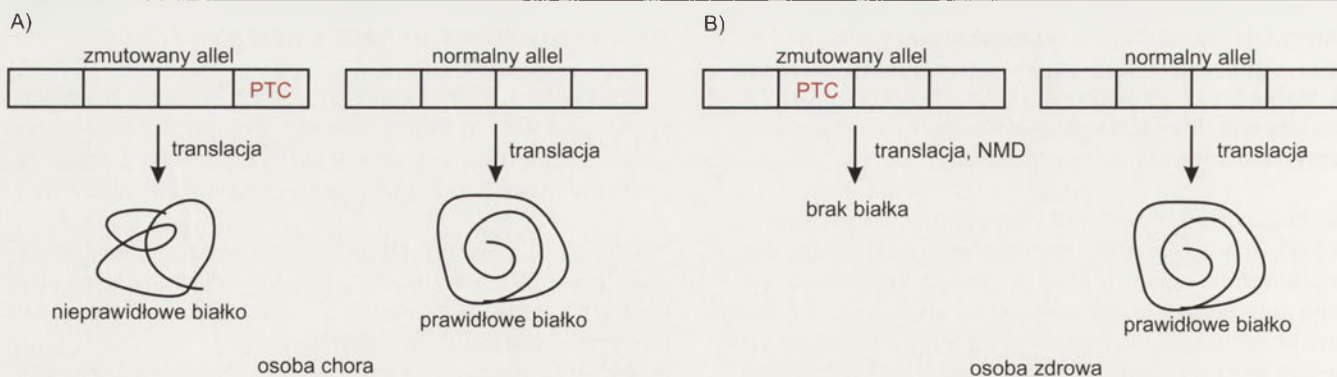
Rycina 3. Białko wiążące się z traktem polipirymidynowym (PTB) reguluje poziom swojej ekspresji przez alternatywne składanie pre-mRNA i NMD. A) Gdy PTB jest nieobecne, powstaje pełny mRNA, z którego jest syntetyzowane białko. B) Gdy białka PTB jest dużo, w składaniu z jego pre-mRNA wycinany jest 11. ekson, co powoduje pojawienie się PTC i w rezultacie transkrypt jest niszczone w drodze NMD, białko nie powstaje.

immunoglobulin oraz receptorów limfocytów T. Ogromna różnorodność tych białek wynika z rearanzacji dokonywanych w obrębie genów, jednak wprowadzają one w części produktów przedwczesny kodon stop i w rezultacie nie powstałyby z nich funkcjonalne białka. Takie transkrypty są skutecznie usuwane na drodze NMD [22].

Inną istotną funkcją NMD jest regulacja ekspresji części genów. Przykładem mogą być tu geny selenoprotein, które w obecności selenu są syntetyzowane, a gdy brakuje tego pierwiastka, kodon dla selenocysteiny jest odczytywany jako przedwczesny kodon terminacji translacji (PTC) i transkrypt podlega degradacji [1]. Green i wsp. [5] proponują model regulacji ekspresji genów przez składanie, nazwany przez nich regulowanym, nieproduktywnym składaniem

i translacją (RUST, ang. *regulated unproductive splicing and translation*). Regulacja odbywa się na skutek zmian w otoczeniu, w jakim zachodzi składanie i obecności czynników warunkujących składanie, co decyduje o powstaniu funkcjonalnych lub niefunkcjonalnych form mRNA. Ich funkcjonalność jest weryfikowana w trakcie translacji. Przykładem może być tutaj autoregulacja poziomu białka wiążącego się z traktem polipirymidynowym (PTB), które jest czynnikiem zaangażowanym w składanie. Wzrost ilości PTB sprawia, że z jego pre-mRNA wycinany jest 11. ekson, co z kolei powoduje przesunięcie ramki odczytu i powstanie PTC [22] (Ryc. 3). Innym przykładem zaangażowania NMD w regulację ekspresji genów może być regulacja ekspresji genów odpowiedzialnych za metabolizm aminokwasów i odpowiedź na głód aminokwasowy. Zauważono, że geny te ulegają podwyższonej ekspresji w komórkach, w których nie zachodzi proces NMD [1]. Badacze wysnuli więc przypuszczenie, że w warunkach niedoboru aminokwasów proces NMD, który zachodzi podczas translacji, jest hamowany i poziom transkryptów białek syntetyzujących aminokwas jest podwyższony. Normalnie zaś, gdy aminokwasów jest dość i nie jest potrzebna ich produkcja, ekspresja odpowiednich genów jest hamowana przez NMD. Jednak, jeśli w przypadku głodu aminokwasowego NMD jest hamowany z powodu zatrzymania lub znacznego zwolnienia translacji, to tak samo nie może zachodzić produkcja białek syntetyzujących aminokwas. Być może jest więc tak, że kompleks EJC sam oddysocjuje od mRNA po jakimś czasie, a gdy występuje niedostatek aminokwasów, to translacja trwa dłużej i kompleksy EJC zdążą się odłączyć od transkryptu. Wtedy kodon stop nie może być rozpoznany jako przedwczesny i mRNA zamiast być degradowany jest przepisywany na niezbędne białka.

Znaczenie procesu NMD stwierdzono również w przebiegu różnych chorób. Otóż, może on łączyć objawy pewnych schorzeń, takich jak β -talasemia, choroba von Willebranda, podatność na zakażenia prątkowe, krótkopalczastość typu B czy degeneracja siatkówki. Fenotyp heterozygot zależy bowiem od położenia mutacji wprowadzającej kodon stop w danym genie. Mutacje znajdujące się w ostatnim eksonie mają charakter dominujący, ponieważ kodon stop nie jest rozpoznawany jako przedwczesny i mRNA ulega translacji. Jednak mutacje we wcześniejszych eksonach powodują, że kodon stop zostaje uznany za przedwczesny i skrócone



Rycina 4. Położenie mutacji wprowadzającej kodon stop ma znaczenie dla fenotypu heterozygot. A) Kodon stop w ostatnim eksonie nie jest rozpoznawany jako przedwczesny, powstaje nieprawidłowe białko, które dominuje nad formą prawidłową, wywołując chorobę. B) Kodon stop we wcześniejszych eksonach jest rozpoznawany jako przedwczesny, transkrypt jest niszczone i nieprawidłowe białko nie powstaje. Z normalnego allelu produkowane jest prawidłowe białko, co wystarcza, by nie było objawów choroby.

białko nie powstaje, a jego prawidłowa forma produkowana z drugiego allelu genu wystarcza, by osoba była zdrowa. Mutacja jest wtedy recesywna (Ryc. 4). Podobnie dzieje się w przypadku nowotworów. Dzięki NMD nie ulegają ekspresji zmutowane białka supresorowe, w których pojawił się PTC. Przyczynia się to do opóźnienia rozwoju nowotworów, przynajmniej dopóki drugi allel genu supresorowego nie nabędzie mutacji [40].

Jednak NMD jest bronią obosieczną i może zaostrzyć przebieg innych chorób genetycznych, takich jak mukowiscydoza, syndrom Hurlera, syndrom Frasiera czy dystrofia mięśniowa Duchenne'a. W tych przypadkach skrócone białka nadal spełniałyby swoje funkcje, przynajmniej częściowo, ale ich mRNA są degradowane na drodze NMD. Pewne polepszenie daje stosowanie antybiotyków aminoglikozydowych. Trudno wyobrazić sobie jednak ich rutynowe stosowanie, ponieważ wyłączenie NMD nie jest w tej sytuacji selektywne i może prowadzić do poważnych skutków ubocznych [40].

WNIOSKI

NMD jest ważnym i złożonym procesem pełniącym istotne funkcje nie tylko w zabezpieczeniu komórek przed szkodliwymi, skróconymi formami białek, ale też i w regulacji ekspresji genów. Czynniki biorące udział w NMD są również zaangażowane w inne istotne procesy komórkowe związane z translacją, cyklem komórkowym oraz zabezpieczeniem stabilności informacji genetycznej. Z badań nad ssakami i drożdżami wylania się coraz bardziej kompleksowy obraz procesu NMD, jednak wiele jego aspektów wymaga dalszego scharakteryzowania. Istotne jest też bliższe poznanie szczegółów tego procesu u innych organizmów, zwłaszcza u roślin, u których jest on najsłabiej zbadany. Pogłębienie wiedzy na temat NMD może przyczynić się do zrozumienia także innych procesów zachodzących w komórkach.

PIŚMIENNICTWO

- Mendell JT, Sharifi NA, Meyers JL, Martinez-Murillo F, Dietz HC (2004) Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet* 36: 1073-1078
- Rehwinkel J, Letunic I, Raes J, Bork P, Izaurralde E (2005) Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets. *RNA* 11: 1530-1544
- He F, Li X, Spatrick P, Casillo R, Dong S, Jacobson A (2003) Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. *Mol Cell* 12: 1439-1452
- Mitrovich QM, Anderson P (2005) mRNA surveillance of expressed pseudogenes in *C. elegans*. *Curr Biol* 15: 963-967
- Green RE, Lewis BP, Hillman RT, Blanchette M, Lareau LF, Garnett AT, Rio DC, Brenner SE (2003) Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes. *Bioinformatics* 19 Suppl. 1: i118-i121
- Conti E, Izaurralde E (2005) Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr Opin Cell Biol* 17: 316-325
- Wagner E, Lykke-Andersen J (2002) mRNA surveillance: the perfect persist. *J Cell Sci* 115: 3033-3038
- Hori K, Watanabe Y (2005) UPF3 suppresses aberrant spliced mRNA in *Arabidopsis*. *Plant J* 43: 530-540
- Yamashita A, Kashima I, Ohno S (2005) The role of SMG-1 in nonsense-mediated mRNA decay. *Biochim Biophys Acta* 1754: 305-315
- Abraham RT (2004) The ATM-related kinase, hSMG-1, bridges genome and RNA surveillance pathways. *DNA Repair* 3: 919-925
- Unterholzner L, Izaurralde E (2004) SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol Cell* 16: 587-596
- Fukuhara N, Ebert J, Unterholzner L, Lindner D, Izaurralde E, Conti E (2005) SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol Cell* 17: 537-547
- Gatfield D, Unterholzner L, Ciccarelli FD, Bork P, Izaurralde E (2003) Nonsense-mediated mRNA decay in *Drosophila*: at the intersection of the yeast and mammalian pathways. *EMBO J* 22: 3960-3970
- Chen Z, Smith KR, Batterham P, Robin C (2005) Smg1 nonsense mutations do not abolish nonsense-mediated mRNA decay in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 171: 403-406
- Singh G, Lykke-Andersen J (2003) New insights into the formation of active nonsense-mediated decay complexes. *Trends Biochem Sci* 28: 464-466
- Shibuya T, Tange TO, Sonenberg N, Moore MJ (2004) eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. *Nat Struct Mol Biol* 11: 346-351
- Lykke-Andersen J, Shu MD, Steitz JA (2001) Communication of the position of exon-exon junction to the mRNA surveillance machinery by the protein RNPS1. *Science* 293: 1836-1839
- Gonzalez CI, Ruiz-Echevarria MJ, Vasudevan S, Henry MF, Peltz SW (2000) The yeast hnRNP-like protein Hrp1/Nab4 marks a transcript for nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell* 5: 489-499
- Maquat LE, Li X (2001) Mammalian heat shock p70 and histone H4 transcripts, which derive from naturally intronless genes, are immune to nonsense-mediated decay. *RNA* 7: 445-456
- Maquat LE (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 89-99
- Zhang S, Ruiz-Echevarria MJ, Quan Y, Peltz SW (1995) Identification and characterization of a sequence motif involved in nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol* 15: 2231-2244
- Lejeune F, Maquat LE (2005) Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 17: 30-315
- van Hoof A, Green PJ (1996) Premature nonsense codons decrease the stability of phytohemagglutinin mRNA in a position-dependent manner. *Plant J* 10: 415-424
- Petracek ME, Nuygen T, Thompson WF, Dickey LF (2000) Premature termination codons destabilize ferredoxin-1 mRNA when ferredoxin-1 is translated. *Plant J* 21: 563-569
- Isshiki M, Yamamoto Y, Satoh H, Shimamoto K (2001) Nonsense-mediated decay of mutant *waxy* mRNA in rice. *Plant Physiol* 125: 1388-1395
- Ishigaki Y, Li X, Serin G, Maquat LE (2001) Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106: 607-617
- Chiu SY, Lejeune F, Ranganathan AC, Maquat LE (2004) The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. *Genes Dev* 18: 745-754
- Hosoda N, Kim YK, Lejeune F, Maquat LE (2005) CBP80 promotes interaction of Upf1 with Upf2 during nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 12: 893-901
- Gao Q, Das B, Sherman F, Maquat LE (2005) Cap-binding protein 1-mediated and eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated pioneer rounds of translation in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 4258-4263
- Maderazo AB, Belk JP, He F, Jacobson A (2003) Nonsense-containing mRNAs that accumulate in the absence of a functional nonsense-mediated mRNA decay pathway are destabilized rapidly upon its restitution. *Mol Cell Biol* 23: 842-851
- Dahlberg JE, Lund E, Goodwin EB (2003) Nuclear translation: what is the evidence? *RNA* 9: 1-8

32. Kuperwasser N, Brogna S, Dower K, Rosbash M (2004) Nonsense-mediated decay does not occur within the yeast nucleus. *RNA* 10: 1907-1915
33. de Pinto B, Lippolis R, Castaldo R, Altamura N (2004) Overexpression of Upf1p compensates for mitochondrial splicing deficiency independently of its role in mRNA surveillance. *Mol Microbiol* 51: 1129-1142
34. Gatfield D, Izaurralde E (2004) Nonsense-mediated decay messenger RNA decay is initiated by endonucleolytic cleavage in *Drosophila*. *Nature* 429: 575-578
35. Callis J, Fromm M, Walbot V (1987) Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev* 274: 1183-1200
36. Wilkinson MF (2005) A new function for nonsense-mediated mRNA-decay factors. *Trends Genet* 21:143-148
37. Azzalin CM, Lingner J (2006) The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability. *Curr Biol* 16: 433-439
38. Brumbaugh KM, Otterness DM, Geisen C, Oliveira V, Brognard J, Li X, Lejeune F, Tibbetts RS, Maquat LE, Abraham RT (2004) The mRNA surveillance protein hSMG-1 functions in genotoxic stress response pathways in mammalian cells. *Mol Cell* 14: 585-598
39. Reichenbach P, Hoss M, Azzalin CM, Nabholz M, Bucher P, Lingner J (2003) A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed. *Curr Biol* 13: 568-574
40. Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE (2004) Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet* 36: 801-808
41. Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS (2005) Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 15: 331-341
42. Domeier ME, Morse DP, Knight SW, Portereiko M, Bass BL, Mango SE (2000) A link between RNA interference and nonsense-mediated decay in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 289: 1928-1930
43. Rehwinkel J, Behm-Ansmant I, Gatfield D, Izaurralde E (2005) A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 11: 1640-1647

Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) – on guard of mRNA quality

Agnieszka Dzikiewicz[✉], Zofia Szweykowska-Kulińska

Department of Gene Expression, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Adam Mickiewicz University, 5 Międzychodzka St., 60-371 Poznań, Poland

[✉]e-mail: agnieszkadzikiewicz@o2.pl

Key words: nonsense-mediated mRNA decay, mRNA degradation, premature termination codon, exon-exon junction complex, splicing

ABSTRACT

Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) is a surveillance pathway that protects cells from potentially harmful effects of truncated proteins that would otherwise be translated from mRNAs bearing premature termination codons (PTC). NMD targets not only aberrant mRNAs possessing PTCs resulting from mutations, transcription errors or abnormal splicing but is also thought to be involved in regulating the expression of several wild-type transcripts (approximately 10% of the transcriptome). NMD is a conserved pathway present in all eukaryotic organisms studied so far (yeast, nematoda, flies, mammals and plants). The key players involved in NMD are also conserved among these species. However, details of NMD mechanism vary among eukaryotic organisms studied so far.

Wirus zapalenia wątroby typu C

– budowa i replikacja a możliwości terapeutyczne i zjawisko oporności

STRESZCZENIE

Materiał genetyczny wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV, ang. *hepatitis C virus*) to jednoniciowy, liniowy RNA. Charakterystyczną cechą HCV jest zmienność genetyczna, która w połączeniu z niezwykle wysoką potencją replikacyjną oraz presją selekcyjną wywieraną przez organizm gospodarza staje się główną przyczyną powstawania niewrażliwych na działanie układu immunologicznego i opornych na leki mutantów HCV. W ciągu jednego zaledwie dnia w organizmie pacjenta może zostać wytworzonych 10^{12} cząstek wirusowych, z których wiele obdarzonych jest mutacjami. Dzięki ciśnieniu selekcyjnemu wywieranemu przez system immunologiczny oraz stosowane leki dochodzi do wyselekcjonowania nowych niewrażliwych na terapeutyki wariantów HCV. Celem pracy jest zwrócenie uwagi na problemy terapeutyczne towarzyszące przewlekłemu zapaleniu wątroby typu C (pzw C) wynikające z budowy i sposobu replikacji wirusa. Prezentowane rozważania nie dotyczą szeroko omawianych w literaturze czynników prognostycznych zależnych od pacjenta.

WPROWADZENIE

Kiedy w połowie lat sześćdziesiątych poprzedniego stulecia zidentyfikowano wirus zapalenia wątroby typu B [1], stało się jasnym, że obok niego musi istnieć jakiś dodatkowy czynnik wywołujący ostre i przewlekłe stany zapalne wątroby, bardzo często związane z przetoczeniem krwi (tzw. poprzetoczeniowe zapalenie wątroby). Chcąc uzyskać więcej informacji na jego temat pobierano od osób chorych na poprzetoczeniowe zapalenie wątroby surowicę i zakażano nią zwierzęta laboratoryjne (głównie szympansy). Następnie analizowano obraz kliniczny choroby oraz parametry biochemiczne, oceniano zmiany patomorfologiczne biopsji wątroby. W rezultacie zaobserwowano, iż podczas choroby dochodzić może do powstawania kompleksów tubularnych złożonych ze zdwojenia błon siateczki śródplazmatycznej hepatocytów. Dodatkowo w zainfekowanych komórkach było widoczne uszkodzenie mitochondriów i zwiększenie liczby lizosomów [2].


W 1989 roku po wieloletniej żmudnej pracy zespół badawczy Michaela Houghtona (Chiron Corporation, Kalifornia, USA) ogłosił na łamach *Science* odkrycie nowego czynnika infekcyjnego. Zgodnie ze zwyczajem przyporządkowywania wirusom zapalenia wątroby kolejnych liter alfabetu nazwano go wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) [3,4]. HCV został sklasyfikowany jako jedyny przedstawiciel rodzaju *Hepacivirus* w obrębie rodziny *Flaviviridae*.

BUDOWA HCV

Wirusowa cząstka HCV ma średnicę około 50 nm i składa się z otoczki, wewnątrz której ulokowany jest kapsyd zawierający materiał genetyczny wirusa, czyli jednoniciowy, liniowy RNA, o długości ok. 9,6 tysięcy zasad i polarność mRNA ((+)RNA wirus). Otoczka zbudowana jest z błony gospodarza, w której osadzone są kodowane przez wirusa glikoproteiny E1 i E2 (Tab. 1). W obrębie genomu HCV wyróżnić można dwie sekwencje niekodujące ulokowane na końcu 3' i 5' (tzw. 3'UTR i 5'UTR, ang. *untranslated regions*) oraz centralnie położoną sekwencję kodującą. Oba UTR-y wykazują dużą zachowawczość (ponad 90%), gdyż pełnią ważne funkcje regulatorowe podczas procesów replikacji i translacji [5]. Usytuowana pomiędzy 3'UTR i 5'UTR pojedyncza otwarta ramka odczytu (ORF, ang. *open reading frame*) koduje poliproteinę złożoną z ponad 3000 aminokwasów. Po translacji poliproteina ta ulega rozszczepieniu na białka strukturalne (S) i niestrukturalne (NS).

BIAŁKA STRUKTURALNE (S)

Do białek strukturalnych zalicza się: białko rdzeniowe C (ang. *core protein*) tworzące nukleokapsyd oraz glikoproteiny E1 i E2 (ang. *envelope proteins*), które są zakotwiczone w zewnętrznej osłonce wirusa (Ryc. 1).

Arleta Kowala-Piaskowska 

III Katedra Pediatrii Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

III Katedra Pediatrii Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań; e-mail : arletakp1@wp.pl, tel. (061) 849 13 62

Artykuł otrzymano 24 kwietnia 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 11 września 2006 r.

Słowa kluczowe: wirus zapalenia wątroby typu C, interferon, rybawiryna, genom HCV, mutacja HCV

Wykaz skrótów : HCV (ang. *hepatitis C virus*) – wirus zapalenia wątroby typu C; IFN – interferon; NS – białka niestrukturalne; pzw C – przewlekłe zapalenie wątroby typu C; S – białka strukturalne; zwz – wirusowe zapalenie wątroby

Tabela 1. Lokalizacja w genomie i funkcja poszczególnych białek w obrębie HCV.

Kodowane białko	Lokalizacja sekwencji kodującej	Funkcja
5'UTR	1-341	inicjacja translacji, replikacja
C	342-914	tworzące nukleokapsyd białko strukturalne
E1	915-1490	białko strukturalne, wiązanie receptorów i rozpoznawanie wrażliwych komórek
E2	1491-2579	białko strukturalne, wiązanie receptorów i rozpoznawanie wrażliwych komórek
E2-p7	1491-2768	nieznana
p7	2580-2768	prawdopodobnie transbłonowy kanał wapniowy
NS2	2769-3419	proteaza
NS3	3420-5312	proteaza, helikaza, NTP-aza
NS4A	5313-5476	kofaktor proteiny serynowej NS3
NS4B	5477-6257	nieznana-komponent kompleksu replikacyjnego
NS5A	6258-7600	komponent kompleksu replikacyjnego
NS5B	7601-9374	polimeraza RNA zależna od RNA
3'UTR	9375-9621	replikacja, pakowanie genomowego RNA do wirionów

Białko rdzeniowe C. Białko C ma ciężar cząsteczkowy od 21 do 23 kDa. Występuje ono głównie w cytoplazmie, aczkolwiek „okrojony” fragment o ciężarze cząsteczkowym od 19 do 21 kDa został zidentyfikowany w jądrze. *In vitro* wykazano, iż białko to wchodzi w interakcje z białkami gospodarza, np. czynnikiem martwicy nowotworów alfa (TNF-alfa) czy z jądrowym czynnikiem kappa B (NF-kappaB) [6]. W związku z powyższym wydaje się być oczywistym, że białko to może zaburzać funkcje komórkowe, a nawet wywołać transformację nowotworową.

Białka otoczki – glikoproteiny E1 i E2. Białka te posiadają domenę hydrofobową, dzięki temu mogą wiązać się z błonami komórkowymi. Stwierdzono, że E2 może powstawać z dwóch prekursorów: E2-NS2 i E2-p7. Obecność i rola p7 oraz E2-p7 w zainfekowanych komórkach są przedmiotem badań. Niezwykle wysoki stopień zmienności został zaobserwowany we fragmencie białka E2, pomiędzy resztami aminokwasów 384 a 410 polipeptydu (tj. pomiędzy resztami aminokwasów 1 i 27 E2). Ten genetycznie niestabilny frag-

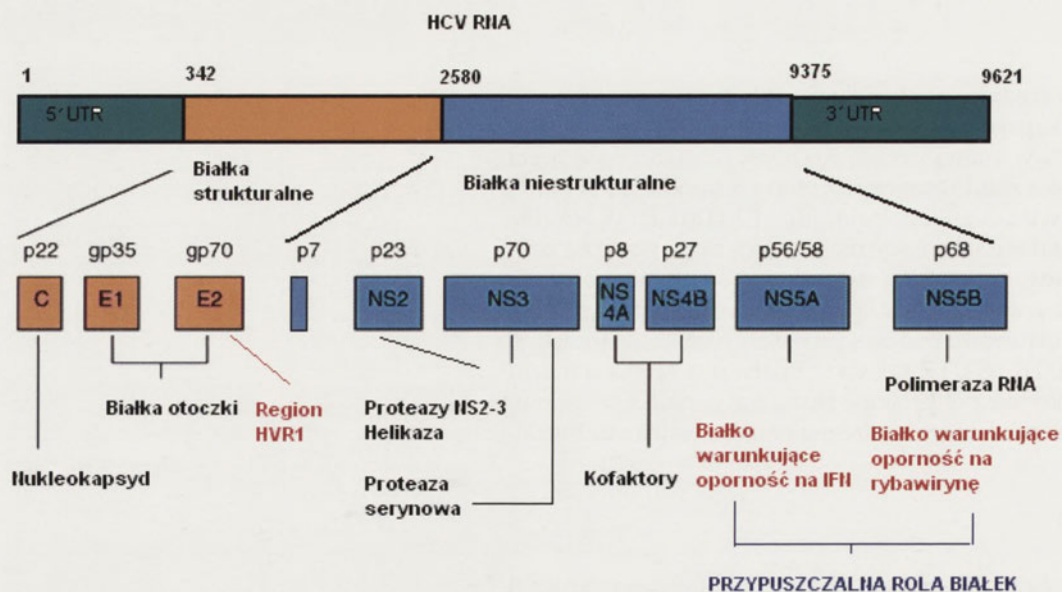
ment nazwany został regionem hiperzmiennym (HVR1). Zaobserwowano, że w trakcie trwania przewlekłego zakażenia HCV przeciwciała specyficzne do epitopów HVR1 mogą ulegać istotnym zmianom. Pozwala to sądzić, że region HVR1 jest poddawany silnemu ciśnieniu selekcyjnemu, co więcej zmiany zachodzące w obrębie tego regionu mogą być odpowiedzialne za powstawanie mutantów nierozpoznawalnych przez system immunologiczny [7].

Pod koniec lat dziewięćdziesiątych doniesiono, że białko E2 może być efektywnie fosforylowane przez kinazę białkową odpowiedzialną za aktywację czynnika inicjującego translację (eIF2alfa). E2 może więc hamować fosforylację eIF2alfa i w ten sposób zatrzymywać syntezę białek komórkowych. Ta właściwość E2 może leżeć u podstaw jednego z mechanizmów, poprzez który HCV unika odpowiedzi interferonowej [8]. E1 i E2 rozpoznają i wiążą się ze specyficznymi receptorami usytuowanymi na wrażliwych komórkach (hepatocyty, komórki krwi) [9]. W hiperzmiennym rejonie białka E2 ulokowane są epitopy neutralizujące, stąd przeciwciała anti-HVR1-E2 uniemożliwiają wiązanie E2 do receptorów komórkowych. Dzięki zastosowaniu odpowiedniej ilości immunoglobulin skierowanych przeciwko temu rejonowi można zablokować infekcję w kulturze tkankowej [10].

BIAŁKA NIESTRUKTURALNE (NS)

Do białek niestrukuralnych zalicza się: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B. Dodatkowo w zakażonych komórkach powstaje, wspomniane wcześniej, białko p7. Niedawno doniesiono, iż p7 jest białkiem ulegającym integracji z błonami, w których tworzy pory funkcjonujące jako kanał wapniowy. W obrębie białek niestrukuralnych znaleziono helikazę, dwie proteazy oraz polimerazę RNA zależną od RNA.

Białko NS2. Białka HCV zostały nazwane przez analogię do białek wirusa żółtej gorączki. Ponieważ w obrębie HCV nie znaleziono białek podobnych do NS1 wirusa żółtej gorączki, dlatego ich nazewnictwo rozpoczyna się



Rycina 1. Organizacja genomu HCV i zakodowane w nim białka.

od NS2. Białko to zostaje wydzielone z poliproteiny przez komórkową peptydazę oraz wirusową proteazę złożoną z NS2 i NS3. Uważa się, że proteaza NS2-3 dokonuje katalitycznego cięcia w obecności jonów cynku. Jest to białko o charakterze transbłonowym. Hydrofobowy C-koniec ulokowany jest w świetle siateczki śródplazmatycznej, a N-koniec w cytoplazmie. Sugeruje się, że NS2 może odgrywać istotną rolę w akumulacji wirusa, fosforylacji białka NS5A, jest także inhibitorem apoptozy i modulatorem transkrypcji genów.

Białko NS3. NS3 funkcjonuje jako proteaza serynowa, NTP-aza i helikaza RNA. Aktywność biologiczna domeny proteazowej została dość dobrze scharakteryzowana, gdyż jest ona konieczna do wycinania białek z poliproteiny wirusowej. Białko NS3 bierze udział w proteolizie wiązania pomiędzy białkiem NS2 a NS3 oraz w uwolnieniu pozostałych białek NS [11]. Domena proteazowa obejmuje pierwszych 181 aminokwasów. Przy porównaniu sekwencji aminokwasów różnych izolatów HCV okazuje się, że białko NS3 zawiera trzy zachowane w ewolucji reszty aminokwasów: His-1083, Asp-1107 i Ser-1165, które reprezentują katalityczną triadę charakterystyczną dla rodziny proteaz serynowych. Białko NS4A funkcjonuje jako kofaktor proteazy serynowej NS3 i jest niezbędne dla cięcia NS3/4A i NS4B/5A oraz przyspiesza cięcie NS4A/4B i NS5A/5B. NS3, podobnie jak trypsyna, posiada miejsce wiążące cynk. Jak dotąd stosunkowo niewiele wiadomo o roli, jaką w cyklu replikacyjnym wirusa spełniają dwie pozostałe domeny NS3: helikazowa i NTP-azowa [12]. Obie zlokalizowane są w C-końcowej części (465 reszt aminokwasowych). Przypuszcza się, że helikaza rozwija podwójną nić RNA w czasie replikacji oraz wszelkie drugorzędowe struktury RNA utrudniające replikację i translację, NTP-aza dostarcza energię potrzebną dla efektywnego funkcjonowania helikazy.

Białko NS4. NS4 jest prekursorem dla dwóch białek: NS4A i NS4B. Funkcja hydrofobowego białka NS4B jest nieznana, aczkolwiek wiadomo, że razem z NS4A i NS3 uczestniczy ono w fosforylacji NS5A. NS4A, jak wspomniano wcześniej, jest kofaktorem proteazy serynowej NS3. W jego skład wchodzi 54 reszty aminokwasowe, domena N-końcowa jest hydrofobowa, a C-końcowa hydrofilowa. Region NS4A, konieczny do aktywacji NS3, znajduje się między 21 a 34 resztą aminokwasową [13]. Stabilne wiązanie pomiędzy białkami NS3 a NS4A może więc ulec destabilizacji przez mutację w NS4A. Stwierdzono na przykład, iż w wyniku mutacji w pozycji 28 NS4 nie dochodzi do jego oddziaływań z NS3 [14]. Wydaje się, że białko NS4A nie jest konieczne dla wszystkich funkcji proteazy serynowej.

Białko NS5. Polipeptyd jest przetwarzany na dwa funkcjonalne białka: NS5A i NS5B. Białko NS5A jest fosfoproteiną, pierwotna jego funkcja jest nieznana, choć na podstawie dotychczasowych badań wydaje się, że uczestniczy w replikacji wirusowego RNA. Liczne badania kliniczne sugerują, że NS5A indukuje brak wrażliwości na interferon [15]. Występujące na końcu C poliproteiny białko NS5B wydaje się być związaną z błonami fosfoproteiną o aktywności polimerazy RNA zależnej od RNA.

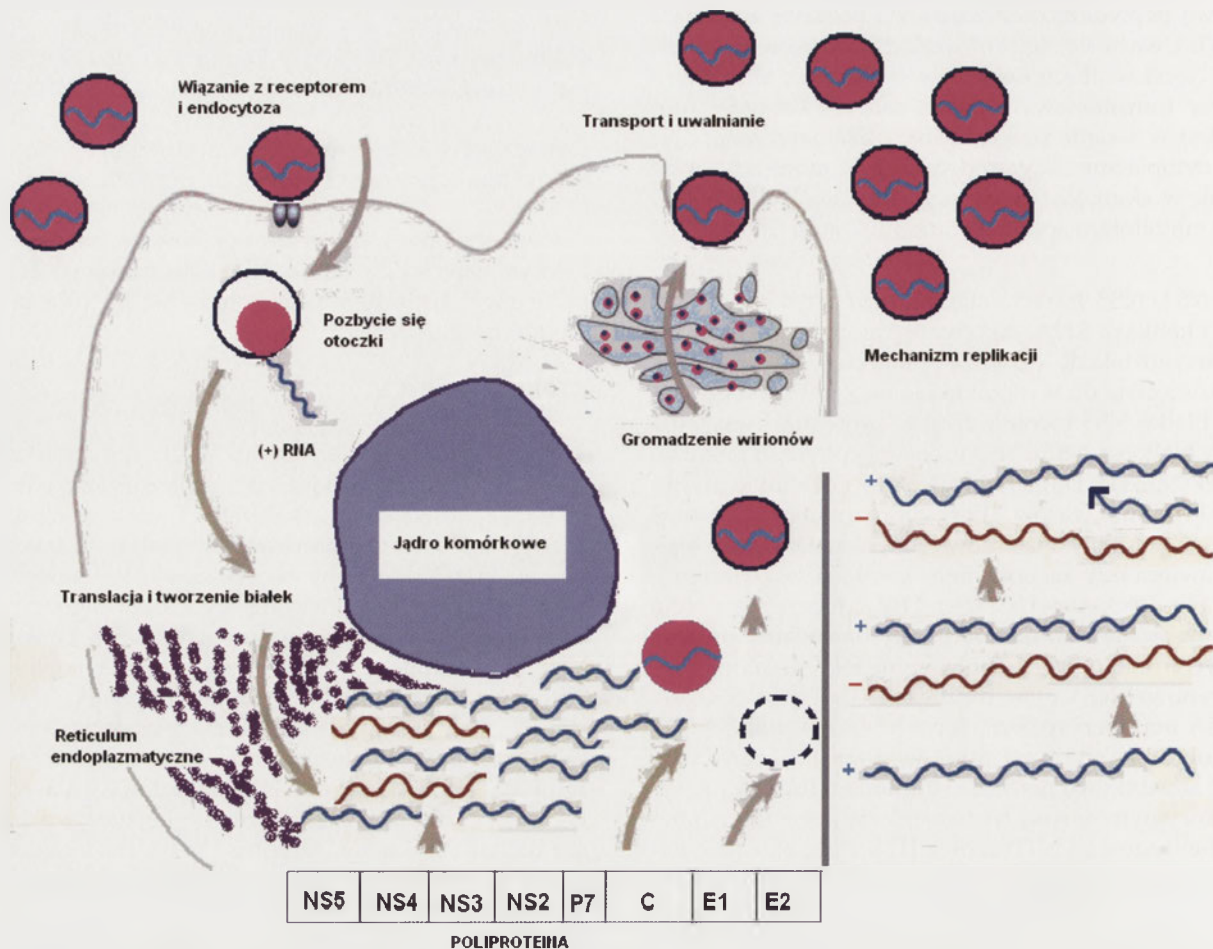
Ze względu na znaczny polimorfizm genetyczny HCV, wyróżniono kilka jego genotypów i podtypów. Podstawą dokonanej klasyfikacji były konserwatywne regiony genu wirusa, głównie kodujące białka C, E1 i NS5. Dotychczas wyodrębniono 6 podstawowych genotypów HCV (oznaczonych kolejnymi cyframi arabskimi) i ponad 50 podtypów (oznaczonych kolejnymi literami alfabetu).

Genotypy 1a i 1b występują powszechnie w Stanach Zjednoczonych i Zachodniej Europie, genotypy 4, 5 i 6 dominują w Egipcie, Republice Południowej Afryki, południowo-wschodniej Azji.

REPLIKACJA HCV

Ze względu na brak modelowych systemów eksperymentalnych nasza wiedza na temat rozwoju i przebiegu ostrych i przewlekłych zakażeń HCV jest dość ograniczona. Z dotychczasowych obserwacji wynika, że w trakcie wirēmii, w ciągu jednej doby tworzy się ok. 10^{12} nowych wirionów, których okres półtrwania wynosi 2,7–5 godzin. Mimo, że z perspektywy całego organizmu liczba ta wydaje się być olbrzymia, to jednak w przeliczeniu na jedną komórkę ulega ona istotnej redukcji. Jeśli przyjąć, że ok. 10% hepatocytów jest zakażonych HCV oraz, że wątroba zawiera ok. 2×10^{11} komórek, to stężenie nowych wirionów wynosi 50 sztuk na komórkę. Jeszcze kilka lat temu wydawało się, że HCV wykazuje tropizm jedynie do hepatocytów, późniejsze badania pokazały, że wirusy te można znaleźć w limfocytach, komórkach nabłonkowych jelita, szpiku kostnym czy w ośrodkowym układzie nerwowym [16–19]. Jednak to hepatocyt pozostaje głównym miejscem replikacji wirusa i oddziaływań z gospodarzem (Ryc. 2).

Dotychczas nie udało się opracować odpowiedniego systemu komórkowego lub zwierzęcego umożliwiającego efektywną replikację HCV. Obecnie szympanś jest głównym modelem badawczym umożliwiającym analizę zarówno przebiegu zakażenia jak i rozwoju choroby (podobieństwo pomiędzy genomem człowieka a szympanśa wynosi ok. 98,5%). Chociaż przebieg wirusowego zapalenia wątroby typu C (wzw C) u szympanśów jest łagodniejszy, to model ten umożliwia analizę wirēmii, odpowiedzi serologicznej, biochemicznej czy zmian patomorfologicznych w wątrobie. Przewlekłe zakażenie rozwija się tylko u ok. 30% do 50% zakażonych szympanśów, natomiast dotyka aż 70%–80% zainfekowanych ludzi. Stworzono również alternatywne modele umożliwiające badanie replikacji HCV *in vivo*. Jednym z nich są transgeniczne myszy, innym chińskie ryjówki (*Tupaia belangeri chinensis*) z prowincji Yunnan. Ostatnio udało się uzyskać częściową replikację HCV w liniach komórkowych raka wątroby HuH7. Jednak, podobnie jak to miało miejsce w przypadku badań nad przewlekłym zapaleniem wątroby typu C, brak odpowiednich systemów doświadczalnych uniemożliwia szczegółowe badania cyklu replikacyjnego HCV. Dodatkowych informacji na temat replikacji HCV dostarczają prowadzone *in vitro* badania poszczególnych białek wirusowych otrzymanych na drodze ekspresji w komórkach bakteryjnych lub owadziach [20]. Jednak pierwszy znaczący postęp dokonany został dzięki zastosowaniu heterologicznych systemów umożliwiających



Rycina 2. Cykl życiowy HCV.

ekspresję pojedynczych białek wirusowych [21] czy replikonów [22-23] lub funkcjonalnych pseudocząstek HCV [24-25]. Ostatnio wielkim sukcesem było stworzenie infekcyjnych cząstek HCV w kulturze komórkowej [26-27]. Uzyskano wysoce skuteczny pod względem infekcyjności system *in vitro* zdolny do produkcji 10^4 - 10^5 cząstek wirusowych na ml supernatantu. Opracowano warunki umożliwiające rozprzestrzenianie się wirusa w kulturze komórkowej i jego pasażowanie. Obecnie zakłada się, że replikacja HCV zachodzi analogicznie jak u pokrewnych wirusów RNA, czyli w cytoplazmie. Najpierw dochodzi do łączenia się wirusa z receptorami umiejscowionymi na powierzchni wrażliwych komórek. Jak dotąd, zidentyfikowano trzy receptory HCV. Pierwszym jest cząsteczka CD81, która łączy się z glikoproteiną E2, następnymi receptory LDL (ang. *low density lipoprotein*) oraz VLDL (ang. *very-low-density lipoprotein*). Ostatnio doniesiono o kolejnym receptorze HCV, należącym do rodziny tzw. resztkowych „zmiataczy” (ang. *human scavenger receptor class B type I*) [28]. Uważa się, że samo związanie się glikoproteiny E1 i E2 z receptorem umożliwia wejście wirusa do komórki, nie ma jednak dowodu na to, że zawsze inicjowana jest infekcja. Rola białka E1 w procesie łączenia wirusa z komórką nie jest poznana, wiadomo jedynie, że sama glikoproteina E2 nie wystarcza do rozpoznania wrażliwych komórek. Po wnikięciu wirusa na drodze endocytozy, następuje pozbycie się osłonki i uwolnienie dodatniej nici RNA. Translacja genomowej cząsteczki RNA jest zależ-

na od usytuowanej na końcu 5' sekwencji IRES (ang. *internal ribosome entry site*), która łączy się z podjednostkami 40S rybosomów. Kompleks ten uzupełniony o czynnik inicjujący syntezę białek eIF3 (ang. *eukaryotic initiation factor*) oraz inicjatorowy tRNA, łączy się z dużą jednostką rybosomalną 80S. W rezultacie rozpoczęta zostaje synteza poliproteiny, z której uwalniane są funkcjonalne białka wirusowe. Nici (-)RNA ponownie przepisywane są przez polimerazę na nici (+)RNA, która służy zarówno jako genom wirusowy jak i matryca do syntezy białek. Wiriony HCV prawdopodobnie formują się w siateczce śródplazmatycznej. Dojrzałe cząstki uwalniane są z komórki przez pączkowanie.

LEKI STOSOWANE W TERAPII PRZEWLEKŁEGO ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C

Interferony stanowią grupę cytokin wytwarzanych i uwalnianych przez komórki w odpowiedzi na zakażenie wirusami, pod wpływem antygenów czy polinukleotydów, odgrywają wiodącą rolę w odporności przeciwwirusowej. Zostały odkryte przez Isaacs i Lindemanna w 1957 roku. Wykazują działanie przeciwwirusowe, antyproliferacyjne i immunomodulujące [29].

Komórki człowieka wytwarzają pięć podstawowych rodzajów interferonów: α , β , κ , ω , γ . Dawniej dzielono je na typ I i II. Interferony typu I (α , β , κ , ω) wytwarzane są

przede wszystkim przez traktowane wirusem leukocyty – interferon α (IFN α), keratynocyty – interferon κ (IFN κ) lub fibroblasty – interferon β (IFN β). Natomiast interferony typu II – interferon γ (IFN γ), czyli immunologiczne, wytwarzane są przez limfocyty T traktowane antygenami, cytokinami lub mitogenami, przez komórki NK, NKT i w niewielkich ilościach przez aktywowane makrofagi. Organizm człowieka wytwarza ponad dwadzieścia rodzajów interferonów α (określanych dodatkową liczbą arabską, np. IFN- α 1, IFN- α 2) i po jednym rodzaju interferonów β , κ , ω , γ . Naturalny IFN- α jest zatem mieszaniną wielu podtypów i może mieć właściwości nieco odmienne od „rekombinowanego” IFN- α , który składa się z identycznych cząsteczek należących do jednego podtypu. Interferony nie wykazują bezpośredniego działania przeciwwirusowego, ale wytworzone pod wpływem wirusów, oddziałują na inne komórki indukując w nich powstanie czynników przeciwwirusowych i „stanu gotowości przeciwwirusowej”. Warunkiem działania interferonów jest połączenie ze swoistymi receptorami. IFN- α wiąże się z receptorem zbudowanym z podjednostek IFNAR-1 i IFNAR-2. Liczba receptorów jest różna dla poszczególnych komórek i waha się od 2×10^2 do 6×10^3 . Działanie interferonów związane jest z aktywacją przez nie różnych genów, zwanych genami stymulowanymi przez interferon (ISG, ang. *IFN-stimulated genes*), których wzmożoną transkrypcję obserwuje się już po 5–10 minutach od zadziałania interferonu. Po związaniu się interferonu z receptorem w błonie komórkowej dochodzi do aktywacji tyrozynowych kinaz białkowych – TYK2 i JAK1 [30]. Kinazy te fosforylują różne białka, które następnie łączą się ze sobą, przechodzą do jądra komórkowego i poprzez utworzenie czynnika transkrypcyjnego, a następnie połączenie się ze specyficzną sekwencją regulatorową, zwaną regionem odpowiedzi stymulowanej przez interferon (ISRE, ang. *interferon-stimulated response element*), aktywują ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję białek efektorowych. Wśród białek efektorowych najważniejsza jest kinaza białkowa (PKR, ang. *protein kinase R*), której aktywność pod wpływem interferonu wzrasta 20 razy i 2,5-oligoadenylosyntetaza (2',5'-OAS, 2',5'-oligoadenylate synthase). Aktywność tej ostatniej, pod wpływem interferonu, wzrasta 50–100 razy i w obecności dwuniciowego RNA indukuje powstanie oligonukleotydów adenylanowych aktywujących latentną endorybonukleazę-RNazę L przyspieszającą degradację mRNA wirusa. Kinaza białkowa ulega autofosforylacji i fosforyluje białka komórkowe, wśród których wiele bierze udział w replikacji wirusów. W rezultacie zostaje zahamowana translacja i synteza białek wirusowych [31]. Kolejnym mechanizmem przeciwwirusowym indukowanym przez IFN- α i IFN- β jest aktywacja genu Mx, który jest obecny w komórkach wszystkich ssaków. Produkt tego genu hamuje drastycznie, w nieznanym sposobie, replikację przede wszystkim wirusa grypy i niektórych innych wirusów RNA. Jednocześnie oba powyższe interferony działają najefektywniej przeciwwirusowo w całej swej grupie. W przypadku niektórych wirusów, interferon hamuje ich wiązanie z komórkami, penetrację, a także uwalnianie nukleokapsydu z otoczki. Jak widać interferon indukuje w komórce różnorodne mechanizmy przeciwwirusowe. Wydaje się, że czynniki indukowane przez interferon mogą hamować tempo zakażenia komórki przez wirusy, a także interferują z replikacją wirusów na pozio-

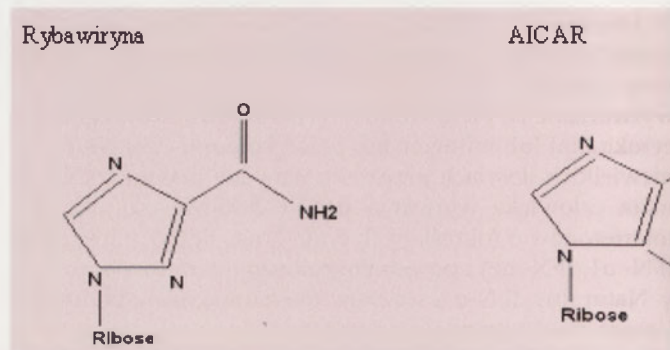
mie transkrypcji i translacji oraz utrudniają formowanie się wirionów. Należy pamiętać, że przeciwwirusowe działanie interferonu zależy częściowo także od ich wpływu na układ odpornościowy. Wzmagają one np. fagocytozę, ekspresję niektórych cząsteczek i receptorów powierzchniowych, aktywność komórek cytotoksycznych (komórek K, NK, limfocytów T cytotoksycznych) zdolnych do zabicia własnych komórek zakażonych przez wirusy, a także wzmagają cytotoksyczną i fagocytarną aktywność makrofagów oraz ekspresję cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej, indukują ekspresję innych cytokin (np. IL-1, IL-6, TNF itd.). Poza tym interferony hamują proliferację i indukują różnicowanie wielu komórek, najefektywniej w tym względzie działa IFN- γ . Interferony ze względu na swe działanie antyproliferacyjne są inhibitorami krwiotworzenia, z drugiej strony stymulują, głównie IFN- γ , różnicowanie komórek szeregu mieloidalnego w kierunku monocytów. Działanie przeciwnowotworowe jest wynikiem hamowania replikacji wirusów onkogennych, ale przede wszystkim hamowania proliferacji i pobudzania różnicowania komórek nowotworowych. Rzadziej interferony bezpośrednio oddziałują cytotoksycznie na komórki nowotworowe. Istotną rolę przeciwnowotworową odgrywają poprzez zwiększoną ekspresję antygenów nowotworowych i hamowanie powstawania naczyń w obrębie zmiany oraz poprzez modulację procesów dojrzewania i różnicowania komórek immunokompetentnych (głównie aktywacja makrofagów poprzez IFN- γ).

Ze względu na swe liczne zalety interferon zaczęto stosować w terapii. Jednak do końca lat 70-tych, jego kliniczne zastosowanie było ograniczone, głównie z powodu małej dostępności leku. W latach 60-tych opracowano bardzo czasochłonną i kosztowną metodę uzyskiwania interferonu poprzez inkubację leukocytów człowieka pochodzących z krwi dawców z wirusem *Sendai*. Uzyskiwany produkt był mieszaniną różnych interferonów, był oczyszczany tiocyjanianem potasowym, lecz nadal zawierał inne białka. Wytwarzaniem pierwszych interferonów zajmował się fiński badacz Kari Cantell. Około 10 lat później opracowano inny sposób otrzymywania interferonu. Naukowcy z Wellcome Research Laboratories w Beckenham uzyskali interferon limfoblastoidalny z hodowli komórek z linii Namalwa po stymulacji wirusem *Sendai*. Był on mieszaniną 22 podtypów. W 1980 roku zastosowano do produkcji interferonu metodę rekombinacji genetycznej, gdzie komórki *Escherichia coli* zostały transformowane plazmidem niosącym gen kodujący interferon. Metoda ta umożliwiła masową produkcję preparatu. Interferon jako białko o właściwościach antygenowych może indukować powstawanie przeciwciał neutralizujących, zwłaszcza przy długotrwałym stosowaniu. Trudno jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie czy pojawianie się przeciwciał neutralizujących ma związek z odpowiedzią na leczenie przeciwwirusowe [32]. Zauważono, że częstość pojawiania się przeciwciał neutralizujących zależy od rodzaju stosowanego IFN- α [33]. Rekombinowany IFN- α 2 obejmuje trzy podtypy: 2a, 2b i 2c różniące się między sobą sekwencją aminokwasów. Skuteczność IFN- α w leczeniu pzw C ograniczona jest właściwościami cząsteczki białkowej, m.in. jej niestabilnością, krótkim okresem półtrwania i immunogennością. Okres półtrwania IFN- α wynosi 4–16 godzin, a stężenie maksymalne w surowicy krwi po podaniu domięśniowym lub podskórnym osiągnięte jest po 3–8 godzinach.

W 24 godziny po podaniu domięśniowym poziom IFN- α w surowicy jest bardzo niski lub niewykrywalny. Właściwości IFN- α pociągają za sobą szereg konsekwencji. Między innymi konieczność utrzymania w surowicy krwi stężenia terapeutycznego leku jest związana z częstym podawaniem tego preparatu. W leczeniu przewlekłego zapalenia wątroby typu C standardowe podawanie IFN- α polega na trzykrotnych iniekcjach w ciągu tygodnia, ale nawet przy zachowaniu tego schematu obserwuje się duże wahania stężenia leku w surowicy po każdym podaniu. Jednocześnie maksymalnym stężeniem leku odpowiada duża częstość występowania takich działań niepożądanych jak: gorączka, dreszcze, bóle głowy, bóle mięśniowe, zawroty głowy [34]. Z drugiej strony występują okresy jego braku w surowicy, a to oznacza brak supresji wirusa i możliwość jego ponownej replikacji. Obecnie w leczeniu zakażeń HCV stosuje się: rekombinowane IFN- α (jak wyżej wspomniano różnią się składem aminokwasów), consensus IFN (mieszanka IFN- α , IFN- β , IFN- ω), naturalny IFN- α z leukocytów człowieka oraz pegylowany IFN- α . Pegylacja była kolejnym etapem mającym na celu zwiększenie skuteczności leczenia przeciwwirusowego. Glikol polietylenowy (Peg) jest stabilnym polimerem służącym do modyfikacji właściwości cząsteczek. Zmodyfikowane za jego pomocą białka wykazują szereg zalet terapeutycznych: wydłużenie okresu półtrwania poprzez obniżenie klirensu nerkowego i komórkowego, zwiększoną ochronę przed proteolizą, a także zmniejszenie toksyczności, antygenowości, zwiększenie stabilności termicznej i mechanicznej [35]. Tak więc, celem pegylacji białek jest poprawa właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych, przy zachowaniu ich aktywności biologicznej. Glikol polietylenowy jest polimerem składającym się z powtarzających się podjednostek tlenku etylenu, każda jednostka tlenku etylenu jest silnie związana z 2–3 cząsteczkami wody. Powoduje to powstanie wokół cząsteczki pegylowanego białka ochronnej warstwy zabezpieczającej przed opsonizacją, fagocytozą i endocytozą oraz przed proteolizą (chymotrypsyną i tripsyną).

Początkowo w leczeniu pzw C stosowano IFN α – tzw. monoterapię interferonową. Uzyskiwane wówczas efekty terapeutyczne, polegające na eliminacji wirusa i normalizacji aktywności aminotransferaz były niesatysfakcjonujące. Mimo różnych modyfikacji leczenia IFN- α , a więc dłuższego stosowania leku, zwiększenia jego dawki przez całą terapię lub inicjująco tylko na początku przez kilka pierwszych tygodni, nie uzyskiwano zadowalających efektów. W rezultacie zaczęto stosować terapię skojarzoną, dołączono do IFN- α rybawirynę.

Rybawiryna jest analogiem nukleozydowym – 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamid. Jej struktura nie przypomina żadnego z naturalnych nukleozydów, ale ma podobną strukturę do AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamid- β -D-ribosid), biosyntetycznego prekursora purynowego, który jest pośrednikiem w syntezie *de novo* nukleotydy purynowych. Zazwyczaj tego typu składniki są prolekami, które muszą być zamienione na metabolity nukleozydowe, aby osiągnąć aktywność przeciwwirusową. Większość wirusów nie wytwarza enzymów, które są konieczne do aktywacji analogów nukleozydowych. Dlatego do tego procesu wykorzystywane są enzymy metaboliczne purynowe lub



Rycina 3. Budowa rybawiryny i AICAR

pirymidynowe gospodarza i w efekcie dochodzi do zamiany na nukleotydy hamujące replikację wirusa (Ryc. 3).

Rybawiryna została po raz pierwszy zsyntetyzowana w 1972 roku. Wykazuje ona przeciwwirusowe działanie wobec różnych rodzin wirusów RNA: *Paramyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae*, *Reoviridae*, *Bunyaviridae*. Rybawiryna wykazuje również działanie w kulturach komórkowych wobec niektórych wirusów DNA. Jest aktualnie stosowana u ludzi do leczenia pzw C w połączeniu z IFN- α , a w monoterapii w leczeniu gorączki Lassa i zakażeń spowodowanych wirusem RS (HRSV – syncytialny wirus oddechowy człowieka, ang. *human respiratory syncytial virus*). Zainteresowanie wzbudził fakt, że jest ona efektywna wobec wirusów niezwiązanych, należących do trzech odrębnych rodzin. Wkrótce po odkryciu rybawiryny zasugerowano, że jej dość obszerne spectrum działania przeciwwirusowego polega na zahamowaniu dehydrogenazy monofosforanu inozyny (IMPDH, ang. *inosine monophosphate dehydrogenase*). W efekcie dochodzi do spadku wewnątrzkomórkowego poziomu GTP, a to pociąga za sobą ograniczenie replikacji wirusowych genomów. Z jednej strony mechanizm ten wyjaśnia szerokie spectrum działania przeciwwirusowego rybawiryny, jednak nie jest on najważniejszy i mimo wszystko nie jest wystarczający. Pewnym wyjaśnieniem tej zagadki była koncepcja działania rybawiryny jako immunomodulatora. Badania prowadzone na myszach i zaobserwowano, że rybawiryna wpływa na poziom IL-10 obniżając go. Jednak immunomodulacyjne działanie rybawiryny jest niewielkie w stosunku do jej efektu przeciwwirusowego. „Śmiertelna mutagenesa” lub inaczej „katastrofa z nadmiaru błędów” okazała się być najważniejszym mechanizmem działania rybawiryny [36]. Udowodniono tę tezę na podstawie badań nad wpływem rybawiryny i jej dawki na pojawianie się mutacji wirusa polio, gdzie rybawiryna poprzez polimerazę RNA zależną od RNA jest wbudowywana do genomu jako analog GTP lub ATP, a w kolejnych cyklach w jej miejsce zostaje wprowadzony dowolny nukleotyd [37]. Skuteczność rybawiryny jako mutagenu wirusowego RNA może być również uzależniona od jej kumulacji w różnych tkankach, np. w wątrobie przy podaży doustnej lub w nabłonku oddechowym przy stosowaniu aerozoli. Różnice w skuteczności działania mogą wynikać z różnego tempa włączenia rybawiryny przez polimerazy RNA zależne od RNA do genomów poszczególnych wirusów, być może istnieją różne mechanizmy działania tego leku na poszczególne wirusy RNA.

Świadczyć o tym może fakt, że rybawiryna nie znalazła zastosowania jako lek stosowany w monoterapii pzw C. Okazało się, że pozytywnie wpłynęła, po 24 tygodniach lub 12 miesiącach stosowania, na aktywność aminotransferaz i zmiany histopatologiczne w wątrobie, lecz pozostała bez wpływu na wiramię HCV. Dobre efekty stosowania rybawiryryny w zakażeniach wirusem gorączki Lassa oraz RSV być może są wynikiem leczenia ostrej a nie chronicznej infekcji. Mimo wszystko, jak dotąd, trudno wyjaśnić to zjawisko. Istotne jest, że rybawiryra nie powoduje mutacji genu człowieka [36-37]. W połączeniu z IFN- α została rekomendowana do leczenia pzw C w wielu krajach. Od 1999 roku leczenie IFN- α i rybawiryryną jest obowiązującym schematem postępowania z chorymi na pzw typu C w Europie. Najnowsze doniesienia pokazują, że wprowadzenie do leczenia pzw C pegylowanego IFN- α podawanego raz w tygodniu w skojarzeniu z rybawiryryną stosowaną codziennie pozwala uzyskać pełne zahamowanie replikacji HCV u 50-59% chorych ludzi [38-40].

OPORNE NA LECZENIE MUTANTY HCV

Głównym źródłem zmienności genetycznej HCV jest nieprecyzyjna replikacja genomowych cząsteczek RNA. W efekcie generowane są nowe warianty wirusowe mogące wymykać się spod kontroli immunologicznej. Wpływ na to zjawisko ma m.in. brak mechanizmu korygującego błędy polimerazy RNA. W związku z tym krążące we krwi cząstki HCV są mieszaniną różnych pseudotypów HCV, czyli tworzą tzw. quasi-gatunek. Różnica w składzie nukleotydowym pomiędzy poszczególnymi wariantami wchodzącymi w skład quasi-gatunku dochodzi do 5%. Nowopowstałe mutanty są z opóźnieniem rozpoznawane przez układ immunologiczny i tym samym nieustannie wymykają się spod jego kontroli. Istnieje jednak czynnik ograniczający zakres możliwych mutacji, jest nim ciśnienie selekcyjne decydujące, które z powstałych wariantów mogą kumulować się w zainfekowanej komórce, zakażać nowe komórki i dalej ulegać replikacji. W organizmie chorego trwa zatem ciągła selekcja najlepiej dostosowanych wariantów wirusowych. Końcowy rezultat tego procesu zależy od wielu czynników, między innymi od sprawności systemu immunologicznego, czy stosowanego leku.

W ostatnich latach pojawiły się liczne doniesienia wskazujące na istnienie wariantów HCV opornych na stosowane leki. Pokazano, że powstanie odpowiednich mutacji w niestrukturalnym białku NS5A może prowadzić do braku wrażliwości wirusa na terapię interferonową. Znalezienie tych mutacji było możliwe dzięki wcześniejszej identyfikacji rejonu NS5A wpływającego na odpowiedź interferonową (ISDR, ang. *interferon sensitivity determining region*; reszty aminokwasowe 2209 do 2248) [41-42]. Jednak problem istnienia korelacji pomiędzy obecnością określonej mutacji w regionie ISDR a opornością na interferon nadal budzi wiele kontrowersji. Przytoczone powyżej informacje dotyczyły pacjentów pochodzących z Japonii. Przedstawione w nich rezultaty nie znalazły potwierdzenia w kilku badaniach prowadzonych w Europie Zachodniej [43-45]. Pawlotsky i wsp. [46] scharakteryzowali szereg mutacji występujących w białku NS5A u pacjentów zakażonych genotypem 1b leczonych interferonem. Uznano, że opor-

ność HCV-1b na interferon jest raczej związana z kinetyką wirusowej replikacji, niespecyficznymi złożonymi mutacjami oraz odpowiedzią immunologiczną gospodarza, a nie z określonymi zmianami w obrębie NS5A. Wydaje się raczej, że białko to poprzez włączenie do kompleksu polimerazy odgrywa krytyczną rolę w regulacji wirusowej replikacji [46]. Kolejne lata przyniosły nowe spostrzeżenia i hipotezy. Obecnie uważa się, że oporność na interferon niekoniecznie zależy od obecności lub nieobecności mutacji w ISDR. Być może inne regiony białka NS5A, położone na zewnątrz ISDR mogą być także włączone w mechanizm oporności na interferon, na przykład mutacje w obrębie domeny odpowiedzialnej za wiązanie kinazy białkowej (PKR) czy w zmiennej domenie V3 [47]. Analiza całej sekwencji kodującej NS5A, pozwoliła stwierdzić, że bardziej zróżnicowane genetycznie są izolaty uzyskane z krwi pacjentów, którzy odpowiedzieli na leczenie [48-49]. Ostatnio pojawiły się także doniesienia informujące o istotnej roli białka E2 w powstawaniu oporności na interferon, jednak w kilku innych pracach przedstawiono wyniki podważające ich prawdziwość [49-50].

Niezwykle ciekawe spostrzeżenia przyniosły ostatnie prace, w których testowano hipotezę, że rybawiryra działa jako mutagen. Zauważono, że obecność rybawiryryny wyraźnie uprzywilejowuje substytucje A do G i U do A. Ponadto zauważono, że w białku NS5B pojawiają się niezwykle często, istotne z klinicznego punktu widzenia, mutacje polegające na zamianie aminokwasu 415 z Phe do Tyr (F415Y). W obecności białka NS5B415F dochodziło do zmniejszenia wydajności replikacji HCV RNA. Wydaje się zatem, że drugi mutant NS5BF415Y reprezentuje wariant oporny na rybawiryrynę [51]. W ostatnim czasie zidentyfikowano w NS5B dwie kolejne mutacje bezpośrednio związane z ogromnym spadkiem wirerii podczas terapii skojarzonej (interferonem i rybawiryryną). Stwierdzono ponadto, że mutacje te, tj. substytucja kwasu glutaminowego do lizyny w pozycji 124 (E124K) oraz izoleucyny do waliny w 85 pozycji (I85V), mogą u pacjentów z genotypem 1b i wysoką wiramię umożliwić prognozowanie skuteczności terapii skojarzonej [52].

NOWE KIERUNKI TERAPII PRZEWLEKŁEGO ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C

Obecnie w trakcie badań klinicznych są leki tzw. II generacji. Należą tutaj preparaty skierowane wybiórczo przeciwko dobrze poznanym morfologicznie i czynnościowo białkom niestrukturalnym HCV, które jednocześnie są enzymami biorącymi udział w cyklu replikacyjnym HCV. Przykładem są preparaty blokujące aktywność proteazy kompleksu NS3/NS4A, inhibitory helikazy w obrębie NS3 czy leki działające na białko NS5B. Idea działania leków tzw. III fazy polega z kolei na celowanym ataku na struktury białkowe mało dotąd poznane, np.: NS5A, NS4B, p7, NS2 itd. Odmianą możliwością terapeutyczną jest wpływ na niektóre enzymy komórkowe, co pośrednio może utrudniać replikację HCV oraz stymulacja niektórych genów komórkowych (IRF-3), która może modulować odpowiedź antywirusową [53]. Istnieją jeszcze inne drogi poszukiwań do szczepionek terapeutycznych włącznie.

PIŚMIENICTWO

- Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S (1965) A new antigen in leukemic sera. *J Am Med Assoc* 191: 541-546
- Shimizu YK, Feinstone SM, Purcell R, Alter HJ, London WT (1979) Non-A, non-B hepatitis: ultrastructural evidence for two agents in experimentally infected chimpanzees. *Science* 205: 197-200
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362
- Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE (1989) An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244: 362-364
- Smith DB, Mellor J, Jarvis LM, Davidson F, Kolberg J, Urdea M, Yap PL, Simmonds P (1995) Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol* 76: 1749-1761
- Ray RB, Steele R, Basu A, Meyer K, Majumder M, Ghosh AK, Ray R (2002) Distinct functional role of Hepatitis C virus core protein on NF-kappaB regulation is linked to genomic variation. *Virus Res* 87: 21-29
- Forns X, Purcell RH, Bukh J (1999) Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends Microbiol* 7: 402-410
- Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM (1999) Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285: 107-110
- Perez-Berna AJ, Moreno MR, Guillen J, Bernabeu A, Villalain J (2006) The membrane-active regions of the hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins. *Biochemistry* 45: 3755-3768
- Orland JR, Wright TL, Cooper S (2001) Acute hepatitis C. *Hepatology* 33: 321-327
- Yamada K, Mori A, Seki M, Kimura J, Yuasa S, Matsuura Y, Miyamura T (1998) Critical point mutations for hepatitis C virus NS3 proteinase. *Virology* 246: 104-112
- Neddermann P, Clementi A, De Francesco R (1999) Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein. *J Virol* 73: 9984-9991
- Gale M Jr, Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, Tang NM, Korth MJ, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG (1998) Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 18: 5208-5218
- Zeuzem S, Schmidt JM, Lee JH, von Wagner M, Teuber G, Roth WK (1998) Hepatitis C virus dynamics in vivo: effect of ribavirin and interferon alfa on viral turnover. *Hepatology* 28: 245-252
- Lindenbach BD, Rice CM (2001) Flaviviridae: the viruses and their replication. W: Knipe DM, Howley PM (red) *Fields Virology*, t. 1, 4 edycja. Lippincott-Raven, Philadelphia, str. 991-1041
- Deforges S, Evlashev A, Perret M, Sodayer M, Pouzol S, Scoazec JY, Bonnaud B, Diaz O, Paranhos-Baccala G, Lotteau V, Andre P (2004) Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo. *J Gen Virol* 85: 2515-2523
- Forton DM, Karayiannis P, Mahmud N, Taylor-Robinson SD, Thomas HC (2004) Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *J Virol* 78: 5170-5183
- Radkowski M, Wilkinson J, Nowicki M, Adair D, Vargas H, Ingui C, Rakela J, Laskus T (2002) Search for hepatitis C virus negative-strand RNA sequences and analysis of viral sequences in the central nervous system: evidence of replication. *J Virol* 76: 600-608
- Radkowski M, Kubicka J, Kisiel E, Cianciara J, Nowicki M, Rakela J, Laskus T (2000) Detection of active hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C replication in bone marrow in human subjects. *Blood* 95: 3986-3989
- Bartenschlager R, Lohmann V (2000) Replication of hepatitis C virus. *Journal of General Virology* 81: 1631-1648
- Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM (1997) Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 277: 570-574
- Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285: 110-113
- Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM (2000) Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290: 1972-1974
- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197: 633-642
- Lindenbach BD, Rice CM (2005) Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436: 933-938
- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309: 623-626.
- Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9294-9299
- Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocomo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21: 5017-5025
- Baron S, Dianzani F (1994) The interferons: a biological system with therapeutic potential in viral infections. *Antiviral Res* 24: 97-110
- Yang CH, Murti A, Valentine WJ, Du Z, Pfeffer LM (2005) Interferon alpha activates NF-kappaB in JAK1-deficient cells through a TYK2-dependent pathway. *J Biol Chem* 280: 25849-25853
- Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M (1994) Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264: 1918-1921
- Hou C, Chuang WL, Yu ML, Dai CY, Chen SC, Lin ZY, Hsieh MY, Wang LY, Tsai JF, Chang WY (2000) Incidence and associated factors of neutralizing anti-interferon antibodies among chronic hepatitis C patients treated with interferon in Taiwan. *Scand J Gastroenterol* 35: 1288-1293
- Figlerowicz M, Machowska L, Nowicki J, Kowala-Piaskowska A, Mazer-Lisewska I, Służewski W (2004) Endo- i egzogeny interferon α oraz przeciwciała przeciwinterferonowe w surowicy krwi dzieci w przebiegu leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu B. *Pediatr Pol* 79: 507-512
- Arnaud P (2002) The interferons: pharmacology, mechanism of action, tolerance and side effects. *Rev Med Interne* 23: 449-458
- Wang YS, Youngster S, Grace M, Bausch J, Bordens R, Wyss DF (2002) Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 547-570
- Crotty S, Cameron CE, Andino R (2001) RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6895-6900
- Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, Andino R, Cameron CE (2000) The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med* 6: 1375-1379
- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK (2001) Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358: 958-965
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncalves FL Jr, Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J (2002) Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347: 975-982
- Bosques-Padilla F, Trejo-Estrada R, Campollo-Rivas O, Cortez-Hernandez C, Dehesa-Violante M, Maldonado-Garza H, Perez-Gomez R, Cabrera-Valdespino A (2003) Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for treating chronic hepatitis C virus infection: analysis of Mexican

patients included in a multicenter international clinical trial. *Ann Hepatol* 2: 135-139

41. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura N, Izumi N, Marumo F, Sato C (1996) Mutations in the nonstructural protein 5a gene response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334: 77-81
42. Polyak SJ, McArdle S, Liu SL, Sullivan DG, Chung M, Hofgartner WT, Carithers RL, McMahon BJ Jr, Mullins JL, Corey L, Gretch DR (1998) Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *J Virol* 72: 4288-4296
43. Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Teuber G, Dietrich CF, Roth WK, Zeuzem S (1999) Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 30: 1004-1013
44. Sáiz JC, López-Labrador FX, Ampurdanés S, Dopazo J, Fornis X, Sánchez-Tapias JM, Rodés J (1998) The prognostic relevance of the nonstructural 5A gene interferon sensitivity determining region is different in infections with genotype 1b and 3a isolated of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 177: 839-847
45. Zeuzem S, Lee JH, Roth WK (1997) Mutations in the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon α . *Hepatology* 25: 740-744
46. Pawlotsky JM, Germanidis G, Neumann AU, Pellerin M, Frainais PO, Dhumeaux D (1998) Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol* 72: 2795-2805
47. Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Rüster B, Kronenberger B, Roth WK, Zeuzem S (2000) Mutations in the protein kinase-binding domain of the NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 1a are associated with treatment response. *J Infect Dis* 181: 432-441
48. Noursbaum J, Polyak SJ, Ray SC, Sullivan DG, Larson AM, Carithers RL, Gretch DR Jr (2000) Prospective characterization of full-length hepatitis C virus NS5A quasispecies during induction and combination antiviral therapy. *J Virol* 74: 9028-9038
49. Watanabe H, Nagayama K, Enomoto N, Itakura J, Tanabe Y, Sato C, Izumi N, Watanabe M (2003) Amino acid substitutions in PKR-eIF2 phosphorylation homology domain (PePHD) of hepatitis C virus E2 protein in genotype 2a/2b and 1b in Japan and interferon efficacy. *Hepatol Res* 26: 268-274
50. Saito T, Ito T, Ishiko H, Yonaha M, Morikawa K, Miyokawa A, Mitamura K (2003) Sequence analysis of PePHD within HCV E2 region and correlation with resistance of interferon therapy in Japanese patients infected with HCV genotypes 2a and 2b. *Am J Gastroenterol* 98: 1377-1383
51. Young KC, Lindsay KL, Lee KJ, Liu WC, He JW, Milstein SL, Lai MM (2003) Identification of ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy. *Hepatology* 38: 869-878
52. Kumagai N, Takahashi N, Kinoshita M, Tsunematsu S, Tsuchimoto K, Saito H, Ishii H (2004) Polymorphisms of NS5B protein relates to early clearance of hepatitis C virus by interferon plus ribavirin: a pilot study. *J Viral Hepat* 11: 225-228
53. Tan SL, He Y, Huang Y, Gale M Jr (2004) Strategies for hepatitis C therapeutic intervention: now and next. *Curr Opin Pharmacol* 4: 465-470

Hepatitis C virus – structure, replication and therapeutical opportunities and the phenomenon of resistance

Arleta Kowala-Piaskowska[✉]

Department of Infectious Diseases and Child Neurology, Karol Marcinkowski University of Medical Sciences, 27/33 Szpitalna St., 60-572 Poznań, Poland

[✉]e-mail : arletakp1@wp.pl

Key words: hepatitis C virus, interferon, ribavirin, mutation of HCV, genome of HCV

ABSTRACT

Genetic material of HCV consists of single-stranded RNA. Generation of HCV mutants insensitive to the immune system activity and resistant to used medications seem to be a consequence of HCV genetic variability, unusual replication potential and selection pressure of the host organism. During only one day 10^{12} of viral particles may be formed, many of which contain mutations. Selection pressure put by the immune system and used medications lead to the selection of new HCV variants insensitive to therapeutics. The aim of the study is to draw attention (by means of discussing the structure and replication of HCV) to therapeutical problems of chronic hepatitis C consisting of the biology of the virus. Clinical and laboratory factors dependent on the patient (e.g. biochemical, histopathological, genotype) were omitted.

Molekularne metody diagnostyki i oceny efektywności terapii we współczesnej hematologii pediatricznej

Małgorzata Dawidowska^{1,2,✉}

Jacek Wachowiak¹

Michał Witt^{2,3}

¹ Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej, II Katedra Pediatrii, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

² Zakład Genetyki Molekularnej i Klinicznej, Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań

³ Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa

✉ Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej, II Katedra Pediatrii, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań; e-mail: ma.dawidowska@wp.pl, tel. (061) 849 14 47

Artykuł otrzymano 27 kwietnia 2006 r.

Artykuł zaakceptowano 1 sierpnia 2006 r.

Słowa kluczowe: geny fuzyjne, minimalna choroba resztkowa, chimeryzm komórek hematopoetycznych

Wykaz skrótów: ALL (ang. *acute lymphoblastic leukemia*) – ostra białaczka limfoblastyczna; CC (ang. *complete chimerism*) – pełny chimeryzm; FISH (ang. *fluorescent in situ hybridisation*) – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*; Ig/TCR (ang. *immunoglobulin/T-cell receptor genes*) – geny kodujące receptory immunoglobulinowe limfocytów B i receptory limfocytów T; MC (ang. *mixed chimerism*) – chimeryzm mieszany; MRD (ang. *minimal residual disease*) – minimalna choroba resztkowa; PCR (ang. *polymerase chain reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy; RT-RQ-PCR (ang. *reverse transcriptase real-time quantitative polymerase chain reaction*) – reakcja odwrotnej transkrypcji w połączeniu z ilościową reakcją łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym; SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) – polimorfizm pojedynczych nukleotydów; STR (ang. *short tandem repeats*) – krótkie powtórzenia tandemowe

Podziękowania: Praca napisana w ramach realizacji projektu badawczego zamawianego PBZ-KBN-120/P05/2004 koordynowanego przez Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie oraz w ramach projektu badawczego KBN Nr 3PO5E 094 25

STRESZCZENIE

Praca stanowi przegląd metod molekularnych stosowanych współcześnie w hematologii dziecięcej do celów szeroko pojętej diagnostyki, obejmującej zarówno analizy wykonywane przy rozpoznaniu choroby i ustalaniu rokowania, jak również badania służące ocenie skuteczności zastosowanego leczenia. Zaprezentowano najważniejsze kierunki i metody badań molekularnych w hematologii pediatricznej na przykładzie identyfikacji genów fuzyjnych o znaczeniu prognostycznym oraz monitorowania poziomu minimalnej choroby resztkowej w ostrej białaczce limfoblastycznej, najczęstszej białaczce wieku dziecięcego. Przedstawiono także problematykę badań ilościowych chimeryzmu komórkowego po allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych. Prezentowane metody obejmują m.in. fluorescencyjną hybrydyzację *in situ*, reakcję odwrotnej transkrypcji, standardową i ilościową reakcję łańcuchową polimerazy oraz metody genotypowania w oparciu o analizę polimorfizmu markerów mikrosatelitarnych, polimorfizmu pojedynczych nukleotydów oraz markerów typu Indel.

WPROWADZENIE

Podstawę diagnostyki hematologicznej stanowi ocena mikroskopowa morfologii komórek krwi i szpiku kostnego, badania cytochemiczne oraz immunofenotypowanie w oparciu o cytofluorometrię przepływową. Techniki molekularne stanowią natomiast narzędzie bardziej szczegółowej diagnostyki, umożliwiając identyfikację genetycznych podtypów w obrębie zdiagnozowanego typu białaczki i klasyfikację pacjentów do grup ryzyka, w oparciu o kryteria molekularne, jak np. występowanie określonych genów fuzyjnych o znaczeniu rokowniczym. Uwzględnienie kryteriów molekularnych we współczesnej stratyfikacji leczenia hematologicznego umożliwia znacznie bardziej precyzyjne określenie grupy ryzyka, a co za tym idzie bardziej trafny dobór intensywności terapii, w porównaniu ze stratyfikacją opartą wyłącznie o klasyczne kryteria prognostyczne, jak np. odpowiedź na prednizon, uzyskanie pełnej remisji białaczki w zaplanowanym czasie, czy wstępna liczba blastów we krwi obwodowej i ich immunofenotyp [1,2]. Intensywnie rozwijająca się molekularna diagnostyka hematologiczna obejmuje także metody oceny efektywności terapii, czego przykład stanowi monitorowanie poziomu przetrwałych komórek nowotworowych (minimalnej choroby resztkowej) lub monitorowanie efektywności transplantacji komórek krwiotwórczych (analiza ilościowa chimeryzmu komórek hematopoetycznych).

W pracy przedstawiono znaczenie i metodykę analiz molekularnych we współczesnej hematologii dziecięcej, na przykładzie badań wybranych genów fuzyjnych i minimalnej choroby resztkowej w ostrej białaczce limfoblastycznej (ang. *acute lymphoblastic leukemia*, ALL), najczęstszej białaczce wieku dziecięcego, oraz potransplantacyjnego monitorowania chimeryzmu komórek hematopoetycznych.

GENY FUZYJNE W OSTREJ BIAŁACZCE LIMFOBLASTYCZNEJ

Wykrywanie genów fuzyjnych, powstających głównie na skutek translokacji wzajemnych chromosomów, stanowi ważną dziedzinę diagnostyki molekularnej białaczek. W efekcie translokacji geny położone na dwóch nie homologicznych chromosomach ulegają rearanzacji, prowadząc do powstania genu fuzyjnego i do ekspresji białek fuzyjnych o zmienionej, w stosunku do białek natywnych, funkcji biologicznej. W komórkach, w których obecne są geny fuzyjne, dochodzi do zaburzeń, które w zależności od aktywności białka fuzyjnego, pośrednio bądź bezpośrednio, odpowiedzialne są za transformację nowotworową lub odpowiedź na zastosowane leczenie (lepsze/gorsze rokowanie). Najczęściej białka fuzyjne zakłócają takie istotne dla komórki procesy, jak regulacja ekspresji genów, transdukcja sygnału, apoptoza, mechanizmy naprawcze DNA czy adhezja komórek. Pierwszą dobrze poznaną aberracją chromosomową powiązaną z wy-

stępowaniem choroby nowotworowej u człowieka był gen fuzyjny *BCR/ABL* i chromosom Philadelphia, powstające w efekcie translokacji t(9;22)(q34;q11) [3]. Jest to aberracja występująca u około 5–8% dzieci i u 20% dorosłych chorych z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL), a także u około 90% pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową (ang. *chronic myelogenous leukemia*, CML) [4]. Obecność genu fuzyjnego *BCR/ABL* jest związana z niepomyślnym rokowaniem w ALL, natomiast w CML jest lepszym czynnikiem prognostycznym niż brak tego genu. Mechanizm onkogenny białka fuzyjnego *BCR/ABL* jest dość dobrze poznany i polega głównie na konstytutywnej aktywności kinazy tyrozynowej *BCR/ABL*, prowadzącej do zaburzenia transdukcji sygnału i nadmiernej stymulacji proliferacji komórek [3]. *BCR/ABL* stanowi jednocześnie doskonały przykład wykorzystania zdobyczy biologii molekularnej do zaprojektowania strategii terapeutycznej ukierunkowanej na określony defekt molekularny. Lek o nazwie Glivec (Imatinib, STI571), który jest inhibitorem kinazy tyrozynowej *BCR/ABL*, okazał się skuteczny w blokowaniu podstawowego mechanizmu onkogennego w białaczkach Philadelphia-pozytywnych (Ph+), a dzięki względnej selektywności działa niemal wyłącznie na komórki nowotworowe, charakteryzując się niską toksycznością i wywoływaniem niewielu objawów ubocznych [3,5,6].

Kolejnymi aberracjami chromosomowymi o istotnym znaczeniu rokowniczym w ALL są rearanżacje genu *MLL* (locus 11q23) z około 50 różnymi genami położonymi na wszystkich chromosomach [7]. Rearanżacje z udziałem genu *MLL* są typowe dla ostrych białaczek o złym rokowaniu, zarówno dla ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) (około 10% chorych), ostrej białaczki szpikowej (ang. *acute myelogenous leukemia*, AML) (około 6% chorych), białaczek wtórnie występujących po chemioterapii (około 80% pacjentów), a przede wszystkim dla białaczek wieku niemowlęcego (około 80% pacjentów poniżej 1 roku życia); w nielicznych przypadkach rearanżacja genu *MLL* wiąże się z korzystnym rokowaniem [4,7]. Wpływ genów fuzyjnych z udziałem *MLL* na mechanizm leukemogenezy nie jest dokładnie poznany. Wiadomo, że produkt natywnego genu *MLL* jest istotny dla regulacji procesu apoptozy oraz ekspresji genów uczestniczących w prawidłowej proliferacji i różnicowaniu komórek hematopoetycznych [8]. Nie znaleziono natomiast znacznej homologii między genami, które ulegają fuzji z genem *MLL*, choć wiadomo, iż geny *AF4*, *AF9* i *ENL*, najczęściej ulegające rearanżacji z genem *MLL* wskutek translokacji, odpowiadają, t(4;11), t(9;11) i t(11;19), kodują czynniki aktywujące transkrypcję [7]. W przypadku niektórych genów fuzyjnych z udziałem *MLL* wykazano działanie antyapoptotyczne, co może istotnie przyczyniać się do rozplemu klonu białaczkowego [8]. Choć potencjał onkogenny białek fuzyjnych powstających z udziałem genu *MLL* nie jest do końca poznany, ich znaczenie rokownicze i wpływ na przebieg terapii stanowią o ważkości tych badań we współczesnej diagnostyce molekularnej białaczek.

Genem fuzyjnym, którego wykrycie w dziecięcej ALL jest dobrym czynnikiem prognostycznym jest gen *ETV6/RUNX1*, według starszej nomenklatury nazywany *TEL/AML1*, powstający na skutek translokacji t(12;21)(p12;q22). Translokacja ta stanowi przykład aberracji kryptycznej, tj.

często niezauważalnej w klasycznym badaniu cytogenetycznym, wykrywanej zaledwie u około 0,05% pacjentów, zaś przy pomocy technik molekularnych identyfikowanej w około 25% przypadków ALL [9,10]. Produkt białkowy genu *ETV6* jest czynnikiem transkrypcyjnym, istotnym dla hematopoetycznej aktywności szpiku kostnego, zaś *RUNX1* koduje podjednostkę α czynnika transkrypcyjnego CBF (ang. *core binding factor*), rozpoznającego motyw nukleotydowy specyficzny dla sekwencji promotorowych i wzmacniających wielu genów, w tym genów istotnych dla prawidłowego przebiegu hematopoezy [9,10]. W efekcie translokacji t(12;21) dochodzi do zaburzenia ekspresji wielu genów, normalnie podlegających regulacji czynników transkrypcyjnych CBF i *ETV6*. Ze względu na wyjątkowo dobre rokowanie związane z wykryciem tej aberracji (89–100% wyleczalności w porównaniu z około 70–80% wyleczalności ogólnie w ALL) jej identyfikacja jest kluczowa dla właściwej klasyfikacji do grupy niskiego ryzyka i odpowiedniego leczenia.

DETEKCJA I IDENTYFIKACJA GENÓW FUZYJNYCH – ODWROTNA TRANSKRYPCJA, REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY, FLUORESCENCYJNA HYBRYDYZACJA *IN SITU*

Podstawę diagnostyki aberracji chromosomowych, w tym genów fuzyjnych o ustalonym znaczeniu prognostycznym, stanowi klasyczna cytogenetyka. Wynika to przede wszystkim z możliwości całościowej analizy kariotypu i wykrycia dodatkowych nieprawidłowości chromosomowych, które również mogą wpływać na rokowanie, oraz ze stosunkowo prostej techniki i niskich kosztów badań. Podstawową wadą tej techniki jest natomiast konieczność uzyskania preparatów komórek w stadium metafazy, co w przypadku komórek nowotworowych możliwe jest zaledwie w około 60–70% przypadków [4]. Postęp w biologii molekularnej umożliwił stworzenie metod alternatywnych i uzupełniających w stosunku do klasycznego kariotypowania, które nie wymagają preparatów komórek w metafazie, charakteryzując się znaczną czułością oraz umożliwiają identyfikację aberracji kryptycznych. Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) oraz reakcja odwrotnej transkrypcji w połączeniu z PCR (ang. *reverse transcriptase polymerase chain reaction*, RT-PCR) umożliwiają wykrycie genów fuzyjnych odpowiednio na poziomie genomowego DNA i na poziomie mRNA, dzięki użyciu starterów komplementarnych do sekwencji otaczających miejsce złącza genu fuzyjnego po stronie 5' i 3'. W przypadku większości genów fuzyjnych zastosowanie znajduje RT-PCR, ze względu na udział intronów w translokacjach i rozległą lokalizację miejsc pęknięć genów ulegających fuzji, co uniemożliwia amplifikację sekwencji fuzyjnych na matrycy genomowego DNA. Jednoczesne zastosowanie kilku par starterów w wielokrotnej (multiplex) reakcji RT-PCR umożliwia szybką i relatywnie efektywną, pod względem kosztów, identyfikację najważniejszych prognostycznie genów fuzyjnych [4]. Ponadto, połączenie reakcji odwrotnej transkrypcji z ilościową reakcją PCR (ang. *reverse transcriptase real-time quantitative polymerase chain reaction*, RT-RQ-PCR) znajduje zastosowanie w monitorowaniu efektywności leczenia poprzez wykrywanie przetrwałych komórek białaczkowych (monitorowanie choroby resztkowej) [11]. Czułość metody RT-RQ-PCR wy-

nosi około 10^{-5} – 10^{-6} , co oznacza możliwość wykrycia jednej komórki nowotworowej na tle 100 000–1 000 000 komórek prawidłowych.

Alternatywną metodę detekcji genów fuzyjnych stanowi fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (ang. *fluorescent in situ hybridization*, FISH) oparta o hybrydyzację znakowanych fluorescencyjnie sond DNA, komplementarnych wobec poszukiwanych w preparacie regionów chromosomów/całych chromosomów [11]. Podstawową zaletą techniki FISH jest możliwość wykorzystania preparatów chromosomów metafazowych, a w sytuacji braku możliwości uzyskania komórek w metafazie – preparatów jąder interfazowych, co w praktyce oznacza znaczne ułatwienie techniczne. FISH jest szczególnie przydatna do identyfikacji translokacji kryptycznych oraz takich, które ze względu na rozległą lokalizację miejsc pęknięć genów, nie mogą być wykrywane techniką PCR (sondy DNA używane w technice FISH są znacznie większe niż startery do reakcji PCR). Istnieje obecnie wiele komercyjnie dostępnych zestawów sond DNA do wykrywania genów fuzyjnych techniką FISH, w oparciu o różne strategie detekcji, w zależności od lokalizacji sond. Strategia dwukolorowej FISH z zaletą sygnałów (ang. *dual color-fusion signal FISH*) wykorzystuje dwie sondy znakowane różnymi fluorochromami, z których każda jest komplementarna wobec jednego z genów tworzących gen fuzyjny; detekcja sygnału fuzyjnego w analizowanym preparacie wskazuje na występowanie fuzji genów [11]. Strategia dwukolorowej FISH z rozszczepieniem sygnału (ang. *dual color-split signal FISH*) służy detekcji genów, które ulegają fuzji z wieloma potencjalnymi „genami partnerami”, jak w przypadku rearanżacji genu *MLL* [11]. Dwie sondy, każda znakowana innym fluorochromem, komplementarne wobec sekwencji zlokalizowanych po obu stronach miejsca pęknięcia genu *MLL*, emitują sygnał fuzyjny w komórkach prawidłowych. Sygnał ulega natomiast rozszczepieniu w przypadku pęknięcia i rearanżacji genu *MLL* z jakimkolwiek innym genem. Mimo wielu zalet techniki FISH jej przydatność ogranicza się do detekcji aberracji chromosomowych w trakcie diagnozowania choroby oraz przy wystąpieniu wznowy, gdy poziomy komórek nowotworowych są wysokie. Czułość techniki FISH jest natomiast niewystarczająca dla potrzeb monitorowania minimalnej choroby resztkowej, gdyż wynosi zaledwie 10^{-2} .

W ostatnim czasie opracowana została metoda umożliwiająca nie tylko detekcję rearanżacji genu *MLL* z innym genem, ale również identyfikację „genu-partnera fuzyjnego” [7]. Metoda wykorzystuje fakt, że na skutek rearanżacji zmienia się układ miejsc trawienia enzymu restrykcyjnego w obrębie miejsca pęknięcia genu *MLL* (ang. *MLL breakpoint cluster region*, *MLL-bcr*) w porównaniu do układu miejsc restrykcyjnych w prawidłowym allelu *MLL*. Zmianę tę wykrywa się poprzez trawienie genomowego DNA odpowiednim enzymem restrykcyjnym, ligację prowadzącą do powstania kolistych fragmentów DNA obejmujących *MLL-bcr*, a następnie amplifikację kolistych produktów ligacji z użyciem kilku par starterów, generujących produkty PCR o określonej długości. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji ujawnia określony „wzór prążkowy” w przypadku niezrearanżowanych alleli genu *MLL*, a odmienny od prawidłowego w przypadku fuzji genu *MLL* z jakim-

kolwiek innym genem. Wycięcie z żelu „nietypowych” prążków, elucja DNA, sekwencjonowanie i porównanie uzyskanych sekwencji z bazami danych ludzkich genów pozwala na ostateczną identyfikację „genu-partnera fuzyjnego” *MLL*. Możliwość identyfikacji genów ulegających fuzji z *MLL*, wysoka wydajność analiz oraz możliwość użycia niewielkich ilości DNA do badań stanowią o niewątpliwych zaletach tej nowatorskiej metody i jej przydatności w diagnostyce hematologicznej.

MINIMALNA CHOROBA RESZTKOWA W ALL

Termin minimalna choroba resztkowa (ang. *minimal residual disease*, MRD) określa populację komórek nowotworowych, które nie uległy eradykacji w trakcie leczenia, a które mogą zapoczątkować wznowę choroby [12]. Leczenie ALL, prowadzone według wciąż udoskonalanych protokołów terapeutycznych, oparte jest głównie o wielolekową chemioterapię (polichemioterapia) i odbywa się etapowo. Leczenie indukujące remisję hematologiczną prowadzi w ponad 95% przypadków do ustąpienia objawów klinicznych choroby i przywrócenia prawidłowych parametrów hematologicznych. Kolejny etap intensywnej chemioterapii to leczenie konsolidujące, mające na celu dalsze obniżenie ilości komórek białaczkowych, po którym następuje leczenie reindukujące remisję. U pacjentów z grupy średniego i wysokiego ryzyka stosuje się dodatkowo bloki leczenia intensyfikującego. Przez cały okres intensywnej chemioterapii prowadzona jest profilaktyka ośrodkowego układu nerwowego (chemioterapia dokanałowa, a u dzieci z grupy wysokiego ryzyka oraz u dzieci z T-ALL dodatkowo – napromienianie mózgowia). Ostatni etap – leczenie podtrzymujące remisję – trwa co najmniej 2 lata od rozpoznania choroby, polega na doustnym podawaniu cytostatyków i realizowane jest w trybie ambulatoryjnym.

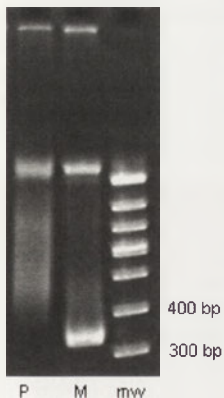
Przy użyciu mikroskopii świetlnej, standardowej techniki oceny efektywności terapii nowotworów układu krwiotwórczego po leczeniu indukującym remisję, u około 95% chorych z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL) stwierdza się remisję hematologiczną. Oznacza to, że w badaniu mikroskopowym rozmazu szpiku stwierdza się prawidłowy, tj. <5%, poziomy komórek blastycznych (niedojrzałych komórek krwiotwórczych). Jednak użycie technik o większej czułości – immunocytofluorymetrii (czułość 10^{-3} – 10^{-5}), a zwłaszcza metod molekularnych opartych o PCR (czułość 10^{-4} – 10^{-6}), pozwala na wykrycie u większości pacjentów w remisji hematologicznej obecności przetrwałych komórek nowotworowych [13–15]. Wyniki badań klinicznych wykazują znamiennej wartość prognostyczną poziomów minimalnej choroby resztkowej, oznaczanych w ciągu pierwszych trzech miesięcy leczenia ALL, najczęściej na zakończenie leczenia indukującego remisję oraz przed konsolidacją [2,16,17]. W nowoczesnych protokołach terapeutycznych ALL stanowią one podstawę klasyfikacji pacjentów do grup ryzyka i odpowiedniej stratyfikacji dalszej terapii, tj. intensyfikacji lub zmniejszenia intensywności leczenia, w zależności od grupy ryzyka, do której chorego zakwalifikowano. Istotnie przyczynia się to do poprawy wyników leczenia tej białaczki, także w przypadku dzieci leczonych z powodu wznowy [17,18].

Oznaczenia poziomu MRD wykonuje się także u pacjentów kierowanych do transplantacji komórek krwiotwórczych, ze względu na ustalony związek między przedtransplantacyjnym poziomem MRD a ryzykiem nawrotu choroby po transplantacji [19,20]. W przypadku wykrycia wysokiego poziomu przetrwałych blastów istnieje możliwość zastosowania dodatkowej chemioterapii w celu obniżenia poziomu MRD przed transplantacją.

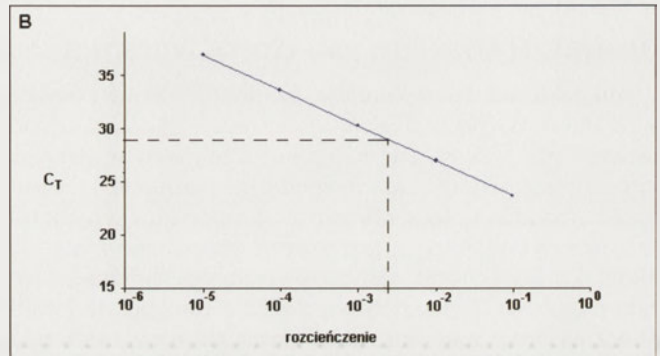
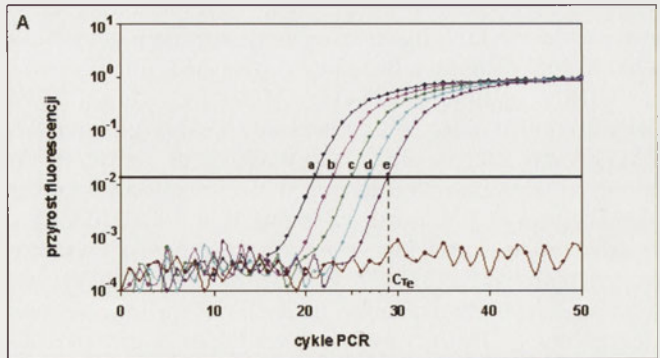
REARANŻACJE GENÓW Ig/TCR – REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY W CZASIE RZECZYWISTYM

Rearanżacje genów V-D-J (ang. V, *variable*; D, *diversity*; J, *joining*), kodujących części zmienne receptorów immunoglobulinowych limfocytów B (Ig) i receptorów limfocytów T (TCR) oraz proces insercji i delekcji przypadkowych nukleotydów na złączach V-D-J generują zmienność strukturalną receptorów limfocytarnych, a tym samym różnorodność swoistości antygenowej ludzkiego układu immunologicznego [21,22]. Efektem rearanżacji jest powstanie, unikatowych dla każdego chorego, sekwencji złącz genów V-D-J, wykorzystywanych jako markery przetrwałych komórek białaczkowych (tzw. „odciski palca” danej białaczki, czyli danego chorego). Wykrywanie tych sekwencji w ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (RQ-PCR) stanowi obecnie najbardziej rozpowszechnioną metodę monitorowania MRD w chorobach limfoproliferacyjnych [12,23]. Metoda charakteryzuje się czułością 10^{-4} – 10^{-5} i możliwością zastosowania u ponad 95% chorych. DNA wyizolowany ze szpiku kostnego chorego na etapie diagnozowania białaczki poddaje się amplifikacji w reakcji PCR z zastosowaniem kombinacji starterów, specyficznych wobec określonych rearanżacji genów Ig/TCR [24]. Dla odróżnienia klonalnych produktów amplifikacji (potencjalnych markerów komórek białaczkowych) od poliklonalnych produktów PCR (pochodzących od poliklonalnych, prawidłowych limfocytów T) najczęściej stosuje się analizę heterodupleksów. Denaturacja i powolna renaturacja produktów PCR umożliwia formowanie dupleksów, które rozdzielane są elektroforetycznie w niedenaturującym żelu poliakrylamidowym (ang. *polyacrylamide gel electrophoresis*, PAGE) [25].

Identyfikacja rearanżacji i sekwencji złącz, poprzez sekwencjonowanie klonalnych produktów PCR i analizę porównawczą sekwencji z bazami danych niezrearanżowanych genów Ig/TCR, umożliwia projektowanie starterów oligonukleotydowych, specyficznych dla każdego chorego (ang. *allele specific oligonucleotides*, ASO), które w trakcie leczenia wykorzystuje się do oznaczeń poziomu choroby resztkowej metodą RQ-PCR. W odróżnieniu od konwencjonalnej PCR, która nie jest metodą ilościową ze względu na pomiar ilości produktu wykonywany po zakończeniu reakcji (w tzw. fazie plateau), istotą technologii „real-time” jest analiza



Rycina 1. Analiza heterodupleksów. Przykład poliklonalnego (P) i monoklonalnego (M) produktu PCR. (mw) marker wielkości 100 bp.



Rycina 2. (A) Krzywe amplifikacyjne uzyskane w reakcji RQ-PCR. (C_{T_e} ang. *threshold cycle*, tj. numer cyklu PCR, w którym krzywa amplifikacyjna próby oznaczonej jako „e” przecina wartość progową fluorescencji. (B) Wartości C_T poszczególnych prób służą analizie ilościowej w oparciu o krzywą wzorcową (linią przerywaną oznaczono odczyt rozcieńczenia próby oznaczonej jako „e”).

ilości produktu PCR w fazie wykładniczej reakcji, w której przyrost ilości amplifikowanej sekwencji jest proporcjonalny do początkowej ilości sekwencji w badanej próbce. Kluczowym elementem reakcji jest sonda wyznakowana na jednym końcu fluorochromem reporterowym, emitującym sygnał fluorescencyjny, a na drugim – fluorochromem wygaszającym sygnał, komplementarna do amplifikowanej sekwencji (najczęściej stosowana technologia TaqMan). [23,26]. W czasie syntezy DNA sonda ulega rozpadowi na skutek egzonukleazowej aktywności ($5' \rightarrow 3'$) polimerazy, co powoduje wzrost intensywności emitowanej fluorescencji, odzwierciedlający przyrost ilości produktu PCR. Poziom MRD określa się na podstawie wartości C_T , od ang. *threshold cycle*, tj. na podstawie liczby cykli PCR niezbędnych do przekroczenia progowej wartości fluorescencji. Wartość C_T dla każdej próby jest proporcjonalna do ilości sekwencji markerowej w badanym materiale (im wyższy poziom komórek białaczkowych tym niższa wartość C_T). Amplifikacja DNA uzyskanego w danym punkcie czasowym leczenia odbywa się równolegle z amplifikacją serii rozcieńczeń dziesiętnych DNA uzyskanego w momencie diagnozy (próba referencyjna), w celu wykreślenia krzywej standardowej i kalkulacji poziomu choroby resztkowej.

GENY FUZYJNE – ODWROTNA TRANSKRYPCJA I REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY W CZASIE RZECZYWISTYM

Podstawową zaletą monitorowania MRD w oparciu o wykrywanie genów fuzyjnych jest wysoka czułość metody (10^{-4} – 10^{-6}) i stabilność tych markerów w przebiegu choroby, wadą natomiast ograniczone możliwości zastosowania, ze

względu na częstość występowania tych aberracji [12]. W ostrej białaczce limfoblastycznej geny fuzyjne wykrywa się u około 45% chorych z B-prekursorową ALL (monitorowanie MDR w oparciu o *BCR-ABL*, *MLL-AF4*, rzadziej *ETV6/RUNX1*) oraz u około 25% pacjentów z T-ALL (głównie *SIL-TAL1*). Geny fuzyjne służą jako markery do oznaczeń ilościowych poziomu choroby resztkowej metodą odwrotnej transkrypcji i PCR w czasie rzeczywistym (RT-RQ-PCR) na zasadzie analogicznej jak w przypadku techniki wykorzystującej rearanżację Ig/TCR. W tej jednak metodzie krzywa kalibracyjna sporządzana jest na podstawie serii rozcieńczeń plazmidowego DNA, zawierającego wklonowany określony gen fuzyjny.

CHIMERYZM KOMÓREK HEMATOPOETYCZNYCH

Allogeniczna transplantacja komórek hematopoetycznych (komórki pochodzą od spokrewnionego lub niespokrewnionego dawcy odpowiednio dobranego w zakresie antygenów głównego układu zgodności tkankowej) znajduje zastosowanie w leczeniu zarówno rozrostowych chorób układu krwiotwórczego (np. ostre i przewlekłe białaczki, chłoniaki), jak i chorób nienowotworowych (np. niedobory odpornościowe, hemoglobinopatie). Po transplantacji allogenicznej chory staje się „molekularną chimerą”, ze względu na współwystępowanie w jego organizmie komórek o dwóch różnych genotypach, dawcy i biorcy. Potransplantacyjne monitorowanie chimeryzmu hematopoetycznego polega na określaniu pochodzenia komórek krwi lub szpiku pacjenta i jest przydatne przede wszystkim w ocenie przyjęcia lub ewentualnego odrzucenia przeszczepionych komórek, jak również w ocenie ryzyka wystąpienia wznowy (w przypadku chorób nowotworowych) [27]. Zjawisko chimeryzmu może przyjmować różną postać. Wykrywanie wyłącznie komórek pochodzących od dawcy określane jest jako pełny chimeryzm (ang. *complete chimerism*, CC); współwystępowanie zarówno komórek dawcy, jak i biorcy, określane jest jako chimeryzm mieszany (ang. *mixed chimerism*, MC), natomiast wykrywanie wyłącznie własnych komórek chorego (biorcy) świadczy o braku chimeryzmu. Dopóki w badaniach potransplantacyjnych stosowano wyłącznie techniki jakościowe, wystąpienie MC uznawano za zły czynnik prognostyczny i zapowiedź wznowy. Obecnie wiadomo, że wykrycie MC może świadczyć o obecności prawidłowych komórek pacjenta, współwystępujących z komórkami dawcy, choć może być także zapowiedzią nawrotu choroby, zapoczątkowanego przez resztkowe komórki białaczkowe. Współcześnie stosowane techniki ilościowe umożliwiają nie

tylko różnicową identyfikację komórek dawcy i biorcy, ale także ustalenie procentowego udziału wykrywanych komórek w badanym materiale. Umożliwia to śledzenie kinetyki zmian chimeryzmu i definiowanie trzech rodzajów chimeryzmu mieszanego: przejściowego, trwałego i progresywnego chimeryzmu mieszanego, z których każdy charakteryzuje się inną wartością prognostyczną (Tab. 1) [28].

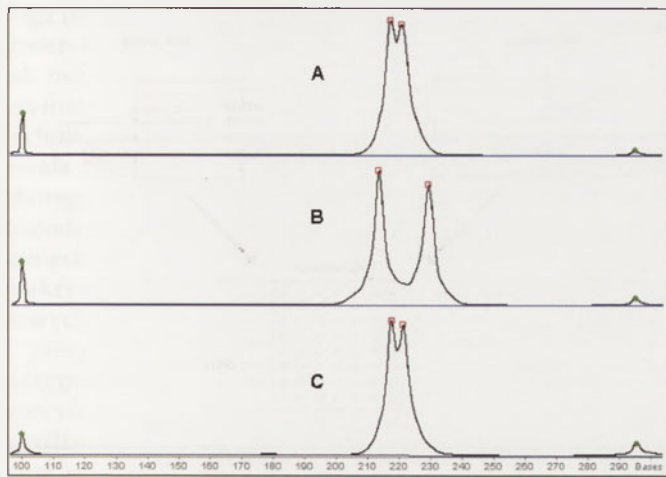
Obecnie najpowszechniejsze metody identyfikacji komórek dawcy i biorcy oparte są o wykrywanie polimorficznych różnic w sekwencji DNA badanych osób. Analiza dotyczy najczęściej polimorfizmu sekwencji STR (ang. *short tandem repeats*) rzadziej VNTR (ang. *variable number of tandem repeats*), polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP) lub tzw. markerów Indel (ang. *insertion/deletion polymorphism*). W sytuacji, gdy dawca i biorca szpiku są różnej płci, zastosowanie znajduje metoda fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), pozwalająca na identyfikację komórek dzięki użyciu fluorescencyjnie znakowanych sond DNA, specyficznych dla chromosomów płci (np. locus *DYZ1* na chromosomie Y oraz *DXZ1* na chromosomie X) [29]. Ze względu na ograniczone możliwości zastosowania tej metody (dawca i biorca szpiku różnią się płcią w ok. 50% przeprowadzonych transplantacji) pozostaje ona raczej metodą stosowaną jedynie w sytuacji, gdy nie jest możliwa analiza chimeryzmu poprzyszczepowego w oparciu o polimorfizm DNA.

ANALIZA POLIMORFIZMU STR – FLOURESCENCYJNA REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY

Polimorfizm długości sekwencji minisatelitarnych (VNTR) i mikrosatelitarnych (STR) polega na różnicy w ilości powtórzeń, w danym locus, motywu nukleotydowego (1-6 nt i 10-100 nt, odpowiednio dla sekwencji STR i VNTR) [30]. Amplifikacja sekwencji STR z użyciem fluorescencyjnie znakowanych starterów stanowi obecnie jedną z najbardziej powszechnych metod monitorowania chimeryzmu. Informatywny marker STR to taki, który w danym locus u dawcy i u biorcy wykazuje różnicę w długości sekwencji. Każdorazowo amplifikacji poddaje się DNA wyizolowany z komórek dawcy, z komórek biorcy przed transplantacją oraz z komórek biorcy po transplantacji, w celu porównania genotypów i określenia rodzaju chimeryzmu. Analiza produktów fluorescencyjnej PCR odbywa się automatycznie podczas rozdziału elektroforetycznego, w warunkach denaturujących, w aparacie wyposażonym w laser. Wzbudzenie fluorescencji migrujących fragmentów DNA przez wiązkę

Tabela 1. Rodzaje chimeryzmu po allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych.

Rodzaj chimeryzmu		Komentarz
Pełny chimeryzm	complete chimerism (CC)	wykrywanie we krwi/szpiku biorcy wyłącznie komórek dawcy; dobry czynnik prognostyczny
Trwały chimeryzm mieszany	stable mixed chimerism (SMC)	współwystępowanie, przez długi czas po transplantacji, komórek dawcy i biorcy we względnie stałym stosunku ilościowym (zazwyczaj komórki biorcy stanowią <20%); dobry czynnik prognostyczny
Przejściowy chimeryzm mieszany	transient mixed chimerism (TMC)	współwystępowanie, przez pewien czas po transplantacji, komórek dawcy z komórkami biorcy (komórki biorcy zazwyczaj <5%); najczęściej następuje przejście TMC w CC; dobry czynnik prognostyczny
Progresywny chimeryzm mieszany	progressive mixed chimerism (PMC)	współwystępowanie komórek dawcy z komórkami biorcy, których udział procentowy zwiększa się z upływem czasu; zły czynnik prognostyczny; zazwyczaj stanowi zapowiedź wznowy białaczki



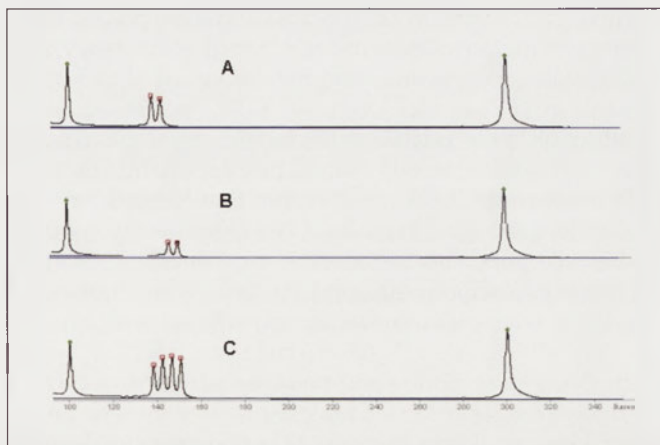
Rycina 3. Przykład pełnego chimeryzmu po allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych. (A) allele wykrywane u dawcy, (B) allele wykrywane u biorcy przed transplantacją, (C) u biorcy po transplantacji wykrywane są wyłącznie allele specyficzne dla dawcy.

lasera umożliwia ocenę długości oraz ilości produktów PCR. Prędkość migracji zdenaturowanych produktów PCR jest zależna wyłącznie od ich wielkości (identyfikacja alleli STR dawcy i biorcy na podstawie długości sekwencji) zaś intensywność emitowanej fluorescencji jest proporcjonalna do ilości danego fragmentu DNA (analiza ilościowa chimeryzmu) [31,32].

Modyfikacja tej techniki, tzw. wariant multipleksowy PCR, dzięki zastosowaniu kilku par starterów znakowanych różnymi fluorochromami, umożliwia analizę kilku loci STR w jednej reakcji PCR, co zwiększa wiarygodność oznaczeń chimeryzmu [27,33].

ANALIZA POLIMORFIZMU TYPU INDEL – REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY W CZASIE RZECZYWISTYM

Metoda fluorescencyjna STR-PCR stanowi uznane narzędzie molekularnej oceny przyjęcia/odrzućcia przeszczepu. Jej przydatność we wczesnym wykrywaniu wznowy białaczki pozostaje jednak kontrowersyjna, szczególnie w odniesieniu do białaczki ostrej, gdzie proces nawrotu choroby może postępować bardzo gwałtownie. Dlatego poszukuje się metod umożliwiających jeszcze bardziej precyzyjną analizę chimeryzmu. W ostatnim czasie opracowano metodę identyfikacji komórek dawcy i biorcy w oparciu o analizę białelicznych markerów typu Indel w reakcji PCR w czasie rzeczywistym (RQ-PCR) w technologii TaqMan [34]. Polimorfizm markerów typu Indel polega na różnicy długości sekwencji w danym locus na skutek insercji lub delecji od 1 do kilkuset par zasad [35]. Pod względem czułości analizy (10^{-3}) metoda przewyższa technikę fluorescencyjnej STR-PCR (5×10^{-2}). Ponadto, wyniki analizy chimeryzmu techniką STR-PCR mogą być obciążone błędem wynikającym ze zjawiska kompetycji między allelami dawcy i biorcy, amplifikowanymi w jednej reakcji przy użyciu tej samej pary starterów (krótsze fragmenty ulegają amplifikacji z większą wydajnością niż allele dłuższe). W RQ-PCR allele dawcy i biorcy amplifikowane są w niezależnych reakcjach PCR z użyciem starterów specyficznych wobec informatywnych



Rycina 4. Przykład chimeryzmu mieszanego po allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych. (A) allele wykrywane u dawcy, (B) allele wykrywane u biorcy przed transplantacją, (C) u biorcy po transplantacji wykrywane są zarówno allele specyficzne dla dawcy jak i allele specyficzne dla biorcy, co świadczy o współwystępowaniu komórek dawcy i biorcy.

markerów Indel dawcy i biorcy, zidentyfikowanych wcześniej spośród panelu analizowanych markerów polimorficznych. Analiza ilościowa chimeryzmu wykonywana jest w oparciu o krzywe kalibracyjne, powstałe przez amplifikację odpowiednich serii rozcieńczeń DNA dawcy i biorcy. Szybkość, wysoka czułość oraz coraz większa dostępność technologii „real-time” wpływają na stopniowe upowszechnianie się tej metody w diagnostyce potransplantacyjnej.

POLIMORFIZM POJEDYNCZYCH NUKLEOTYDÓW – REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY W CZASIE RZECZYWISTYM, PIROSEKWENCJONOWANIE I GENOTYPOWANIE W TECHNOLOGII MIKROMACIERZY

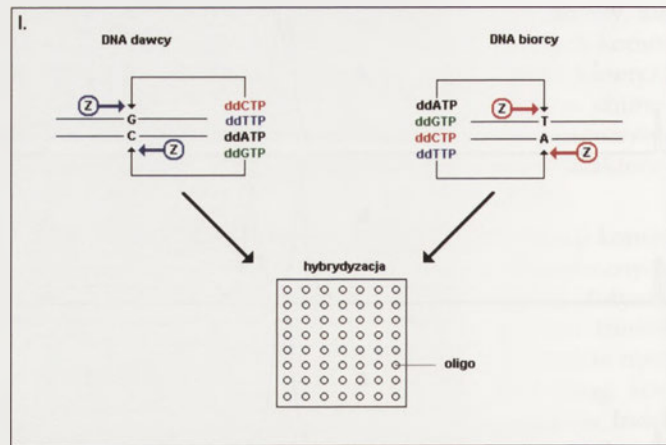
Najnowocześniejsze metody monitorowania chimeryzmu potransplantacyjnego oparte są o analizę polimorfizmu pojedynczych nukleotydów. Na przydatność SNP jako markerów genetycznych wpływa ich powszechne występowanie w ludzkim genomie (średnio 1 SNP/1,3 kb) oraz fakt, że są to najczęściej markery białeliczne, których allele różnią się tylko jednym nukleotydem, co znacznie ułatwia ich identyfikację [36]. Jedną z metod analizy chimeryzmu w oparciu o markery SNP jest genotypowanie techniką PCR w czasie rzeczywistym (RQ-PCR), charakteryzujące się czułością 10^{-3} – 10^{-4} [37]. Zastosowanie sond typu TaqMan, starterów specyficznych wobec każdego z analizowanych alleli SNP, oraz krzywej kalibracyjnej w postaci serii rozcieńczeń DNA SNP-pozytywnego wodą lub DNA SNP-negatywnym, umożliwia analizę ilościową chimeryzmu na zasadzie analogicznej, jak we wcześniej opisanych zastosowaniach techniki RQ-PCR.

Techniką genotypowania markerów SNP specyficznych dla dawcy i biorcy, pozwalającą na szybkie i wydajne prowadzenie badań ilościowych chimeryzmu (analiza 96 prób w czasie poniżej 2 godzin) jest metoda pirosekwencjonowania [38]. Technika określana także jako sekwencjonowanie w czasie rzeczywistym, wykorzystuje aktywność: polimerazy DNA (wydłużającej starter sekwencyjny, zlokalizowany tuż przed analizowaną sekwencją, poprzez dołączanie

kolejnych trifosforanów deoksynukleozydów, podawanych automatycznie do mieszanki reakcyjnej), sulfurylasy ATP (przekształcającej pirofosforan, uwolniony na skutek wbudowania dNTP do nici DNA, w ATP), lucyferazy (przekształcającej, przy udziale ATP, lucyferinę w oksylucyferinę, co powoduje emisję światła proporcjonalnie do ilości ATP, a zatem do ilości wbudowanych nukleotydów) oraz apirazy (degradującej nadmiar ATP i niezwiązanych nukleotydów, co zapewnia regenerację mieszanki reakcyjnej) [39, www.pyrosequencing.com]. Automatyczne dozowanie reagentów w pirosekwencjatorze zapewnia sekwencyjne podawanie tylko jednego z czterech rodzajów dNTP w danym cyklu. Ponieważ wbudowanie podanego dNTP do nici DNA wiąże się z emisją światła, a brak sygnału świetlnego po podaniu danego nukleotydu oznacza brak danego nukleotydu w sekwencji DNA, możliwe jest odczytanie analizowanej sekwencji nukleotydów po nukleotydzie i identyfikacja alleli SNP specyficznych dla dawcy i biorcy. Analizę ilościową chimeryzmu wykonuje się w oparciu o krzywe kalibracyjne wyznaczone poprzez pirosekwencjonowanie znanych rozcięć DNA dawcy w DNA biorcy [38].

Inną metodą genotypowania markerów SNP jest technika minisekwencjonowania, określaną także skrótem SNUPE od ang. *single nucleotide primer extension* [36,40]. Istotą minisekwencjonowania jest użycie polimerazy DNA do wydłużenia startera sekwencyjnego, komplementarnego do rejonu bezpośrednio sąsiadującego z analizowanym wariantem SNP, poprzez przyłączenie pojedynczego, znakowanego ddNTP (dideoksynukleotydu), komplementarnego do genotypowanego nukleotydu. W ostatnim czasie opracowano opartą o minisekwencjonowanie, wysoko wydajną, dwufazową metodę analizy chimeryzmu: I etap – identyfikacja informatywnych dla danej pary dawca/biorca markerów SNP, II etap – ilościowa analiza chimeryzmu [36]. Minisekwencjonowanie w I etapie prowadzone jest z użyciem znakowanych fluorescencyjnie ddNTP (każdy z czterech ddNTP znakowany innym fluorochromem) i starterów sekwencyjnych znakowanych na końcu 5' „sekwencją znacznikową” (ang. *tag sequence*). Analiza produktów minisekwencjonowania oparta jest o technologię mikromacierzy. Hybrydyzacja produktów minisekwencjonowania do oligonukleotydów komplementarnych wobec sekwencji znacznikowych, naniesionych na płytkę w formie mikromacierzy, umożliwia automatyczną analizę fluorescencji wydłużonych starterów sekwencyjnych i identyfikację informatywnych markerów SNP [36,41].

W II etapie minisekwencjonowanie prowadzi się na mikropłytkach, których dołki opłaszczone są streptawidyną, dzięki czemu możliwa jest immobilizacja analizowanych fragmentów DNA (amplifikowanych z użyciem starterów znakowanych biotyną) i minisekwencjonowanie z użyciem starterów sekwencyjnych i nukleotydów znakowanych ^3H . Genotypowanie SNP oparte jest o pomiar scyntylny radioaktywności wydłużonych starterów sekwencyjnych (każdemu z ^3H dNTP odpowiada inna wartość Ci/mmol). Analizę ilościową chimeryzmu wykonuje się na podstawie procentowego udziału obu wariantów allelicznych w analizowanej próbce (w przypadku homozygoty całość sygnału radioaktywnego reprezentuje dany wariant alleliczny SNP; w przypadku heterozygoty sygnał radioaktywny odpowiada połowie udziału

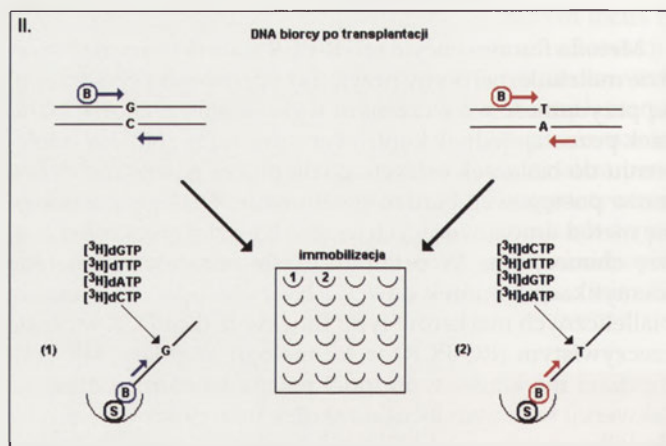


Rycina 5. Identyfikacja markerów SNP informatywnych dla danej pary dawca/biorca, w celu analizy ilościowej chimeryzmu potransplantacyjnego (etap I). Minisekwencjonowanie z użyciem znakowanych fluorescencyjnie dideoksynukleotydów (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) i różnych starterów sekwencyjnych, komplementarnych wobec potencjalnych markerów SNP (czerwone i niebieskie strzałki), znakowanych sekwencją znacznikową (Z). Analiza fluorescencji produktów minisekwencjonowania odbywa się automatycznie, dzięki hybrydyzacji sekwencji znacznikowej do komplementarnych oligonukleotydów (oligo), naniesionych na mikropłytkę, w formie mikromacierzy.

procentowego danego markera SNP w badanej próbce). Pod względem czułości analizy chimeryzmu pirosekwencjonowanie (5×10^{-2}) i minisekwencjonowanie (10^{-2}) nie przewyższają metody opartej o PCR w czasie rzeczywistym. Ich niewątpliwą zaletą jest natomiast skuteczność odróżniania wariantów allelicznych SNP, wysoka powtarzalność wyników oraz możliwość zautomatyzowania procedur, wpływająca na szybkość i wysoką wydajność tych metod.

PODSUMOWANIE

Przedstawiony w niniejszej pracy przegląd technik i strategii molekularnych obrazuje rosnące znaczenie metod bio-



Rycina 6. Analiza ilościowa chimeryzmu potransplantacyjnego (etap II). DNA biorcy po transplantacji amplifikowany jest w oddzielnych reakcjach PCR z użyciem starterów specyficznych wobec markerów SNP informatywnych dla dawcy i biorcy (czerwone i niebieskie strzałki). Jeden ze starterów każdej pary znakowany jest biotyną (B), dzięki czemu możliwa jest immobilizacja produktów PCR na mikropłytkę, której dołki opłaszczone są streptawidyną. Minisekwencjonowanie odbywa się z użyciem starterów sekwencyjnych, komplementarnych wobec informatywnych markerów SNP (niebieska i czerwona strzałka) oraz nukleotydów znakowanych ^3H . Pomiar scyntylny radioaktywności produktów minisekwencjonowania w poszczególnych dołkach umożliwia identyfikację alleli dawcy i biorcy oraz analizę ilościową chimeryzmu.

logii molekularnej w hematologii. Choć podstawę diagnostyki białaczek nadal stanowią techniki niemolekularne, jak mikroskopia świetlna, immunofenotypowanie cytofluorometryczne, czy klasyczna cytogenetyka, zastosowanie technik molekularnych ma znaczenie uzupełniające i pozwala sprecyzować postawioną diagnozę, zakwalifikować chorego do grupy ryzyka i właściwie ukierunkować terapię. Nieodzwon jest natomiast zastosowanie technik molekularnych do monitorowania efektywności leczenia, poprzez wykrywanie niewielkiej nawet liczby komórek nowotworowych (detekcja choroby resztkowej), czy też identyfikację i precyzyjną analizę ilościową komórek dawcy i biorcy w przypadku badań potransplantacyjnych. Wysoka czułość, specyficzność i wydajność metod analizy molekularnej, możliwość prowadzenia precyzyjnych badań ilościowych oraz wysoki stopień powtarzalności wyników, ułatwiający standaryzację, wpływają na coraz bardziej dynamiczny rozwój szeroko pojętej molekularnej diagnostyki hematologicznej i przyczyniają się do dalszej poprawy wyników leczenia białaczek u dzieci.

PIŚMIENNICTWO:

- Radwańska U (1998) Ostra białaczka limfoblastyczna, W: Radwańska U (red) Białaczki u dzieci. Volumed, Wrocław, str. 57-89
- van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willemsse MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gardner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettinger K, van der Does-van den Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR (1998) Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 352: 1731-1738
- Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M (2003) Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med* 138: 819-830
- Okuda T, Fisher R, Downing JR (1996) Molecular diagnostics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Mol Diagn* 1: 139-151
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL (2001) Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344: 1031-1037
- Towatari M, Yanada M, Usui N, Takeuchi J, Sugiura I, Takeuchi M, Yagasaki F, Kawai Y, Miyawaki S, Ohtake S, Jinnai I, Matsuo K, Naoe T, Ohno R; Japan Adult Leukemia Study Group (2004) Combination of intensive chemotherapy and imatinib can rapidly induce high-quality complete remission for a majority of patients with newly diagnosed BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 104: 3507-3512
- Meyer C, Schneider B, Reichel M, Angermueller S, Strehl S, Schnittger S, Schoch C, Jansen MW, van Dongen JJ, Pieters R, Haas OA, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R (2005) Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 449-454
- Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui CH (2000) Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 96: 24-33
- Lo Coco F, Pisegna S, Diverio D (1997) The AML1 gene: a transcription factor involved in the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemias. *Haematologica* 82: 364-370
- Sawiriska M, Ładon D (2004) Mechanism, detection and clinical significance of the reciprocal translocation t(12;21)(p12;q22) in the children suffering from acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res* 28: 35-42
- Brazier RM, Shipp MA, Feldman AL, Espina V, Winters M, Jaffe ES, Petricoin EF 3rd, Liotta LA (2003) Molecular diagnostics. *Hematology* 279-293
- Szczepański T, Orfão A, van der Velden VHJ, San Miguel J, van Dongen JJM (2001) Minimal residual disease in leukemia patients. *Lancet Oncol* 2: 409-417

- Brown M, Witter C (2000) Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry* 46: 1221-1229
- Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Ramondi SC, Sandlund JT, Rivera GK, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Pui CH-H, Campana D (2000) Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Blood* 96: 2691-2696
- Moppett J, Burke GA, Steward CG, Oakhill A, Goulden NJ (2003) The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol* 56: 249-253
- Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B, Vilmer E (1998) Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 339: 591-598
- Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, D'Aniello E, Willemse MJ, Fasching K, Pannunzio A, Gardner H, Schrappe M, Kamps WA, Bartram CR, van Dongen JJM, Panzer-Grümayer ER (2000) Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia* 14: 1939-1943
- Eckert C, Biondi A, Seeger K, Cazzaniga G, Hartmann R, Beyermann B, Pogodda M, Proba J, Henze G (2001) Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 358: 1239-1241
- Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, Goulden NJ, Niethammer D, Oakhill A, Steward CG, Handgretinger R, Beck JF, Klingebiel T (2002) Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia* 16: 1668-1672.
- van der Velden VHJ, Joosten SA, Willemse MJ, van Wering ER, Lankester AW, van Dongen JJM, Hoogerbrugge PM (2001) Real-time quantitative PCR for detection of minimal residual disease before allogeneic stem cell transplantation predicts outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 15: 1485-1487
- Jakóbsiak M (1998) Powstawanie przeciwciał, W: Jakóbsiak M (red) Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 70-82
- Jakóbsiak M (1998) Receptory limfocytów T wiążące antygen, W: Jakóbsiak M (red) Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 96-102
- van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepański T, Gabbert J, van Dongen JJM (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 17: 1013-1034
- Pongers-Willemsse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, San Miguel JF, van Dongen JJ (1999) Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 13: 110-118
- Langerak AW, Szczepański T, van der Burg M, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ (1997) Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia* 11: 2192-2199
- Przybylski G (2004) PCR w czasie rzeczywistym, W: Słomski R (red) Przykłady analiz DNA. Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Poznań, str. 145-150
- McCann SR, Crampe M, Molloy K, Lawler M (2005) Hematopoietic chimerism following stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci* 32: 55-61
- McCann SR, Lawler M (2004) Monitoring outcome: MRD, chimaerism and relapse, W: Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T (red) Haemopoietic stem cell transplantation. Forum Service Editore, Genua, str. 197-212
- Jólkowska J, Ładon D, Wachowiak J, Witt M (2000) Monitoring of cellular chimerism in patients after sex-mismatched bone marrow transplantation: technical report. *J Appl Genet* 41: 209-212

30. Bal J, Bocian E (2001) Genom człowieka, W: Bal J (red) Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. PWN, Warszawa, str. 32-38
31. Khan F, Agarwal A, Agrawal S (2004) Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant 34: 1-12
32. Jólkowska J, Pieczonka A, Strabel T, Boruckowski D, Wachowiak J, Bader P, Witt M (2005) Hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation: a comparison of quantitative analysis by automated DNA sizing and fluorescent *in situ* hybridization. BMC Blood Disorders 5: 1
33. Thiede C, Florek M, Bornhauser M, Ritter M, Mohr B, Brendel C, Ehninger G, Neubauer A (1999) Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. Bone Marrow Transplant 23: 1055-1060
34. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, Lamy T, Le Prise P-Y, Beauplet A, Bories D, Semana G, Quélvenec E (2002) Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. Blood 99: 4618-4625
35. Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. Genet Sel Evol 34: 275-305
36. Fredriksson M, Barbany G, Liljedahl U, Hermanson M, Kataja M, Syvänen AC (2004) Assessing hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation by multiplexed SNP genotyping using microarrays and quantitative analysis of SNP alleles. Leukemia 18: 255-266
37. Maas F, Schaap N, Kolen S, Zoetbrood A, Buno I, Dolstra H, de Witte T, Schattenberg A, van de Wiel-van Kemenade E (2003) Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms. Leukemia 17: 621-629
38. Hochberg EP, Miklos DB, Neuberger D, Eichner DA, McLaughlin SF, Mattes-Ritz A, Alyea EP, Antin JH, Soiffer RJ, Ritz J (2003) A novel rapid single nucleotide polymorphism (SNP)-based method for assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. Blood 101: 363-369
39. Kalak R, Słomski R (2004) Pirosekwencjonowanie – sekwencjonowanie w czasie rzeczywistym, W: Słomski R (red) Przykłady analiz DNA. Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Poznań, str. 309-312
40. Syvänen AC (1999) From gels to chips: "Minisequencing" primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphism. Human Mutation 13: 1-10
41. Lindroos K, Sigurdsson S, Johansson K, Ronnblom L, Syvänen AC (2002) Multiplex SNP genotyping in pooled DNA samples by a four-colour microarray system. Nucleic Acids Res 30: e70

Molecular methods for diagnostics and assessment of treatment effectiveness in modern pediatric hematooncology

Małgorzata Dawidowska^{1,2,✉}, Jacek Wachowiak¹, Michał Witt^{2,3}

¹Department of Pediatric Hematology, Oncology, and Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Poznań University of Medical Sciences, 27/33 Szpitalna St., 60-572 Poznań, Poland

²Department of Molecular and Clinical Genetics, Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, 32 Strzeszyńska St., 60-479 Poznań, Poland

³International Institute of Molecular and Cell Biology, 4 Ks. Trojdena St., 02-109 Warsaw, Poland

✉e-mail: ma.dawidowska@wp.pl

Key words: fusion genes, minimal residual disease, hematopoietic chimerism

ABSTRACT

This paper is a review of current diagnostic applications of molecular methods in pediatric hematooncology, including analyses performed at disease presentation, evaluation of prognosis as well as those for assessment of treatment effectiveness. Here we present the examples of important fields of application of molecular methods in pediatric hematooncology, i.e. identification of clinically significant fusion genes in acute lymphoblastic leukemia and monitoring of minimal residual disease in this most frequent childhood malignancy. Moreover, we present the methodology and clinical significance of quantitative analysis of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. The methods presented include fluorescent *in situ* hybridization, reverse transcription, conventional and quantitative polymerase chain reaction, as well as methods of genotyping based on analysis of microsatellite marker polymorphism, single nucleotide polymorphism, and Indel markers.

Rola tiolaktonu homocysteiny w niektórych chorobach człowieka

STRESZCZENIE

W artykule przedstawiono w skrócie wyniki najnowszych badań dotyczących udziału homocysteiny (Hcy), jej cyklicznego tioestru (tiolaktonu homocysteiny), a także N-homocysteinyłacji białek w niektórych stanach chorobowych ludzi. Omówiono funkcję enzymu tiolaktonazy homocysteiny/paraoksonazy, która jest ściśle związana z frakcją lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL) oraz wpływ modyfikacji HDL na ich biologiczną aktywność. Opiszono również efekty terapii witaminowej (kwasem foliowym, witaminą B₆ oraz B₁₂) stosowanej w celu obniżenia poziomu homocysteiny u ludzi.

WPROWADZENIE

Homocysteina (Hcy) jest ważnym czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy oraz chorób neurodegeneracyjnych u ludzi. Wysoki poziom tego niebiałkowego aminokwasu jest skorelowany również z chorobami nerek, nieprawidłowym funkcjonowaniem trzustki, a także z nieprawidłowymi właściwościami skrzepów fibrynowych, które stając się odporne na hydrolizę, mogą przyczyniać się do powstania zakrzepicy. Całkowita zawartość homocysteiny (tHcy) powyżej 10,2 μmol/l przyczynia się do dwukrotnego, a powyżej 20 μmol/l do 8,9-krotnego wzrostu ryzyka wystąpienia chorób układu krążenia. Mechanizmy toksyczności homocysteiny, będące przedmiotem badań w wielu laboratoriach na świecie, w tym w Polsce, obejmują skłonność do trombozy oraz upośledzoną trombolizę, wzmożoną produkcję nadtlenu wodoru, dysfunkcję śródbłonna naczyń krwionośnych, a także wzmożone utlenianie lipoprotein [1]. Jedną z hipotez sugeruje, że do toksyczności homocysteiny przyczynia się przekształcanie jej w tiolakton homocysteiny [2]. Tiolakton homocysteiny jest cyklicznym tioestrem homocysteiny, powstającym w reakcji katalizowanej przez syntetazę metionyl-tRNA. Tiolakton homocysteiny jest chemicznie reaktywny i tworzy addukty z białkami, w których grupa karboksylowa homocysteiny jest związana wiązaniem amidowym z grupą ε-aminową reszt lizyny białka (N-Hcy-białka) (Ryc. 1B i C). Modyfikacja ta powoduje zmianę struktury białek i wpływa negatywnie na ich funkcje.

W metabolizmie tiolaktonu homocysteiny bierze udział tiolaktonaza homocysteiny/paraoksonaza. Enzym ten, związany z frakcją HDL osocza, hydrolizuje tiolakton homocysteiny do homocysteiny. Wykazano, że aktywność tiolaktonazy homocysteiny jest znacznie wyższa u pacjentów z chorobą wieńcową serca niż u osób zdrowych [3]. Modyfikacje cząsteczek HDL mają w związku z tym duże znaczenie dla metabolizmu tiolaktonu homocysteiny: zredukowana aktywność hydrolityczna tiolaktonazy homocysteiny podwyższa poziom tego toksycznego związku we krwi.

Jedną z metod obniżania poziomu homocysteiny jest podawanie pacjentom zwiększonych dawek witamin: B₆, B₁₂ oraz kwasu foliowego [1]. Terapia taka redukuje poziom homocysteiny i poprawia funkcjonowanie śródbłonna naczyń krwionośnych. Patofizjologiczna rola tiolaktonu homocysteiny i mechanizm N-homocysteinyłacji białek były przedmiotem kilku poprzednich opracowań [2,4,5], w tym również na łamach „Postępów Biochemii” [6]. W tym artykule przedstawiono wyniki najnowszych badań w tej dziedzinie.

MODYFIKACJA FIBRYNOGENU TIOAKTONEM HOMOCYSTEINY ZMIENIA WŁAŚCIWOŚCI SKRZEPÓW

Śmiertelność spowodowana chorobami układu krążenia wynika głównie z niewłaściwego tworzenia i lizy skrzepów krwi. Większość badań skupia się jednak tylko na wpływie homocysteiny na komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, a tylko nieliczne na wpływie homocysteiny na białka zaangażowane w tworzenie i lizę skrzepów krwi. Fibrynogen jest podstawowym białkiem uczest-

Marta Sikora^{1,✉}

Tomasz Twardowski¹

Hieronim Jakubowski^{1,2}

¹Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

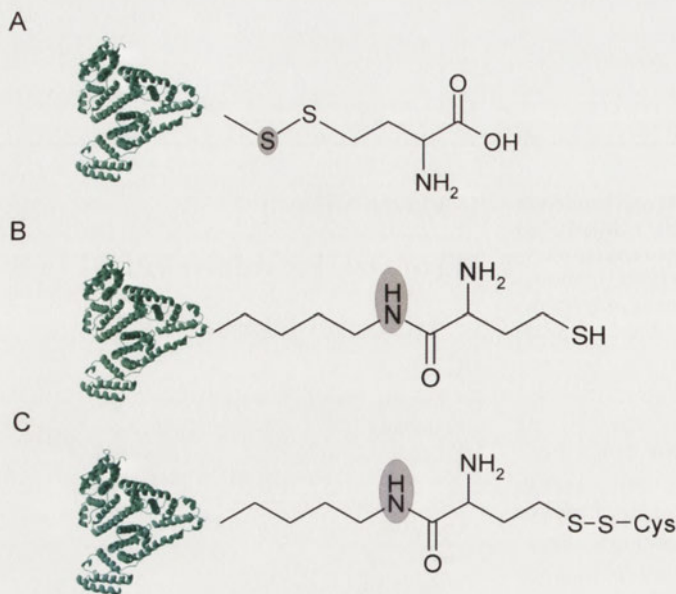
²University of Medicine and Dentistry of New Jersey, New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Newark, New Jersey 07103, USA

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

Artykuł otrzymano 8 września 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 27 września 2006 r.

Słowa kluczowe: tiolakton homocysteiny, N-homocysteinyłacja białek, choroby człowieka

Wykaz skrótów: CAD (ang. *coronary artery disease*) – choroba niedokrwienności serca; CHD (ang. *coronary heart disease*) – choroba wieńcowa; HDL (ang. *high density lipoproteins*) – lipoproteiny o wysokiej gęstości; LDL (ang. *low density lipoproteins*) – lipoproteiny o niskiej gęstości; receptor NMDA (ang. *N-methyl D-aspartate*) – jonotropowy receptor kwasu glutaminowego; SA (ang. *salicylic acid*) – kwas salicylowy; tHcy (ang. *total homocysteine*) – całkowita zawartość homocysteiny; tPA (ang. *tissue plasminogen activator*) – tkankowy aktywator plazminogenu



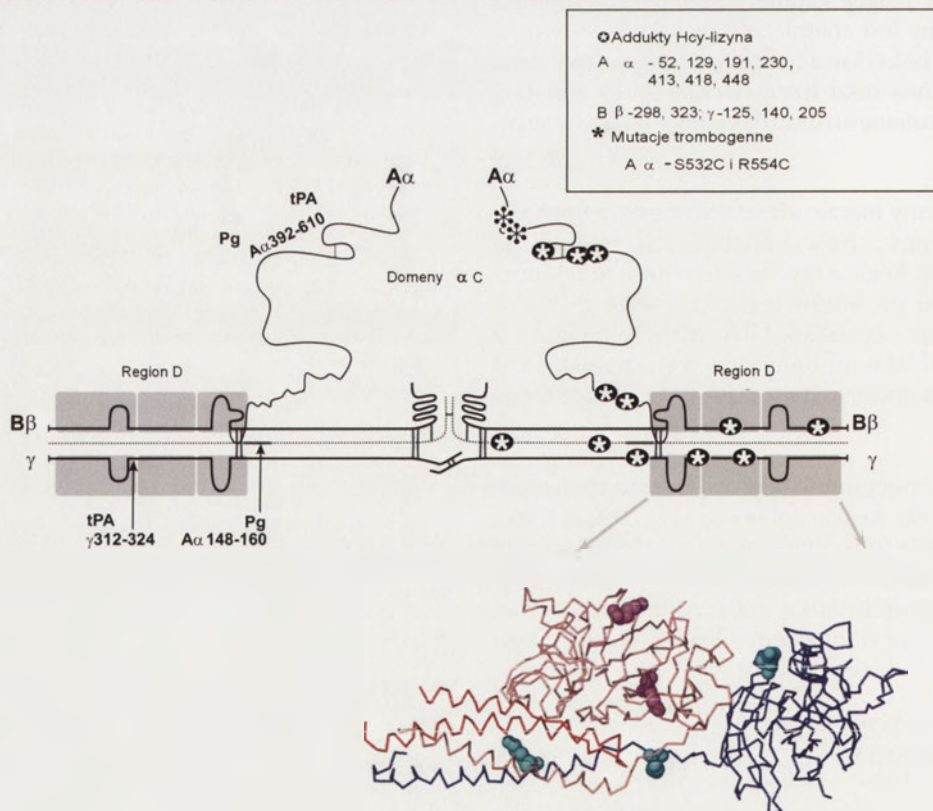
Rycina 1. Addukty Hcy z białkami osocza. (a) Białko S-homocysteinylowane na grupie tiolowej reszty cysteiny. (b) Białko N-homocysteinylowane na grupie ε-aminowej reszty lizyny. (c) Białko N-homocysteinylowane na grupie ε-aminowej reszty lizyny. Hcy może tworzyć mostek dwusiarczkowy z Cys (na podstawie [19]).

niczącym w procesie koagulacji krwi; polimeryzując tworzy struktury skrzepu fibrynowego. Białko to jest glikoproteina

o c.c.z. 340 kDa, złożoną z dwóch symetrycznych części. Każda z nich zawiera trzy łańcuchy peptydowe: Aα, Bβ i γ.

Proces polimeryzacji fibryny rozpoczyna się od przecięcia przez trombinę peptydów A i B fibryny od N-końca łańcuchów Aα i Bβ. Monomery fibryny asocjują w dwuniciową macierz. Dalsza asocjacja pogrubia włókna i prowadzi do rozgałęzień oraz tworzenia złożonej siatki fibryny. Proces fibrynolizy jest niezbędny do usuwania skrzepów podczas gojenia się ran, jak i do usuwania wewnątrznaczyniowych skrzepów, które mogą w przeciwnym razie prowadzić do trombozy. Wewnątrznaczyniowe odkładanie się fibryny jest związane z rozwojem miażdżycy. Wobec tego wydajny system fibrynolityczny chroni organizm przed miażdżycową chorobą naczyń krwionośnych i przed ostrym procesem trombozy. Fibrynoliza jest procesem, w wyniku którego skrzepy fibrynowe zostają rozpuszczone. Inicjacja tego procesu następuje, gdy tkankowy aktywator plazminogenu (tPA) i plazminogen wiążą się do skrzepu fibrynowego, wskutek czego aktywator plazminogenu trawi plazminogen do plazminy. Plazmina wiąże się do reszt lizyny fibryny i trawi trzy łańcuchy fibryny w wielu miejscach.

Fibrynogen osocza jest czynnikiem ryzyka występowania choroby wieńcowej (CAD, ang. *coronary artery disease*), udaru mózgu i śmiertelności niezależnej od układu krwionośnego [7]. W 2006 r. opublikowano pracę [8], w której autorzy sugerują, że zmienione właściwości skrzepu fibrynowego, a szczególnie wzrost odporności na lizę, zwiększają ryzyko występowania chorób naczyniowych związanych



Rycina 2. N-homocysteinylowane reszty lizyny w fibrynogenie. Homocysteinylowane reszty lizyny są pokazane po prawej stronie cząsteczki, natomiast miejsca wiązania tPA i plazminogenu (Pg) po lewej stronie. Pokazana jest również struktura 3D regionu D z łańcuchami Bβ w kolorze różowym, γ w kolorze niebieskim oraz Aα na czerwono. Homocysteinylowane reszty lizyny są pokazane sferycznie [12].

z powstawaniem skrzepów miażdżycowych. Ponadto wskazują, że hiperhomocysteinemia należy do grupy ważnych czynników (łącznie z podwyższonym poziomem fibrynogeny i protrombiny), które zmieniają strukturę skrzepów w taki sposób, że stają się one mniej przepuszczalne dla czynników fibrynolitycznych i mniej podatne na lizę. Zredukowana fibrynoliza u pacjentów z hiperhomocysteinemią jest najprawdopodobniej spowodowana małym rozmiarem porów w sieci fibryny, jak to wykazano u pacjentów z cukrzycą [9]. Gęste sieci fibryny charakteryzują się obniżoną podatnością na lizę z powodu mniej wydajnego transportu czynników fibrynolitycznych przez skrzep [10]. Wynika z tego, że konfiguracja sieci fibryny, a nie średnica pojedynczego włókna fibryny ma istotniejszy wpływ na szybkość fibrynolizy [11].

Molekularny mechanizm leżący u podłoża zmian we właściwościach skrzepów może być związany z modyfikacją fibrynogeny przez tiolakton homocysteiny. Jak wiele innych białek, fibrynogen łatwo ulega modyfikacji przez tiolakton homocysteiny *in vitro* (Ryc. 2) [12], co powoduje zmia-

nę jego właściwości a nawet denaturację [2,4,5,13]. Modyfikacja ta zachodzi również *in vivo*, na co wskazuje obecność związanej wiązaniem amidowym homocysteiny w fibrynogenu [14]. Zmiana funkcji fibrynogenu obserwowana u ludzi [8] i królików [15,16] z hiperhomocysteinemią może przyczynić się do rozwoju patologii naczyń krwionośnych. Modyfikacja reszt lizyny przez tiolakton homocysteiny w fibrynogenu zmienia strukturę powstających włókien i zaburza zdolność enzymów fibrynolitycznych do wiązania i trawienia zmodyfikowanej fibryny [8,15]. Zmiany obejmują tworzenie skrzepów, złożonych z cieńszych, ściślej upakowanych włókien, zmienionej zdolności odpowiedzi na stężenie wapnia oraz odporność powstałego skrzepu na lizę przy udziale kompleksu tPA/plazminy [15,16].

Kwas acetylosalicylowy ze względu na działanie antyagregacyjne jest lekiem powszechnie stosowanym w zapobieganiu zakrzepom w naczyniach tętniczych, a więc w zapobieganiu zawałom serca, udarom mózgu, miażdżycowym zmianom w tętnicach kończyn dolnych, a także w leczeniu migotania przedsionków. Niskie dawki tego kwasu zwiększają przepuszczalność skrzepów u zdrowych osób [8]. Małe dawki leku, tj. około 75 mg/dobę, wystarczają by zahamować agregację płytek krwi, co ma bardzo duże znaczenie w procesie tworzenia zakrzepów. Zaobserwowano jednak, że skrzepy tworzące się u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca zażywających niską dawkę kwasu acetylosalicylowego (75 mg/ml dziennie), były mniej przepuszczalne, a czas lizy był właściwie niezmienny w porównaniu ze zdrowymi osobami z podobnym stężeniem fibrynogenu. To sugeruje, że w zmianach koagulacji krwi związanych z chorobą niedokrwienną serca, główny wpływ na strukturę skrzepów mają inne czynniki, takie jak całkowita zawartość homocysteiny [8]. Przyjmowanie kwasu foliowego, niezbędnego do przekształcenia homocysteiny do metioniny (Met), przez chorych na hiperhomocysteinemię przez 4 tygodnie prowadzi do korzystnych zmian we właściwościach skrzepu fibrynowego [8].

Podsumowując, poziom homocysteiny ma wpływ na strukturę skrzepu u ludzi. Zmiany w tej strukturze są zapewne spowodowane protrombotycznym działaniem tiolaktonu homocysteiny. N-homocysteinylacja fibrynogenu przez tiolakton homocysteiny zaburza jego biologiczną funkcję. Potrzebne są jednak dalsze badania określające rolę zmian we właściwościach sieci fibryny spowodowanych tiolaktonem homocysteiny w zakrzepicy miażdżycowej.

WZROST HOMOCYSTEINYLACJI BIAŁEK OSOCZA U PACJENTÓW PODDAWANYCH HEMODIALIZIE

Wyniki wcześniejszych badań wykazały, że N-homocysteinylowane białka występują we krwi człowieka, a ich poziom jest zależny od całkowitej zawartości homocysteiny [14,17,18]. Hiperhomocysteinemia, jako niezależny czynnik ryzyka chorób układu krążenia, występuje u większości pacjentów poddawanych hemodializie. Perna i wsp. [19] zmierzili poziom homocysteinylacji białek w grupie pacjentów poddawanych hemodializie w porównaniu z grupą kontrolną, a także zbadali efekt terapii kwasem foliowym.

Wykazano, że N-homocysteinylacja oraz S-homocysteinylacja, polegająca na tworzeniu wiązań -S-S- z resztami Cys (Ryc. 1A) występują ze zwiększoną częstotliwością u pacjentów z chorobami nerek poddawanych hemodializie niż u osób zdrowych. Nie jest to szczególnie zaskakujące zważywszy na wyższy wskaźnik całkowitej zawartości homocysteiny, którym charakteryzują się ci pacjenci [19,20]. Wzrost homocysteiny we krwi niesie ze sobą wzrost liczby N-homocysteinylowanych białek [17]. To z kolei może być związane z wyższym poziomem tiolaktonu homocysteiny we krwi spowodowanym zwiększoną jego produkcją [21], a także zredukowaną aktywnością tiolaktonazy homocysteiny, enzymu hydrolizującego tiolakton homocysteiny. W najnowszych doniesieniach wykazano, że aktywność tiolaktonazy homocysteiny w osoczu jest zredukowana u pacjentów z chroniczną niewydolnością nerek [19].

Poziom N-Hcy-białek u pacjentów poddanych hemodializie jest około dwukrotnie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast poziom homocysteiny w osoczu i S-Hcy-białek jest około pięciokrotnie wyższy niż w grupie kontrolnej. Ta rozbieżność może być spowodowana nakładaniem się takich procesów, jak np. karbamylacja białka. Rzeczywiście, w warunkach wysokiego poziomu mocznika we krwi (np. uremia), mocznik jest spontanicznie przekształcany w izocyjanat, który reaguje z końcową grupą aminową białek i z grupą ε-aminową reszty lizyny (karbamylacja) [22]. Są to te same grupy chemiczne, z którymi reaguje tiolakton homocysteiny podczas tworzenia formy N-Hcy-białka. Dlatego uzasadnione jest przypuszczenie, że oba te czynniki współzawodniczą *in vivo*, prowadząc do niższego niż można się spodziewać wzrostu stężenia formy N-Hcy-białek.

Przeanalizowano również funkcje homocysteinylowanej albuminy *in vitro*. Albumina jest białkiem produkowanym przez wątrobę. Stanowi 60% wszystkich zawartych w osoczu białek. Prawidłowy poziom albuminy we krwi ludzkiej wynosi od 3,5 do 5,0 g/dl. Albumina pełni podstawową rolę w utrzymaniu ciśnienia onkotycznego niezbędnego do zachowania prawidłowych proporcji między ilością wody zawartą we krwi a ilością wody w płynach tkankowych. Rolą albuminy jest także działanie buforujące pH oraz transport niektórych hormonów, leków i kwasów tłuszczowych. W przypadku uremii zdolność albuminy do wiązania transportowanych cząsteczek jest zredukowana. W badaniach wykorzystano fakt, że wiązanie ligandów przez albuminę powoduje jej zmiany konformacyjne, a co za tym idzie możliwość śledzenia zmian na drodze doświadczałnej – wygaszanie fluorescencji reszt tryptofanu. Przetestowano trzy różne leki: warfarynę, kwas salicylowy i diazepam, które wiążą się do różnych miejsc w cząsteczce albuminy. Wiązanie warfaryny i kwasu salicylowego przez homocysteinylowaną albuminę nie różniło się od nie modyfikowanej albuminy. Okazało się natomiast, że homocysteinylowana albumina wiąże mniej diazepamu, w porównaniu z nie modyfikowaną albuminą. Jest to zapewne spowodowane tym, że reszta Lys⁵²⁵, główne miejsce N-homocysteinylacji w albuminie [18], jest częścią domeny wiążącej benzodiazepiny (grupa leków, do której należy m.in. diazepam) [19]. Wśród pacjentów z uremią przeprowadzono 2-miesięczną

terapię kwasem foliowym, w wyniku której znacznie obniżył się u nich poziom homocysteiny, jednakże nie osiągnął normalnego poziomu. N-homocysteinyłacja białek została znacznie zredukowana i osiągnęła prawie normalny poziom. Natomiast S-homocysteinyłacja, pomimo iż została zredukowana, nie osiągnęła normalnego poziomu.

Podsumowując: wykazano, że homocysteinyłacja białek, jeden z czynników toksyczności homocysteiny, występuje u pacjentów z uremią poddawanych hemodializie, a przyjmowanie kwasu foliowego wykazuje działanie hamujące na ten proces.

STRUKTURALNE MODYFIKACJE HDL A KONSEKWENCJE FUNKCJONALNE

Bardzo ważną rolę w metabolizmie tiolaktonu homocysteiny odgrywa tiolaktonaza homocysteiny, znana wcześniej jako paraoksonaza (PON1), enzym zależny od jonów wapnia i związany z frakcją HDL osocza [23,24]. Jak wykazano, PON1 ulegająca ekspresji w transgenicznym myszom chroni przed miażdżycą [25], a podczas badań na człowieku odkryto, że aktywność tiolaktonazy homocysteiny w dużo większym stopniu niż polimorfizm PON1 [26] pozwala przewidzieć chorobę wieńcową. Udowodniono, że wysoki poziom aktywności tiolaktonazowej *in vitro* chroni białka osocza przed N-homocysteinyłacją za pomocą tiolaktonu homocysteiny [23], a HDL hamuje tworzenie tiolaktonu homocysteiny oraz formy N-Hcy-białek w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych *ex vivo* [27]. Aktywność tiolaktonazy homocysteiny jest znacznie wyższa u pacjentów z chorobą wieńcową serca niż u osób zdrowych [3], co sugeruje, że występowanie tej choroby lub jej brak determinuje aktywność tiolaktonazy homocysteiny. Aktywność PON1 w stosunku do tiolaktonu homocysteiny jest podwyższona w grupie osób chorych po przebytych zawałach. Jednocześnie obserwuje się zwiększoną umieralność chorych charakteryzujących się niskim poziomem aktywności tiolaktonazowej [3]. Ponadto zaobserwowano, że aktywność tiolaktonazy homocysteiny PON1 jest skorelowana z podwyższonym stężeniem LDL (ang. *low density lipoproteins*), HDL oraz ich komponentami w przypadku pacjentów cierpiących na CAD, natomiast tej zależności nie stwierdzono u osób zdrowych. To sugeruje, że aktywność tiolaktonazowa może być regulowana w różny sposób u chorych na CAD oraz u osób zdrowych [3].

Modyfikacje strukturalne cząsteczek HDL mają duże znaczenie i wpływ na aktywność tego enzymu. Lipoproteiny o wysokiej gęstości są wrażliwe na modyfikacje strukturalne, takie jak np. utlenianie, glikozylację, homocysteinyłację i degradację enzymatyczną. Zmiany strukturalne cząsteczek HDL mogą wpływać na ich funkcję i właściwości miażdżycocoochronne. Substancje utleniające i modyfikujące, m.in. jony metali, lipoksygenazy, dym papierosowy [28] mogą zmieniać zarówno powierzchnię (białka, fosfolipidy i cholesterol) jak i komponenty rdzeniowe cząsteczek HDL (estry cholesterolowe) [29]. Również mieloperoksydaza, anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot -}$) oraz H_2O_2 , uwalniane przez aktywowane fagocyty, mogą być potencjalnymi czynnikami utleniającymi cząsteczki HDL *in vivo*. Niektórzy badacze wskazują na udział jonów metali przejściowych w mody-

fikacji lipoprotein w obrębie ścian naczyń krwionośnych. Przypuszcza się, że utlenianie cząsteczek HDL *in vivo* ma miejsce w mikrośrodowisku zapalnym, takim jak zmienione miażdżycowo ściany naczyń, a nie w krążącym osoczu. Utlenianie indukuje liczne modyfikacje strukturalne i składu chemicznego cząsteczek HDL.

Modyfikacje cząsteczek HDL prowadzą do zmienionej aktywności biologicznej tych cząsteczek i związanych z nimi enzymów. Zaobserwowano znaczne obniżenie aktywności paraoksonazy we frakcji utlenionych cząsteczek HDL [30, 31] i zasugerowano, że inaktywacja PON1 może być przyczyną obniżonego efektu ochronnego przeciw cząsteczkom LDL i utlenianiu błony komórkowej [30]. Powodują one także utratę właściwości przeciwzapalnych i ochronnych komórek. Zmiany strukturalne w cząsteczkach HDL mogą odgrywać rolę w patogenezie miażdżycy i chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera.

Interesujące są obserwacje, z których wynika, że toksyczność homocysteiny może być związana z jej wpływem na poziom HDL we krwi. Wykazano na przykład, że u ludzi obniżenie stężenia białkowych składników HDL, takich jak PON1 [32] i ApoAI [33] związane jest ze wzrostem stężenia homocysteiny. Najprawdopodobniej homocysteina wpływa hamująco na ekspresję genów tych białek. W badaniach prowadzonych na hodowlach komórkowych wykazano, że homocysteina obniża aktywność promotorów PON1 [32] i ApoAI [33].

Homocysteina i pokrewne aminotiole, kwas homocystynowy, kwas cystynowy, sulfonian homocysteiny i sulfonian cysteiny, które prawdopodobnie mogą być produktami przejściowymi szlaku katabolizmu homocysteiny, zostały opisane jako neurotoksyny. Sugeruje się, że związki te działają przez nadmierną stymulację receptorów NMDA (jonotropowy receptor kwasu glutaminowego) w neuronach. Neurony wykazują fenotypowe podobieństwo do komórek beta trzustki [34]. W związku z tym zbadano wpływ homocysteiny, tiolaktonu homocysteiny oraz aminotiole na wydzielanie insuliny w odpowiedzi na glukozę [34]. W wcześniejszych badaniach wykazano, że tiolakton homocysteiny niekorzystnie wpływa na funkcje insuliny w komórkach trzustki [35]. Zarówno homocysteina jak i tiolakton homocysteiny są toksyczne dla wielu linii komórkowych, włącznie z komórkami śródbłonna. Tiolakton homocysteiny jest bardziej efektywny niż homocysteina: śmierć komórek obserwuje się przy niższych stężeniach tiolaktonu homocysteiny niż samej homocysteiny [27].

Homocysteina upośledza podstawowe, jak i stymulowane glukozą wydzielanie insuliny, w sposób zależny od stężenia [36]. Wpływ aminotiole na funkcję komórek beta trzustki jest łagodniejszy niż wpływ homocysteiny. To sugeruje, że negatywny wpływ homocysteiny nie jest spowodowany przez jej utlenianie do aminotiole, ale może raczej polegać na konwersji homocysteiny do tiolaktonu homocysteiny. Ten cykliczny tioester wykazuje podobny, zależny od stężenia, wpływ na wydzielanie insuliny. Ponadto jego poziom jest wprost proporcjonalny do poziomu homocysteiny [17]. Zarówno homocysteina jak i tiolakton homocysteiny znacząco redukują stymulujący efekt L-alaniny, KCl, Ca^{2+} ,

GLP-1, forskolinu i PMA (ang. *phorbol 12-myristate 13-acetate*) na wydzielanie insuliny. Potwierdza to hipotezę, że Hcy wpływa ujemnie na funkcję trzustkowych komórek beta i wydzielanie insuliny, skoro jej tioester wywołuje podobny efekt hamujący na wydzielanie insuliny w odpowiedzi na podstawowe stymulatory wydzielania tego hormonu.

CZY PRZYJMOWANIE WITAMIN CHRONI PRZED UDAREM MÓZGU?

Terapia witaminowa kwasem foliowym, pirydoksyną (witamina B₆) oraz kobalamina (witamina B₁₂) redukuje poziom homocysteiny i przywraca funkcjonalność śródbłonna naczyń krwionośnych. W latach 1996–2003, w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, a także w Szkocji przeprowadzono badania wpływu przyjmowania witamin B₆, B₁₂ oraz kwasu foliowego na całkowitą zawartość homocysteiny [1]. Przebadano 2155 pacjentów (37% kobiet), ze średnią wieku 66 ± 10,7 lat. Wyeliminowano tych pacjentów, u których poziom witaminy B₁₂ był bardzo niski lub bardzo wysoki (<250 i > 637 pmol/l), aby wykluczyć efekt złego wchłaniania lub przyjmujących witaminę B₁₂ dodatkowo, poza terapią, a także tych z nieprawidłowym funkcjonowaniem nerek. Zaobserwowano, że poziom całkowitej homocysteiny w osoczu znacząco wzrasta kiedy stężenie B₁₂ spada poniżej średniego. Poziom B₁₂ warunkujący niskie stężenia homocysteiny jest wyższy niż zwykle uznawany za normalny. Z porównania grup przyjmujących dużą i małą dawkę witamin wynika, że następuje 21% obniżenie ryzyka w grupie przyjmującej zwiększoną dawkę witamin. W analizie Kaplana-Meiera, porównującej 4 grupy, pacjenci u których określono poziom B₁₂ jako średni lub wyższy niż średni i przyjmujący dużą dawkę witamin B₆, B₁₂ i kwasu foliowego, osiągnęli najlepsze wyniki jeśli chodzi o obniżenie ryzyka udaru mózgu, choroby wieńcowej czy śmierci. Natomiast ci, u których poziom B₁₂ był poniżej średniej, a poddani byli terapii małą dawką witamin, osiągnęli najgorsze wyniki. Jak się okazało podczas analiz, grupa pacjentów ze średnim poziomem witaminy B₁₂ miała największe szanse na pozytywne efekty tej terapii. Wydaje się prawdopodobne, że przyczyną lepszej odpowiedzi na terapię u pacjentów z poziomem B₁₂ powyżej średniej jest lepsza zdolność jej absorpcji. Paradoksalnie, osoby z wysokim poziomem homocysteiny, ale o upośledzonej zdolności wchłaniania witaminy B₁₂, nie mogły skorzystać z terapii witaminowej.

Wzbogacanie produktów zbożowych w kwas foliowy w Stanach Zjednoczonych i Kanadzie od 1996r. spowodowało wzrost stężenia kwasu foliowego i spadek stężenia homocysteiny we krwi, a co za tym idzie, odnotowano spadek śmiertelności z powodu udaru mózgu [37].

Wald i wsp. [38] ustalili, że redukcja poziomu homocysteiny o 3 μmol/l wiązałyby się z 24% spadkiem ryzyka udaru mózgu oraz 16% spadkiem ryzyka CAD. Natomiast zastosowana terapia witaminowa pozwoliła na zaobserwowanie korelacji pomiędzy wyższym poziomem homocysteiny a ryzykiem powtórnego wylewu; zostało ono zmniejszone w grupie przyjmującej wysoką dawkę witamin. W dobie wzbogacania produktów zbożowych o kwas foliowy, odpowiedź na terapię witaminową, czyli obniżenie całkowitej zawartości homocysteiny, jest w większym stopniu zależna

od witaminy B₁₂. Większe dawki tej witaminy (obok innych terapii) będą niezbędne do osiągnięcia optymalnej redukcji homocysteiny.

Podwyższony poziom homocysteiny może wywołać odpowiedź autoimmunologiczną *in vivo*. Wykazano, że przeciwciała przeciwko N-Hcy-białkom są powiązane z udarem mózgu [39], a także z wczesną postacią choroby niedokrwiennej serca u ludzi [40]. Undas i wsp. [41] zbadali wpływ przyjmowania kwasu foliowego (1 mg dziennie) na poziom przeciwciał przeciwko formie N-Hcy albuminy oraz formie N-Hcy hemoglobiny. Przeprowadzono badania z udziałem 20 zdrowych mężczyzn oraz 12 pacjentów z chorobą niedokrwinną serca, przy czym w obu grupach stwierdzono hiperhomocysteinemię (poziom całkowitej homocysteiny >15 μM). Ponadto obie grupy nie różniły się, jeśli chodzi o wiek, poziom: całkowitej homocysteiny, kwasu foliowego, witaminy B₁₂ oraz profil lipidów. Jedyną różnicą pomiędzy pacjentami chorymi na chorobę niedokrwinną serca a zdrowymi osobami był poziom przeciwciał IgG przeciw formie N-Hcy albuminy. Przyjmowanie kwasu foliowego przez 3 miesiące doprowadziło do redukcji poziomu homocysteiny o około 30% oraz wzrostu poziomu kwasu foliowego w osoczu o ok. 230% w obu grupach. Dalsza 3-miesięczna kuracja nie zmieniła tych wartości. Poziom przeciwciał zarówno przeciw formie N-Hcy albuminy jak i formie N-Hcy hemoglobiny znacząco spadł po 3-miesięcznej terapii kwasem foliowym u zdrowych osób. Natomiast u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca nie zaobserwowano znaczącej redukcji poziomu tych przeciwciał. Dalsze 3 miesiące terapii również nie dały rezultatu w postaci dalszego obniżenia poziomu przeciwciał, zarówno u pacjentów, jak i osób zdrowych. Jednakże wyjściowy poziom homocysteiny i jej obniżenie zaindukowane kwasem foliowym było bardzo podobne w obu grupach. Co więcej, okazało się, że poziom przeciwciał przeciw formie N-Hcy albuminy jest raczej związany z ilością kwasu foliowego obecnego w osoczu, a nie z zawartością całkowitej homocysteiny u zdrowych osób wykazujących hiperhomocysteinemię [41].

U osób zdrowych przed terapią zaobserwowano znaczną korelację pomiędzy poziomem homocysteiny a poziomem przeciwciał przeciw formie N-Hcy albuminy i N-Hcy hemoglobiny. Poziom kwasu foliowego przed terapią wykazywał negatywną korelację z tymi przeciwciałami, zarówno u osób zdrowych, jak i pacjentów z chorobą niedokrwinną serca. Terapia kwasem foliowym spowodowała zanik korelacji pomiędzy całkowitą zawartością homocysteiny a przeciwciałami u zdrowych osób. Jednakże u chorych z chorobą niedokrwinną serca po terapii zaobserwowano silny związek między całkowitą zawartością homocysteiny a przeciwciałami przeciw formom N-Hcy albuminy i N-Hcy hemoglobiny.

Brak wpływu kwasu foliowego (pomimo iż z wysoką efektywnością redukuje on poziom homocysteiny) na poziom przeciwciał przeciwko formie N-Hcy białek u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca sugeruje, że zaawansowane zmiany patogenne nie mogą być zniwelowane przez terapię obniżającą całkowitą zawartość homocysteiny [41]. Z drugiej strony, obserwacje że kwas foliowy obniża poziom przeciwciał przeciwko N-Hcy białkom sugerują, iż

początkowe zmiany patogenne (które mogą zachodzić u potencjalnie zdrowych osób) są odwracalne. W tym kontekście, zapobiegawcza terapia obniżająca poziom homocysteiny byłaby wskazana.

UWAGI KOŃCOWE

W tym artykule przedstawiono wyniki najnowszych badań dotyczących toksyczności homocysteiny oraz jej cyklicznego tioestru – tiolaktonu homocysteiny w kontekście chorób człowieka. Tiolakton modyfikując fibrynogen, zaburza jego biologiczną funkcję, tym samym utrudniając prawidłową hydrolizę skrzepów i przyczyniając się do rozwoju zakrzepicy (trombozy). Znaczny wzrost poziomu N-homocysteinyloowanych białek obserwuje się u pacjentów z chorobami nerek, u których zaobserwowano zmianę funkcji albuminy. Wykazano również negatywny wpływ tiolaktonu homocysteiny na funkcję komórek trzustki i wydzielanie insuliny. Bardzo ważnym elementem metabolizmu tiolaktonu homocysteiny jest frakcja HDL osocza, z którą jest związany enzym hydrolizujący tiolakton (tiolaktonaza/paraoksonaza). Aktywność tiolaktonazy homocysteiny jest znacznie wyższa u pacjentów z chorobą wieńcową serca niż u osób zdrowych, co sugeruje, że występowanie tej choroby lub jej brak determinuje aktywność tiolaktonazy homocysteiny. Lipoproteiny o wysokiej gęstości są wrażliwe na modyfikacje strukturalne za pośrednictwem różnych mechanizmów, a zmiany strukturalne cząsteczek HDL mogą wpływać na zmienioną aktywność biologiczną związanych z nimi enzymów, łącznie z paraoksonazą.

Przeciwdziałanie negatywnym skutkom wysokiego poziomu homocysteiny, a co za tym idzie, tiolaktonu homocysteiny, może być częściowo dokonane przez stosowanie terapii witaminami B₆, B₁₂ oraz kwasem foliowym. Na podstawie wyników badań przeprowadzonych w USA, Kanadzie, a także w Anglii i Walii, można sądzić, że terapia taka pozwala na spadek ryzyka udaru mózgu oraz choroby wieńcowej.

Opisane najnowsze doniesienia potwierdzają hipotezę, że przyczyną patogeniczności homocysteiny u człowieka jest jej wbudowywanie do białek. Niniejsza praca wskazuje na duże znaczenie badań nad tiolaktonem homocysteiny w wyjaśnieniu patogenezy wielu chorób człowieka. Mimo dużego postępu wiele ważnych zagadnień dotyczących toksyczności homocysteiny pozostaje nie wyjaśnionych.

PIŚMIENNICTWO

1. Spence JD, Bang H, Chambless LE, Stampfer MJ (2005) Vitamin Intervention For Stroke Prevention trial: an efficacy analysis. *Stroke* 36: 2404-2409
2. Jakubowski H (2006) Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr* 136: 1741S-1749S
3. Domagała TB, Łacinski M, Trzeciak WH, Mackness B, Mackness MI, Jakubowski H (2006) The correlation of homocysteine-thiolactonase activity of the paraoxonase (pon1) protein with coronary heart disease status. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 52: 3-9
4. Jakubowski H (2004) Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci* 61: 470-487
5. Jakubowski H (2005) Anti-N-homocysteinyloated protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med* 43: 1011-1014
6. Turski WA, Bald E (2005) Mechanizm molekularny biotoksyczności homocysteiny – fakty i hipotezy. *Postepy Biochem* 51: 396-406
7. Danesh J, et al. Fibrinogen Studies Collaboration (2005) Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *Jama* 294: 1799-1809
8. Undas A, Brozek J, Jankowski M, Siudak Z, Szczeklik A, Jakubowski H (2006) Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resistance to lysis in human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1397-1404
9. Dunn EJ, Ariens RA, Grant PJ (2005) The influence of type 2 diabetes on fibrin structure and function. *Diabetologia* 48: 1198-1206
10. Collet JP, Park D, Lesty C, Soria J, Soria C, Montalescot G, Weisel JW (2000) Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1354-1361
11. Collet JP, Lesty C, Montalescot G, Weisel JW (2003) Dynamic changes of fibrin architecture during fibrin formation and intrinsic fibrinolysis of fibrin-rich clots. *J Biol Chem* 278: 21331-21335
12. Sauls DL, Lockhart E, Warren ME, Lenkowski A, Wilhelm SE, Hoffman M (2006) Modification of fibrinogen by homocysteine thiolactone increases resistance to fibrinolysis: a potential mechanism of the thrombotic tendency in hyperhomocysteinemia. *Biochemistry* 45: 2480-2487
13. Jakubowski H (1999) Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J* 13: 2277-2283
14. Jakubowski H (2002) Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine-linked disease. *J Biol Chem* 277: 30425-30428
15. Sauls DL, Wolberg AS, Hoffman M (2003) Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia. *J Thromb Haemost* 1: 300-306
16. Sauls D, Hoffman, M, Allen J (2003) Diet induced hyperhomocysteinemia in rabbits impairs fibrinolysis. *FASEB J* 17: A330-A330
17. Jakubowski H (2000) Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J Nutr* 130: 3775-3815
18. Glowacki R, Jakubowski H (2004) Cross-talk between Cys34 and lysine residues in human serum albumin revealed by N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 279: 10864-10871
19. Perna AF, Satta E, Acanfora F, Lombardi C, Ingrosso D, De Santo NG (2006) Increased plasma protein homocysteinylation in hemodialysis patients. *Kidney Int* 69: 869-876
20. Mallamaci F, Zoccali C, Tripepi G, Fermo I, Benedetto FA, Cataliotti A, Bellanuova I, Malatino LS, Soldarini A (2002) Hyperhomocysteinemia predicts cardiovascular outcomes in hemodialysis patients. *Kidney Int* 61: 609-614
21. Chwatko G, Jakubowski H (2005) The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma. *Anal Biochem* 337: 271-277
22. Kraus LM, Kraus AP Jr (2001) Carbamylation of amino acids and proteins in uremia. *Kidney Int Suppl* 78: S102-107
23. Jakubowski H, Ambrosius WT, Pratt JH (2001) Genetic determinants of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for atherosclerosis. *FEBS Lett* 491: 35-39
24. Jakubowski H (2000) Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 275: 3957-3962
25. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, Lusis AJ, Shih DM (2002) Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 106: 484-490
26. Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J (2004) Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet* 363: 689-695

27. Jakubowski H, Zhang L, Bardeguet A, Aviv A (2000) Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis. *Circ Res* 87: 45-51
28. Ferretti G, Bacchetti T, Negre-Salvayre A, Salvayre R, Dousset N, Curatola G (2006) Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis* 184: 1-7
29. Marsche G, Hammer A, Oskolkova O, Kozarsky KF, Sattler W, Malle E (2002) Hypochlorite-modified high density lipoprotein, a high affinity ligand to scavenger receptor class B, type I, impairs high density lipoprotein-dependent selective lipid uptake and reverse cholesterol transport. *J Biol Chem* 277: 32172-32179
30. Ferretti G, Bacchetti T, Busni D, Rabini RA, Curatola G (2004) Protective effect of paraoxonase activity in high-density lipoproteins against erythrocyte membranes peroxidation: a comparison between healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2957-2962
31. Jaouad L, Milochevitch C, Khalil A (2003) PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity. *Free Radic Res* 37: 77-83
32. Lacinski M, Skorupski W, Cieslinski A, Sokolowska J, Trzeciak WH, Jakubowski H (2004) Determinants of homocysteine-thiolactonase activity of the paraoxonase-1 (PON1) protein in humans. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50: 885-893
33. Mikael LG, Genest J Jr, Rozen R (2006) Elevated homocysteine reduces apolipoprotein A-I expression in hyperhomocysteinemic mice and in males with coronary artery disease. *Circ Res* 98: 564-571
34. Patterson SFP, McClenaghan NH (2006) Homocysteine and other structurally-diverse amino thiols can alter pancreatic beta cell function without evoking cellular damage. *Biochim Biophys Acta* 1760: 1109-1114
35. Najib S, Sanchez-Margalet V (2001) Homocysteine thiolactone inhibits insulin signaling, and glutathione has a protective effect. *J Mol Endocrinol* 27: 85-91
36. McClenaghan NH, McCluskey JT, Flatt PR, Patterson S (2004) Homocysteine, a metabolic syndrome risk factor, exerts detrimental effects on insulin secretion and pancreatic beta cell function. *Diabetologia* 47: A171
37. Yang Q, Botto LD, Erickson JD, Berry RJ, Sambell C, Johansen H, Friedman JM (2006) Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002. *Circulation* 113: 1335-1343
38. Wald DS, Law M, Morris JK (2002) Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 325: 1202
39. Undas A, Perla J, Lacinski M, Trzeciak W, Kazmierski R, Jakubowski H (2004) Autoantibodies against N-homocysteinylation proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke* 35: 1299-1304
40. Undas A, Jankowski M, Twardowska M, Padjas A, Jakubowski H, Szczeklik A (2005) Antibodies to N-homocysteinylation albumin as a marker for early-onset coronary artery disease in men. *Thromb Haemost* 93: 346-350
41. Undas A, Stepien E, Glowacki R, Tisonczyk J, Tracz W, Jakubowski H (2006) Folic acid administration and antibodies against homocysteinylation proteins in subjects with hyperhomocysteinemia. *Thromb Haemost* 96: 342-347

The role of homocysteine thiolactone in some of human diseases

Marta Sikora^{1,3}, Tomasz Twardowski¹, Hieronim Jakubowski^{1,2}

¹Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences

²University of Medicine and Dentistry of New Jersey, New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Newark, New Jersey 07103, USA

³Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, 12/14 Noskowskiego St., 61-704 Poznań, Poland; e-mail: martas@ibch.poznan.pl

Key words: homocysteine thiolactone, N-homocysteinylation of proteins, human diseases

ABSTRACT

In the present article we discuss the most recent data regarding the role of homocysteine, its cyclic thioester – homocysteine thiolactone and the process of protein N-homocysteinylation in human disease. The protective role of thiolactonase/paraoxonase enzyme, carried on high density lipoproteins (HDL) in human blood, as well as the influence of structural modifications on HDL function are discussed. We also describe the effect of vitamin therapy (folic acid, vitamins: B₆, B₁₂) used for lowering the homocysteine level in humans as well.

Immunoproteomika *Helicobacter pylori* – zastosowanie w diagnostyce i profilaktyce

Paula Roszczenko

Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl, tel.: (022) 55 41 216

Słowa kluczowe: *Helicobacter pylori*, immunoproteomika, diagnostyka, profilaktyka

STRESZCZENIE

Helicobacter pylori – to gramujemna pałeczka będąca czynnikiem etiologicznym stanów zapalnych, wrzodów żołądka i dwunastnicy oraz choroby nowotworowej żołądka. Choć patogenem tym zarazona jest ponad połowa populacji ludzkiej tylko u pewnego procentu osób dochodzi do rozwoju poważnych objawów chorobowych. Poznanie sekwencji nukleotydowej genomów dwóch szczepów *Helicobacter pylori* (26695 i J99) ukazało różnorodność genetyczną przedstawicieli tego gatunku bakterii i umożliwiło rozpoczęcie badań nad jego proteomem. Stosowana obecnie terapia antybiotykowa nie zawsze okazuje się skuteczna, a dostępne testy diagnostyczne potwierdzają tylko obecność *Helicobacter pylori*. Immunoproteomika jest techniką łączącą metody klasycznej proteomiki z wykorzystaniem immunologicznej identyfikacji antygenów. Wydaje się ona być odpowiednią strategią umożliwiającą identyfikację nowych antygenów o potencjalnej wartości diagnostycznej i profilaktycznej. Wytypowanie nowych antygenów powinno doprowadzić do stworzenia wiarygodnych testów diagnostycznych umożliwiających określenie ryzyka rozwoju konkretnej jednostki chorobowej u zainfekowanych pacjentów. Jednocześnie identyfikacja silnie immunogennych, powierzchniowych białek o zachowanej w ewolucji sekwencji aminokwasowej powinna umożliwić stworzenie skutecznych preparatów profilaktycznych.

WPROWADZENIE: CHARAKTERYSTYKA PATOGENU, OBJAWY CHOROBY

Helicobacter pylori jest mikroaerofilną, ruchliwą, gramujemną, spiralną pałeczką, przedstawicielem klasy Epsilonproteobacteria, do której należą także rodzaje *Campylobacter* i *Wolinella*. Do rodzaju *Helicobacter* należą, poza najdokładniej przebadanym *H. pylori*, także wiele innych gatunków izolowanych z układu pokarmowego zwierząt (np. psów, kotów, fretek): *H. canis*, *H. felis*, *H. mustelae*. Poszczególne gatunki charakteryzują się silnie zaznaczonym tropizmem gatunkowym; patogenami człowieka są między innymi *H. pylori* oraz *H. hepaticus* [1]. Mikroorganizmy rodzaju *Helicobacter* izolowane były z przewodu pokarmowego zwierząt i ludzi już stosunkowo dawno (od końca XIX wieku), ale dopiero w 1982 roku dwóm australijskim naukowcom (Barry Marshall i Robert Warren) udało się wyhodować *H. pylori* na sztucznych podłożach i udowodnić, że patogen spełnia tzw. postulaty Kocha [2]. Za wyjaśnienie roli *H. pylori* w indukcji stanu zapalnego błony śluzowej żołądka oraz choroby wrzodowej obaj naukowcy zostali w 2005 roku uhonorowani nagrodą Nobla z dziedziny fizjologii i medycyny. Badania przeprowadzone przez australijskich uczonych doprowadziły do wprowadzenia terapii antybiotykowej w leczeniu stanów zapalnych żołądka i choroby wrzodowej. Mikroorganizmem *H. pylori* zakażone jest ponad 50% ludzkiej populacji. W krajach rozwijających się odsetek zakażonych sięga nawet 90%. W Europie wynosi około 35%, w Polsce 87%. Infekcja nabyta przeważnie we wczesnym dzieciństwie utrzymuje się przez całe życie człowieka [3]. *H. pylori* jest czynnikiem etiologicznym stanów zapalnych oraz choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy. Obecnie nie ma też wątpliwości, że chroniczna infekcja *H. pylori* jest poważnym czynnikiem ryzyka rozwoju raka żołądka (ang. *adenocarcinoma*) i chłoniaka żołądka typu MALT. U około 5% zainfekowanych osób kolonizacja błony śluzowej żołądka przez *H. pylori* skutkuje rozwojem choroby nowotworowej nawet w 50 lub więcej lat od momentu zakażenia. Rak żołądka jest drugim pod względem częstości występowania nowotworem złośliwym na świecie a choroba ta jest przyczyną 10% wszystkich przypadków śmiertelnych powodowanych przez nowotwory. W 1994 r. Światowa Organizacja Zdrowia zaliczyła *H. pylori* do I klasy nowotworogennych. Pomimo wielu lat badań mechanizm patogenetyczny, a w szczególności mechanizm indukcji zmian nowotworowych stymulowanych zakażeniem *H. pylori* nie jest w pełni zrozumiały. Występowanie konkretnej jednostki chorobowej, bez wątplenia, zależne jest od genotypu zarówno patogenu jak i organizmu gospodarza oraz od czynników środowiskowych.

Czynniki wirulencji odpowiedzialne za zwiększone ryzyko rozwoju raka żołądka to: polimorfizm genu *vacA* (ang. *vacuolating cytotoxin*), obecność w geno-

mie i struktura genetyczna wyspy patogenności PAI oraz występowanie genów kodujących różnorodne adhezyny jak np. *babA* (ang. *blood-group antigen-binding*), kodujący adhezynę wiążącą się z antygenami Lewis B na powierzchni komórek nabłonkowych. Cytotoksyna wakuolizująca *VacA*, oligometryczne białko sekrecyjne, warunkuje powstanie endosomalnych wakuoli w cytosolu komórek nabłonkowych żołądka i dodatkowo wpływa w różnorodny sposób na aktywność komórek układu immunologicznego [4]. Wyspa patogenności, obszar chromosomu o dużej zmienności pod względem liczby zawartych genów, koduje białka budujące aparat sekrecyjny typu IV. Markerem jej obecności w genomie *H. pylori* jest gen *cagA* (ang. *cytotoxin-associated gene*), kodujący białko CagA, które po przekazaniu do komórki nabłonkowej żołądka ulega fosforylacji przez tyrozynową kinazę białkową Src, a następnie, po wbudowaniu w błonę komórki, wiąże się z eukariotycznymi białkami, między innymi z tyrozynową fosfatazą SHP-2 (ang. *Src homology 2 (SH2) domain containing protein-tyrosine phosphatase*). Proces ten prowadzi do aktywacji wielu szlaków przekazywania sygnału [5]. Gen *cagA* podobnie do *vacA* charakteryzuje się wysokim polimorfizmem dotyczącym głównie obszarów kodujących motywy podlegające fosforylacji [6]. Częstoczkami efektorowymi układu sekrecyjnego są także fragmenty rozpadu peptydoglikanu stymulujące wewnątrzkomórkowe receptory NOD (ang. *nucleotide-binding oligomerization domain proteins*), co skutkuje aktywacją czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (ang. *nuclear factor κ B*) i produkcją cytokin stanu zapalnego [7]. Receptory NOD należą do grupy białek określanych jako PRR (ang. *pattern recognition receptors*), zdolnych do selektywnego rozpoznawania konkretnych, konserwatywnych związków charakterystycznych dla mikroorganizmów tzw. PAMP (ang. *pathogen-associated molecular patterns*), takich jak np. lipoproteiny, flagellina czy LPS. W przeciwieństwie do większości szczegółowo już przebadanych przedstawicieli PAMP, różnych klas receptorów TLR (ang. *Toll-like receptors*) umiejscowionych w błonie komórek, receptory NOD są białkami cytosolowymi [8].

Kliniczne izolaty *H. pylori* przyporządkowano do dwu grup tzw. typu I i typu II. Szczepy wykazujące aktywność wakuolizującą i wytwarzające białko CagA, fenotypowo CagA⁺ i VacA⁺ należą do typu I. Szczepy typu II nie zawierają w genomie genu *cagA* i nie wyrażają aktywności wakuolizującej, chociaż jak wykazano metodami hybrydyzacyjnymi, zawierają sekwencje homologiczne do *vacA*. Szczepy Tox⁺CagA⁺ (Tox – wytwarzający toksynę VacA) z wyższą częstością izolowane są od pacjentów z objawami wrzodów żołądka lub atroficznego stanu zapalnego, niż od osób zainfekowanych *H. pylori* i nie wykazujących powyższych objawów chorobowych. W ostatnich latach przy zastosowaniu mikromacierzy przeprowadzono badania zależności indukowanych infekcją objawów chorobowych oraz wpływu patogenu na ekspresję genów komórek gospodarza od składu genetycznego wyspy patogenności. Wykazały one, że zaklasyfikowanie konkretnego szczepu do typu I lub II winno opierać się na analizie składu genetycznego wyspy patogenności a nie tylko na przebadaniu obecności genu *cagA* [9, 10]. Czytelnikom zainteresowanym analizą czynników wirulencji jak i różnorodnych aspektów mechanizmów patogenezы *H. pylori* polecamy kilka prac przeglądowych [4,11-14].

GENOMY SZCZEPÓW *HELICOBACTER*

W 1997 roku została opublikowana pierwsza pełna sekwencja nukleotydowa genomu *H. pylori* szczepu 26695, wyizolowanego od pacjenta z chronicznym zapaleniem błony śluzowej żołądka [15], a dwa lata później zsekwencjonowano genom szczepu J99 [16] - szczep od chorego cierpiącego na wrzody dwunastnicy. Obydwa szczepy mają genomy w postaci kolistego chromosomu o zbliżonej wielkości 1,67 Mb - szczep 26695 i 1,64 Mb - szczep J99. Obszary kodujące zajmują odpowiednio 91% i 90,8% genomu szczepu 26695 i J99. Zawartość par GC w obu szczepach jest jednakowa i wynosi 39%, ale zarówno genom szczepu 26695 jak i J99 posiadają obszary o odmiennej zawartości par GC [17]. 23% genów *H. pylori* nie posiada homologów w materiale genetycznym innych organizmów żywych, są to geny unikatowe dla tego gatunku bakterii [16]. Porównanie sekwencji nukleotydowych tych dwóch szczepów *H. pylori* wykazało obecność 6-7% genów szczepowo-specyficznych. Celem doświadczenia przeprowadzonego przez Salama i wsp. [18] w 2000 roku było wyjaśnienie różnorodności genetycznej *H. pylori*. Wykorzystano w nim technikę mikromacierzy DNA do analizy genomów 15 klinicznych izolatów, pochodzących od pacjentów z różnych rejonów geograficznych, z różnymi objawami chorobowymi, a także z przypadków asymptomatycznych. Okazało się, że 1281 genów (ok. 78%) obecnych było we wszystkich szczepach; uznano je za geny konieczne do funkcjonowania organizmu. Pozostałe geny (168 - 175) kodowały m.in. białka zaangażowane w proces restrikcji i modyfikacji DNA, białka błonowe i transpozazy. Liczbę 1281 zawężono ostatecznie, po przebadaniu metodą porównawczej hybrydyzacji genomów 54 szczepów *H. pylori*, do 1111 genów [19]. Zastosowanie mikropaneli i weryfikacja otrzymanych danych metodą PCR i sekwencjonowania potwierdziły także wysoki poziom zmienności sekwencji nukleotydowych genomów *H. pylori* podczas chronicznych infekcji [20].

W roku 2003 zsekwencjonowano genom drugiego gatunku rodzaju *Helicobacter*: *H. hepaticus* ATCC 51449, patogenu wywołującego u myszy chroniczny stan zapalny wątroby skutkujący rozwojem choroby nowotworowej [21]. DNA *H. hepaticus* izolowano także z ludzi z objawami chorób wątroby, lecz bezpośredni związek pomiędzy chorobami nowotworowymi wątroby człowieka a infekcją *H. hepaticus* nie został wykazany. Porównanie genomów tych dwóch gatunków rodzaju *Helicobacter* udokumentowało jak w trakcie procesu ewolucyjnego przystosowały się one do zasiedlania innych nisz ekologicznych. *H. hepaticus* posiada genom zbliżony wielkością do *H. pylori*; 1,79 Mb (1 875 ORF). 938 białek posiada ortologów w proteomie *H. pylori* a 953 w komórkach *C. jejuni*, patogenu kolonizującego pokrewną do *H. hepaticus* niszę ekologiczną (jelito cienkie). 821 białek występuje zarówno w proteomach obu gatunków *Helicobacter* jak i gatunku *C. jejuni*. Pod względem kodowanych czynników wirulencji genom *H. hepaticus* przypomina genom *H. pylori* jak i genom *C. jejuni*. Cechą charakterystyczną dla *H. pylori* i *H. hepaticus* jest aktywność ureazy (enzym rozkładający mocznik do amoniaku i dwutlenku węgla). Amoniak produkowany w wyniku działania ureazy zobojętnia kwaśne środowisko żołądka i umożliwia przeżycie *H. pylori*. Ureaza nie

jest enzymem niezbędnym do kolonizacji wątroby przez *H. hepaticus*, wyjaśnienie jej roli w tym etapie infekcji wymaga dalszych badań. *H. pylori* i *H. hepaticus* posiadają odmienne systemy zdobywania i transportu niklu, pierwiastka niezbędnego do funkcjonowania ureazy. Geny warunkujące transport niklu *H. hepaticus* są ortologami genów *E. coli* nieobecnymi w genomach *H. pylori* i *C. jejuni*. W przeciwieństwie do systemów pobierania i transportu niklu systemy transportu jonów żelaza są podobne w komórkach dwóch badanych gatunków rodzaju *Helicobacter*. W genomie *H. hepaticus* brak jest wielu istotnych czynników wirulencji *H. pylori* (np. genów kodujących toksynę wakuolizującą, genów wyspy patogenności Cag), choć zawiera on ortologii genów *H. pylori* kodujących istotne adhezyny, białka OM (ang. *outer membrane*), należące do dwóch podrodzin Hop i Hor [21]. Z drugiej strony *H. hepaticus* produkuje cytotoksynę CDT wytwarzaną także przez *C. jejuni* oraz posiada ortologii niektórych adhezyn *Campylobacter*. W genomie *H. hepaticus* zidentyfikowano nową wyspę patogenności HHG1 (70 ORF, w większości o nieznannej funkcji). Dane porównawczej genomiki wskazują, że obszar ten może kodować białka aparatu sekrecyjnego typu IV. Ortologii niektórych genów tej wyspy patogenności zidentyfikowano w genomie *C. jejuni* ATCC 43431 [22]. Podobnie też do komórek *Campylobacter*, a inaczej niż w komórkach *H. pylori* w procesie naturalnej transformacji uczestniczyć mogą prawdopodobnie białka biogenezy pili typu IV [21].

Każdy żywy organizm posiada zdolność do regulacji ekspresji swoich genów w odpowiedzi na warunki środowiska. W genomie *H. pylori* stosunkowo niewielka liczba genów (tylko 1.1% wszystkich otwartych ramek odczytu) koduje białka regulujące ekspresję genów, co najprawdopodobniej jest wynikiem wysokiego stopnia przystosowania bakterii do środowiska i braku konkurencji ze strony innych mikroorganizmów. W chromosomie obydwóch szczepów *H. pylori* występuje tylko kilka genów kodujących białka układów dwuskładnikowych biorących udział w procesie przekazywania sygnału. W genomie *H. pylori* znaleziono cztery ortologii HK (kinaza histydynowa) i sześć ortologów RR (białko regulatorowe) [23]. Genom *H. pylori* koduje też zaledwie trzy czynniki sigma RNAP. Wśród przedstawicieli Epsilonproteobacteria najwyższą liczbę genów kodujących białka o funkcjach regulatorowych odnaleziono w genomie *Wolinella succinogenes*, mikroorganizmu będącego komensalem bydła [24].

Obserwowana różnorodność genetyczna klinicznych izolatów *H. pylori* jest prawdopodobnie skutkiem działania kilku różnych mechanizmów: nagromadzenia mutacji punktowych, rearanżacji DNA oraz horyzontalnego transferu genów. Wysoki poziom polimorfizmu genów kodujących dwa istotne czynniki wirulencji *H. pylori*: toksynę VacA i białko CagA wskazuje na istotną rolę nagromadzenia mutacji punktowych w procesie ewolucji genomów *H. pylori*. Fakt ten potwierdzono również przy użyciu strategii MLST (ang. *multi locus sequence typing*) [25]. Udział procesów rekombinacji w generowaniu różnorodności genomów potwierdza obecność elementów insercyjnych (IS 605, IS 606), a efektem horyzontalnego transferu genów jest wyspa patogenności Cag o bardzo zróżnicowanej organizacji genetycznej [17].

PROTEOMY SZCZEPÓW *HELICOBACTER PYLORI*

Określenie pełnej sekwencji nukleotydowej genomów dwóch szczepów *H. pylori* 26695 (1590 ORF) oraz J99 (1495 ORF) umożliwiło przeprowadzenie licznych doświadczeń proteomiki porównawczej, analizy zależności składu proteomów patogenu od warunków wzrostowych oraz oddziaływania pomiędzy białkami. Klasyczny protokół analiz proteomicznych polega na rozdziale mieszaniny białek otrzymanych z całych komórek lub odpowiednich przedziałów komórkowych metodą dwukierunkowej elektroforezy (2-DE) i ich identyfikacji z zastosowaniem różnych metod spektrometrii mas. Metodyka ta, choć niezwykle użyteczna zarówno w badaniach o charakterze poznawczym jak i aplikacyjnym, posiada jednak wiele ograniczeń. Dostatecznie często nie pozwala na identyfikację białek występujących w niedużej ilości oraz hydrofobowych, trudno rozpuszczalnych białek błonowych. Także białka o zasadowym punkcie izoelektrycznym są reprezentowane na niskim poziomie przy zastosowaniu standardowych metod rozdziału. Ten ostatni punkt stanowi istotny problem w eksperymentach analizy proteomów *H. pylori*. Teoretyczna analiza produktów translacji 1590 ORF *H. pylori* wskazuje, że aż 1005 z nich (63,2%) posiada pI wyższy od 7,0, a 543 (34,2%) charakteryzuje się pI wyższym od 9,0 [26].

Liczba zidentyfikowanych metodą dwukierunkowej elektroforezy punktów białkowych przewyższa często liczbę podlegających translacji ORF obecnych w genomach. Przyczyn występowania produktu jednego genu w kilku formach może być wiele. Liczne białka podlegają procesom potranslacyjnych modyfikacji (fosforylacja, glikozylacja czy proteoliza), co powoduje ich obecność w kilku rejonach żelu. Dodatkowo niektóre techniki przygotowywania prób wpływają na modyfikację białek.

Jak dotąd ponad 1800 różnych rodzajów białek *H. pylori* udało się rozdzielić metodą dwukierunkowej elektroforezy [27]. Do najczęściej analizowanych proteomów należą proteomy ze szczepów o zsekwencjonowanych genomach. Analiza białek pochodzących z całych komórek *H. pylori* 26695 rozdzielanych metodą 2-DE na dużych żelach pozwoliła na identyfikację 384 białek, produktów 290 genów [28]. Większość z nich jest produktami 1281 genów stanowiących niezmienny trzon informacji genetycznej tego gatunku, zachowanych w ewolucji pomiędzy różnymi klinicznymi izolatami [29]. Analizowano także skład białkowy szczepu *H. pylori* SS1 zdolnego do kolonizacji przewodu pokarmowego myszy oraz kilku klinicznych izolatów patogenu [30,31]. Badania te potwierdziły różnorodność genetyczną analizowanych szczepów. Zidentyfikowano także wiele homologicznych białek o różnej ruchliwości związanej z różnicami w ich punkcie izoelektrycznym. Efekty te są odzwierciedleniem wysokiego poziomu polimorfizmu kodujących sekwencji nukleotydowych *H. pylori* lub/i potranslacyjnych modyfikacji białek.

Skład proteomu *H. pylori* uzależniony jest od warunków środowiska i fazy wzrostu hodowli bakterii. Trzeba zaznaczyć, że prowadzone badania są jednymi z pierwszych analiz zależności składu proteomu od warunków środowiskowych. Przeważnie dostarczają one wielu infor-

macji, które nie zawsze jesteśmy w stanie wytłumaczyć. W komórkach *H. pylori* hodowanych na podłożu płynnym zaobserwowano spadek ilości białek związanych z procesami syntezy białek i aminokwasów oraz białek biorących udział w procesach detoksykacji komórki w porównaniu z proteomem bakterii hodowanych na podłożach stałych. Odwrotną korelację zaobserwowano dla UreB (ang. *urease beta subunit*) i GroEL (ang. *chaperone; heat shock protein HspB*) [32]. Słoneczewski i wsp. [33] analizowali wpływ pH podłoża na skład białek mikroorganizmu. Stosowano podłoża wzrostowe o pH 5,7 i 7,5. W obu warunkach wzrostowych białkami występującymi w największej ilości były, podobnie jak w badaniach opisanych wyżej, podjednostka ureazy UreB i białko opiekuńcze GroEL. W warunkach kwaśnego pH wyraźnie wzrastała ilość UreB, co potwierdziło wcześniejsze obserwacje dotyczące regulacji ekspresji operonu ureazowego przez pH środowiska. Dodatkowo z komórek mikroorganizmu izolowano białko eukariotyczne, pochodzące z surowicy bydłowej dodawanej do podłoża wzrostowego, apolipoproteinę A-1. Autorzy sugerują, że pobieranie tego białka ułatwia patogenowi pozyskiwanie cholesterolu i syntezę glikozydów cholesterolowych (glikolipidów) stanowiących 25 % lipidów komórki. W warunkach alkalicznych, będących dla *H. pylori* warunkami stresowymi wyraźnie wzrastała ilość białek opiekuńczych GroEL (HspB), GroES (ang. *cochaperone HspA*) oraz białka TsaA (ang. *alkyl hydroperoxidase reductase; 26 kDa antigen*), homologa AhpC (ang. *alkyl hydroperoxidase reductase*) będącego antyoksydantem. W komórkach hodowanych w warunkach stresu tlenowego (20% O₂) zaobserwowano zmiany w poziomie 10 eksprimowanych białek. Wyraźny spadek ilości odnotowano dla UreE (białko opiekuńcze ureazy) oraz AhpC. Uzyskane wyniki potwierdzono także analizą na poziomie RNA (RT-PCR) [34]. Różnice w zmianach poziomu TsaA i AhpC w warunkach stresowych mogą wskazywać na inne substraty tych antyoksydantów.

Proteomy komórek można także analizować w sposób pośredni, metodą mikropaneli, badając zmiany poziomu transkrypcji genów (transkryptomy) w zależności od warunków wzrostu. I tego typu globalne analizy zostały przeprowadzone dla szczepów *H. pylori*. Przebadano wpływ pH środowiska, stężenia jonów żelaza oraz fazy wzrostu hodowli bakteryjnej na poziom transkrypcji genów [35,36,37]. Szczegółowe porównywania tych globalnych analiz wykracza poza tematykę tej pracy przeglądowej. Trzeba jednak podkreślić znaczące rozbieżności pomiędzy wynikami eksperymentów wykonywanych w różnych laboratoriach. Podobnie trudno jest porównywać zależności pomiędzy badanymi transkryptomami i proteomami szczepów hodowanych w podobnych warunkach. W większości przypadków liczba genów, których transkrypcja zależna jest od konkretnego czynnika środowiska znacznie przewyższa liczbę białek, których poziom warunkowany jest tym samym czynnikiem. Obserwowane rozbieżności mogą odzwierciedlać zarówno niedoskonałości stosowanych metod jak i skomplikowane mechanizmy regulacyjne.

Jedną ze strategii stosowanych w celu zwiększenia rozdzielczości analiz prowadzonych metodą 2-DE jest analiza subproteomów, czyli białek zlokalizowanych w różnych przedziałach komórkowych. Zastosowano ją także w od-

niesieniu do proteomów mikroorganizmów rodzaju *Helicobacter*. Otrzymywane dane eksperymentalne winny być wnikliwie analizowane; nie opracowano, bowiem jak dotąd techniki pozwalającej na uzyskanie 100 % rozdziału białek z różnych bakteryjnych frakcji.

Analizy *in silico* pozwoliły na zidentyfikowanie w proteomie *Helicobacter pylori* 26695 160-164 białek będących integralnymi składnikami błon i około 500 białek posiadających sekwencje sygnałowe [38]. Analiza proteomiczna słabo rozpuszczalnych białek błonowych jest szczególnie utrudniona. W ostatnich latach opracowano jednak metody umożliwiające dosyć dokładną analizę tego subproteomu, co pozwoliło na badanie składu białek błony zewnętrznej kilku gatunków bakterii [39,40]. Analiza proteomiczna frakcji białek nierozpuszczalnych w sarkozylu *H. pylori* 26659 przeprowadzona przez Baik i wsp. [41] pozwoliła na rozdział 80 białek, z których zidentyfikowano 62 będące produktami 35 genów. 16 białek zaklasyfikowano jako OMP (ang. *outer-membrane proteins*), podczas gdy analizy *in silico* wskazują na obecność w genomie tego szczepu 32 ORF potencjalnie kodujących białka błony zewnętrznej [15]. Większość OMP *H. pylori* zidentyfikowanych w tym doświadczeniu posiada, w przeciwieństwie do białek OM innych badanych gramujemnych bakterii, zasadowy punkt izoelektryczny.

Backert i wsp. [38] porównywali zestaw rozpuszczalnych (cytosolowych) protein *H. pylori* z białkami związanymi z osłonami komórkowymi. Z rozdzielonych około 1000 białek cytosolowych i 800 błonowych do dalszej analizy wybrano po 50 występujących w dostatecznie dużej ilości w danej frakcji. Choć w większości przypadków konkretne białka występowały w jednej frakcji, to zidentyfikowano pewną grupę tych makrocząsteczek, istotnych czynników wirulencji, obecnych w obu frakcjach komórkowych, co może wyjaśniać opisywane uprzednio kontrowersje dotyczące ich lokalizacji. Tak np. z dwóch, tworzących kompleks, białek opiekuńczych GroEL (HspB) i GroES (HspA), wytwarzanych przez *H. pylori* w dużych ilościach, GroEL było obecne głównie we frakcji osłon komórkowych, podczas gdy białko opiekuńcze GroES występowało w równych ilościach we frakcji rozpuszczalnej i błonowej. Nieoczekiwanie kilka czynników wirulencji (NapA, ang. *neutrophil-activating protein*, KatA, ang. *catalase*, czy Ggt, ang. *gamma-glutamyltranspeptidase*) odnaleziono we frakcji rozpuszczalnej. Autorzy sugerują, że być może lokalizacja tych białek jest modulowana kontaktem z komórkami gospodarza. Dane doświadczalne tej grupy niemieckich naukowców dotyczące analiz proteomicznych subproteomów są dostępne na stronie internetowej <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE>.

Analizowano także sekretom, czyli zestaw białek sekrecyjnych *H. pylori*. Proteomiczna analiza sekrecyjnych białek *H. pylori* nie jest też łatwym zadaniem ze względu na występowanie zjawiska autolizy komórek oraz niską stabilność wydzielanych do środowiska białek. Bumann i wsp. [42] rozdzielili metodą 2-DE 33 białka izolowane z supernatantu hodowli, z czego zidentyfikowano 26. Mechanizm sekrecji nie wszystkich udało się określić. Szesnaście z nich posiada sekwencje sygnałowe, kilka protein to białka związane z biogenezą lub wchodzące w skład aparatu ruchu (III typ transportu). Zidentyfikowano też fragmenty toksyny VacA, będą-

cej autotransporterem. Kilka z sekrecyjnych białek należy do klasy oksydoreduktaz biorących udział we wprowadzaniu mostków dwusiarczkowych do innych białek, co potwierdziło wcześniejsze obserwacje o zdolności patogenu do modyfikacji poziomu wiązań dwusiarczkowych w białkach gospodarza [43]. Sekrecyjnym białkiem okazała się być też serynowa proteaza HtrA, uznawana za opiekuńcze białko peryplazmatyczne. Niewykluczone, że odgrywa ona również rolę w modyfikacji mikrośrodowiska w jakim bytuje patogen. Osiem analizowanych białek nie ma określonej funkcji.

W ostatnich latach opracowano wiele metod pozwalających analizować oddziaływanie pomiędzy białkami zarówno w testach *in vivo* jak i *in vitro*. Należą do nich różnorodne układy dwuhybrydowe, mikromacierze białkowe czy techniki analizy kompleksów białkowych z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa i masowej spektrometrii [44]. Jak dotąd, najczęściej stosowaną strategią jest drożdżowy układ dwuhybrydowy (Y2H, ang. *yeast two hybrid*). Trzeba jednak pamiętać, że wyniki otrzymane przy zastosowaniu tej technologii winny być weryfikowane innymi metodami. Technika drożdżowego układu dwuhybrydowego generuje wiele zarówno pozytywnie jak i negatywnie fałszywych danych wynikających z wielu przyczyn, jak np. niewłaściwego pofałdowania białek czy ich niewłaściwej lokalizacji. *H. pylori* był pierwszym mikroorganizmem patogennym, którego interaktom został przeanalizowany z zastosowaniem Y2H systemu. W doświadczeniach, w których użyto 285 fragmentów DNA jako przynęty, a biblioteka genomowego DNA zawierała 2×10^6 różnorodnych regionów DNA, zidentyfikowano 1 524 oddziaływań pomiędzy białkami [45]. Dane te dostępne są pod adresem internetowym: <http://pim.hybrigenics.com>. Terradot i wsp. [46] potwierdzili wiarygodność prezentowanych danych analizując 17 opisanych oddziaływań pomiędzy 31 białkami metodami biochemicznymi i w 76% otrzymali wyniki pozytywne. Dodatkowo, ich badania zaowocowały wykryciem nowych kompleksów białkowych, głównie związanych ze składnikami aparatu sekrecyjnego typu IV.

ZASTOSOWANIE IMMUNOPROTEOMIKI W DIAGNOSTYCE *HELICOBACTER PYLORI*

KLASYCZNE METODY DIAGNOSTYKI INFEKЦИИ *HELICOBACTER*

Ze względu na powszechne występowanie zakażenia *H. pylori* opracowano wiele metod diagnostycznych [47]. Niestety żadna z nich nie charakteryzuje się odpowiednio wysokim poziomem czułości i swoistości. Techniki diagnostyczne wykrywania zakażenia *Helicobacter pylori* można podzielić na bezpośrednie, czyli inwazyjne, które wymagają wykonania badania endoskopowego z pobraniem wycinka błony śluzowej żołądka i coraz częściej stosowane metody nieinwazyjne. Pierwsze z nich pozwalają nie tylko na udokumentowanie zakażenia, ale także na ocenę zaawansowania stanu zapalnego błony śluzowej żołądka. Obecność patogenu w biopatach potwierdzana jest przy użyciu metod hodowlanych, testu ureazowego oraz testów molekularnych (hybrydyzacja, test PCR z zastosowaniem specyficznych starterów oraz PCR w czasie rzeczywistym, ang. *Real - Time PCR*). Niektóre z nich pozwalają także na ocenę wrażliwości mikroorganizmu na antybiotyki.

Metody nieinwazyjne nie wymagają pobierania wycinków śluzówki i wykonywania endoskopii. Należą do nich: testy oddechowe i testy serologiczne. Te pierwsze polegają na doustnym podaniu pacjentom roztworu mocznika znakowanego izotopem węgla ^{13}C lub ^{14}C . Mocznik w organizmie pacjenta jest rozkładany do amoniaku i dwutlenku węgla (efekt aktywności ureazy), a powstający dwutlenek węgla przenika do krwi i jest wydalany przez płuca. Obecność izotopów węgla mierzona jest w wydychanym powietrzu. Ogólnie dostępne testy serologiczne, głównie testy ELISA, polegają na określeniu obecności specyficznych przeciwciał IgG (anty-*Helicobacter*) we krwi lub kale (HpSA, ang. *H. pylori stool antigen*). Ze względu na stosunkowo długo po eradycji utrzymujący się w organizmie pacjentów wysoki poziom swoistych przeciwciał technika ta nie wykrywa aktualnego zakażenia, a jedynie kontakt z bakterią. Nie umożliwia także rozpoznania konkretnej jednostki chorobowej. Dodatkowo testy ELISA charakteryzują się stosunkowo niską czułością. W badaniach przeprowadzonych przez Mini i wsp. [48] 95,5% surowic pacjentów zaklasyfikowanych jako negatywne w stosunku do *H. pylori* w testach ELISA wykazywało immunoreaktywność z białkami patogenu w testach wykonanych metodą „Western blot”.

Ze stosowanych metod diagnostycznych tylko metody inwazyjne dają możliwość oceny oporności badanych szczepów na antybiotyki, przeprowadzenia analiz genetycznych czy oceny skuteczności terapii (RT-PCR). Przeprowadzenie tego typu analiz wymaga jednak odpowiednio przeszkolonego personelu i odpowiedniego wyposażenia laboratorium.

IMMUNOPROTEOMIKA W DIAGNOSTYCE *H. PYLORI*

Immunoproteomika to technika badań będąca połączeniem metod klasycznej proteomiki z wykorzystaniem immunologicznej identyfikacji antygenów. Elektrotransfer rozdzielonych białek konkretnego mikroorganizmu z żelu poliakrylamidowego na błonę nitrocelulozową i inkubacja z odpowiednią surowicą (surowice pacjentów lub zwierząt doświadczalnych) pozwala na określenie immunoproteomu patogenu.

W pierwszych badaniach prowadzonych pod koniec XX wieku starano się zidentyfikować immunogenne białka *H. pylori* analizując proteomy różnych klinicznych izolatów. W tych eksperymentach porównywano przeważnie wzory antygenowe otrzymane przy użyciu mieszanych surowic od osób zainfekowanych *H. pylori* z tymi otrzymanymi przy zastosowaniu surowic pobranych od osób niezainfekowanych. W 1998 roku McAtee i wsp. [49] badali antygenowość białek szczepu *H. pylori* ATCC 43504 w reakcji z surowicami pobranymi od 14 pacjentów zainfekowanych *H. pylori*. Kontrolę stanowiły białka tego samego patogenu poddane reakcji z mieszaniną surowic od 14 osób niezakażonych. Zidentyfikowano 30 antygenów. Kilka z nich było już wcześniej opisanych, tj. flagellina, ureaza, VacA i CagA, ale udokumentowano immunogenność nowych białek. Występujące w dużej ilości i silnie immunogenne białka obecne były też w proteomach sześciu przebadanych klinicznych izolatów pochodzących z różnych regionów geograficznych (wśród

nich był szczep o zsekwencjonowanym genomie; *H. pylori* 26695. Lock i wsp. [50] porównywali immunoreaktywność białek różnych szczepów *H. pylori* z przeciwciałami klasy IgG i IgA obecnymi w puli surowic od 20 pacjentów z objawami stanu zapalnego żołądka lub choroby wrzodowej. I w tych badaniach nie wykryto różnic pomiędzy szczepami. Większość immunoreaktywnych białek [UreB, TufA, (ang. *elongation factor Tu*; EF-Tu), HspB, FlaA] występowała w postaci kilku izoform. Wykazywały one znaczące różnice w reakcji z przeciwciałami dwóch klas, np. białko HspB reagowało głównie z przeciwciałami IgG a flagellina z dwoma klasami przeciwciał. Niektóre immunogenne białka występują w liszatkach komórek w małej ilości, co utrudnia ich wykrycie przy zastosowaniu klasycznego protokołu proteomicznego. Frakcjonowanie białek z użyciem heparynowej chromatografii powinowactwa pozwala przewyciężyć ten problem. Stosując tę technikę Utt i wsp. [51] w ekstrakcie glicynowym białek referencyjnego szczepu CCUG 17874 zidentyfikowali dwa nowe immunogenne białka *H. pylori*: HP0175 (ang. *cell binding factor-2*) i HP0231 (ang. *heparin binding protein*). Listę zidentyfikowanych do roku 2006 immunogennych białek *H. pylori* zamieszczono w kilku publikacjach [30,31,52].

W celu stworzenia wiarygodnych testów diagnostycznych, dzięki którym będziemy w stanie przewidzieć rozwój konkretnych objawów choroby spowodowanych infekcją *H. pylori*, prowadzi się badania, w których rozdzielone metodą elektroforezy dwukierunkowej białka patogenu poddaje się reakcji z surowicami pacjentów z różnymi objawami chorobowymi. Najistotniejsze wydaje się być poszukiwanie markerów pozwalających na zdiagnozowanie ryzyka rozwoju choroby nowotworowej żołądka. Stworzenie prostej metody diagnostycznej opartej na teście serologicznym pozwoliłoby przeprowadzić „screening” osób zainfekowanych *H. pylori* i wyszukać wśród nich te, u których ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej jest wysokie.

Kimmel i wsp. [53] jako pierwsi podjęli się próby poszukiwania związku pomiędzy profilem antygenowym patogenu (szczep *H. pylori* G27) a rodzajem indukowanej zakażeniem choroby. Porównano wyniki analiz zestawu białek patogenu poddanych reakcji z surowicami otrzymanymi od osób z różnymi objawami chorobowymi: pacjentów ze stanem zapalnym błony śluzowej żołądka, z chorobą wrzodową, z nowotworem żołądka (ang. *adenocarcinoma*) i z chorobą nowotworową tkanki limfatycznej – MALT. Kontrolę stanowiły surowice od pacjentów niezakażonych *H. pylori*. W badaniu zostało zidentyfikowanych łącznie 29 antygenów, z których 9 białek było już opisane uprzednio przez McAtee`ego i wsp. [49]. Wiele ze zidentyfikowanych immunopozytywnych białek okazało się być białkami metabolizmu podstawowego, niektóre z nich o przewidywanej lokalizacji cytoplazmatycznej. Późniejsze analizy proteomu *H. pylori* wykazały jednak, że niektóre z tych białek jak np. białka Hsp są obecne zarówno we frakcji białek rozpuszczalnych jak i związanych z osłonami komórkowymi. Nie udało się wykazać powiązania pomiędzy profilem antygenowym patogenu a indukowanymi zakażeniem objawami chorobowymi.

Podobne doświadczenia przeprowadzili także w roku 2002 roku Haas i wsp. [54]. Obiektem badań był *H. pylori*

26695. Analizując związek pomiędzy specyficzną odpowiedzią immunologiczną a wystąpieniem określonej choroby zastosowano surowice pobrane od pacjentów negatywnych względem *H. pylori* i od pacjentów ze stanem zapalnym błony śluzowej żołądka i ze zdiagnozowaną chorobą wrzodową lub nowotworową. Punkty białkowe rozpoznawane przez surowice (310) stanowiły 17% wszystkich zidentyfikowanych (116 punktów białkowych było rozpoznawanych jedynie przez surowice od osób zainfekowanych *H. pylori*, 156 z większą intensywnością przez surowice osób *H. pylori*-pozytywnych w porównaniu z surowicami od pacjentów *H. pylori*-negatywnych, a 38 z identyczną intensywnością niezależnie od źródła surowicy). Spośród 32 najsilniejszych antygenów dziewięć nie było wcześniej opisanych. Większość antygenów była z dużo większą intensywnością rozpoznawana przez surowice osób *H. pylori*-pozytywnych; a sześć z nich: HP0231, HtrA (ang. *protease*), Cag 3, Cag 26, ClpB (ang. *ATP-dependent protease binding subunit*), HP0795 (ang. *trigger factor*), wyłącznie przez surowice pobrane od osób chorych. W wypadku kilku białek ich immunoreaktywność uzależniona była od izoformy białka. Reakcja białek *H. pylori* z surowicami osób niezakażonych odzwierciedla prawdopodobnie ich podobieństwo immunologiczne do białek innych mikroorganizmów (*Campylobacter*, *Escherichia coli* czy *Salmonella*). Niektóre antygeny były z dużo większą intensywnością i częstotliwością rozpoznawane przez surowice osób z chorobą wrzodową niż od osób ze stanem zapalnym, co może odzwierciedlać różnice w intensywności stanu zapalnego. Zauważono też różnice w intensywności i częstotliwości reakcji niektórych białek z surowicami od pacjentów z chorobą wrzodową w porównaniu z surowicami od pacjentów z chorobą nowotworową. Badania te nie doprowadziły do identyfikacji konkretnych antygenów użytecznych w testach diagnostycznych, ale wskazały na skuteczność stosowanych metod i pozwoliły na wytypowanie białek do dalszych badań.

Minni i wsp. [31] w przeciwieństwie do poprzednich badań porównywali proteomy dwóch różnych klinicznych szczepów G39 (wyzolowany od pacjenta z wrzodami dwunastnicy) i 10K (pochodzący od chorego z nowotworem żołądka). Zidentyfikowano 9 białek, które różniły oba szczepy, a więc mogłyby stać się potencjalnymi znacznikami danej choroby, dwa z nich występowały w obu szczepach, ale w postaci różnych izoform. Proteomika porównawcza pomiędzy szczepami *H. pylori* związanymi z pojawianiem się różnych objawów chorobowych jest zdaniem autorów potencjalnym sposobem do odnalezienia znaczników diagnostycznych, pod warunkiem przebadania dużej liczby szczepów odpowiedzialnych za wywoływanie różnych objawów chorobowych. Scharakteryzowanie profilu białkowego danego szczepu umożliwi także rozpoznanie czy nieskuteczna próba eradykacji patogenu jest spowodowana ciągłą infekcją tym samym szczepem czy jest następstwem infekcji innym. Autorzy dodatkowo do analizy porównawczej proteomów przeprowadzili także immunoproteomiczną analizę w celu identyfikacji profili antygenowych różnych szczepów *H. pylori* stosując surowice pobrane od pojedynczych pacjentów z różnymi objawami chorobowymi (choroba nowotworowa oraz choroba wrzodowa). W badaniu zidentyfikowano 30 antygenów, z czego 21 było już wcześniej opisanych. Niektóre z nich reagowały z surowicami pobranymi od wszystkich pacjentów, niezależnie od zdiagnozowanych objawów

chorobowych. Wśród antygenów rozpoznawanych tylko przez surowice pochodzące od pacjentów z chorobą wrzodową znalazły się białka Ppa (ang. *inorganic pyrophosphatase*) i UreG. Do potencjalnych znaczników raka żołądka można zaliczyć wcześniej już zidentyfikowane, a tu potwierdzone HyuA (ang. *hydantoin utilization protein A*), GroES, TypA (ang. *GTP-binding protein*; homolog BipA o nieznannej funkcji), BipA (ang. *GTP-binding protein*), a także dołączyć do tej listy AhpC i DnaK (ang. *chaperone*; *heat shock protein 70*). Ba-

dania te wykazały zależność odpowiedzi immunologicznej zarówno od szczepu patogenu jak i organizmu gospodarza i jeszcze raz udokumentowały, że zidentyfikowanie uniwersalnego znacznika detekcji choroby nowotworowej wymaga wielu dalszych badań z użyciem klinicznych izolatów a nie tylko szczepów o zsekwencjonowanych genomach. Tabela 1 przedstawia wyniki dotychczasowych badań dotyczących identyfikacji znaczników specyficznych dla konkretnej jednostki chorobowej indukowanej infekcją *H. pylori*.

Tabela 1. Immunogenne białka *Helicobacter pylori* wytypowane jako markery choroby nowotworowej lub/i choroby wrzodowej.

Antygen	Nazwa genu	ORF	Badania Jungblut i wsp. ^{a)} zastosowana surowica			Badania Mini i wsp. ^{b)} zastosowana surowica		
			Hp	c	w	Hp	c	w
Białko opiekuńcze, białko szoku cieplnego*	<i>groEL</i>	HP0010	+	+	+	—	+++	+
Białko opiekuńcze	<i>groES</i>	HP0011	—	+	+	—	+	—
Syntaza cytrynianowa	<i>gltA</i>	HP0026	—	+	—	n	n	n
Dehydrogenaza izocytrynianowa*	<i>icd</i>	HP0027	—	+	—	n	n	n
Białko pomocnicze syntezy ureazy	<i>ureG</i>	HP0068	n	n	n	—	—	+
Podjednostka β ureazy*	<i>ureB</i>	HP0072	—	+	—	—	++	+
Podjednostka α ureazy	<i>ureA</i>	HP0073	+	+	—	n	n	n
Białko opiekuńcze; białko szoku cieplnego	<i>dnaK</i>	HP0109	n	n	n	—	+	—
Flagellina B	<i>flaB</i>	HP0115	n	n	n	—	+++	+
Czynnik 2 wiążący się do komórki		HP0175	—	+	—	n	n	n
Reduktaza fumaranowa*	<i>frdA</i>	HP0192	—	—	+	—	+	—
Białko aktywujące neutrofile	<i>napA</i>	HP0243	n	n	n	—	+	+
Tiolowa peroksydaza, adhezyna	<i>tagD</i>	HP0390	—	+	—	n	n	N
Białko warunkujące tolerancję na penicylinę	<i>lytB</i>	HP0400	—	+	—	n	n	N
Białko wiążące GTP	<i>yihK</i>	HP0480	—	+	—	n	n	N
Syntaza glutaminianowa	<i>glnA</i>	HP0512	—	—	+	n	n	N
Białko Cag PAI*	<i>cag26</i>	HP0547	—	—	+	—	+	+
Reduktaza grupy 3 ketoacylowej związanej z białkiem przenoszącym grupę acylową	<i>fabG</i>	HP0561	—	+	—	n	n	N
Flagellina A	<i>flaA</i>	HP0601	n	n	n	—	+++	+
Pirofosfataza pirofosforanowa	<i>ppa</i>	HP0620	n	n	n	—	—	+
Niehemowa ferrytyna	<i>pfr</i>	HP0653	n	n	n	—	+	+
Białko A wykorzystujące hydantoinę*	<i>hyuA</i>	HP0695	n	n	n	—	+	+
Białko hipotetyczne		HP0697	—	+	—	—	+	+
Akonitaza B*	<i>acnB</i>	HP0779	—	+	—	n	n	N
Podjednostka proteolityczna zależnej od ATP Clp proteazy	<i>clpP</i>	HP0794	n	n	n	+	+	+
Tioredoksyna	<i>trxA</i>	HP0824	n	n	n	—	+	+
Katalaza	<i>katA</i>	HP0875	+	+	—	—	+	—
Hydrogenaza	<i>hypB</i>	HP0900	—	+	+	n	n	N
Białko hipotetyczne		HP0902	n	n	n	—	+	+
Niewrażliwa na tlen nitroreduktaza NAD(P)H		HP0954	—	+	—	n	n	N
Podjednostka γ oksydoreduktazy pirogronian : ferredoksyna		HP1108	—	+	—	n	n	n
Łańcuch α syntazy ATP	<i>atpA</i>	HP1134	n	n	n	—	++	+
Białko Ffh rozpoznające cząsteczki sygnałowe	<i>ffh</i>	HP1152	—	+	—	n	n	N
Flawodoksyna A	<i>fldA</i>	HP1161	—	—	+	—	+	+
L7/L12 białko rybosomalne	<i>rpl7/l12</i>	HP1199	—	+	+	+	+++	+
Tioredoksyna		HP1458	n	n	n	—	+	+
Peryplazmatyczne białko wiążące żelazo*	<i>ceuE</i>	HP1562	—	+	—	n	n	N
Reduktaza wodoronadtlenku alkilowego	<i>ahpC/tsaA</i>	HP1563	n	n	n	—	++	+

Hp – surowica od pacjentów *H. pylori* negatywnych; c – surowica od pacjentów z chorobą nowotworową (*adenocarcinoma*); w – surowica od pacjentów z chorobą wrzodową; ^{a)}w badaniach przeprowadzonych przez Jungbluta i wsp. [30] stosowano szczep *H. pylori* 26695 i surowice: Mpi40(Hp-), Mpi44(c), Mpi54(w); + – pozytywna reakcja; - – brak reakcji; n – nie zidentyfikowano; ^{b)}w badaniach przeprowadzonych przez Mini i wsp. [31] stosowano 3 szczepy *H. pylori*: 328, G39, 10K wyizolowane odpowiednio od pacjentów z stanem zapalnym żołądka, wrzodami dwunastnicy i nowotworem żołądka. Analizowano reakcję białek tych szczepów z 4 różnymi surowicami pobranymi od pacjentów z nowotworem (E1136, F824, F840, F123) i z jedną pochodzącą od pacjenta z chorobą wrzodową (G39). +++ – 9-12 reakcji pozytywnych; ++ – 5-8 reakcji pozytywnych; + – 1-4 reakcji pozytywnych; - – brak reakcji; n – nie zidentyfikowano; * – antygeny wytypowane także w doświadczeniach Haas i wsp. [54] jako markery choroby nowotworowej.

IMMUNOPROTEOMIKA – IDENTYFIKACJA ANTYGENÓW, KANDYDATÓW DO KONSTRUKCJI SKUTECZNYCH SZCZEPIONEK

W skali globalnej *Helicobacter pylori* jest drugim pod względem częstości występowania patogenem człowieka. Infekcja tym mikroorganizmem może skutkować poważnymi objawami chorobowymi. Zastosowanie nawet najbardziej skutecznych terapii antybiotykowych połączonych z podaniem inhibitora pompy protonowej (PPI) prowadzi do eradykacji patogenu tylko u ok. 80% pacjentów. Głównym powodem nieskuteczności terapii jest wzrastająca oporność klinicznych izolatów *H. pylori* na antybiotyki [55]. Terapia jest kosztowna i wymaga zdyscyplinowania pacjenta; część chorych uskarża się również na występowanie skutków ubocznych.

Powszechnie uważa się, że szczepienia byłyby najsukcesyjniejszą metodą zapobiegania zakażeniu *H. pylori* i indukcji wywoływanych przez ten mikroorganizm objawów chorobowych. Rozważane jest użycie dwóch rodzajów szczepionek: szczepionki profilaktycznej, czyli aplikowanej przed zakażeniem *H. pylori* albo terapeutycznej, podawanej osobie już zakażonej. Podawanie drugiego typu szczepionki będzie miało na celu wspomaganie leczenia oraz zapobieganie ponownemu zakażeniu patogennym mikroorganizmem. Użycie szczepionki profilaktycznej budzi wiele kontrowersji. Infekcja nabywana jest głównie przed 3 rokiem życia, a ryzyko zakażenia powyżej 5 roku życia jest niewielkie [56]. Tak więc, ten typ szczepionki powinien być preparatem przeznaczonym dla dzieci. Prowadzenie badań na modelu osób dorosłych opierałoby się na przypuszczeniach, że infekcja jak i szczepionka indukują odpowiedź immunologiczną jednakową u dorosłych i dzieci [57]. Dodatkowo przeprowadzone w ostatnich latach badania epidemiologiczne wykazały, że w krajach rozwiniętych, gdzie na szeroką skalę wprowadzono terapie antybiotykowe, zwiększyła się częstość schorzeń przelyku. W niektórych przypadkach choroba refluksowa przelyku prowadzi do rozwoju tzw. przelyku Barretta, a następnie raka gruczołowego, szcze-

gólnie niebezpiecznej formy raka [58]. Niektórzy naukowcy stawiają hipotezę o ochronnym działaniu infekcji *H. pylori*. Jej potwierdzenie wymaga jednak dalszych długotrwałych badań epidemiologicznych. Tak więc, szczepionka anty-*Helicobacter* będzie prawdopodobnie szczepionką terapeutyczną dla osób z grup podwyższonego ryzyka. Do głównych problemów dotyczących skutecznej i właściwej immunizacji należą: wybór właściwego antygeny lub kombinacji antygenów, wybór drogi podania antygeny i sposobu zaindukowania właściwej odpowiedzi immunologicznej. W celach diagnostycznych poszukiwane są silnie immunogenne białka obecne lub eksprymowane w szczepach wywołujących konkretne objawy chorobowe. W celach profilaktyczno/terapeutycznych zamierzeniem jest zidentyfikowanie wśród klinicznych izolatów białek zachowanych w ewolucji i spełniających kilka kryteriów (wysoki poziom immunogenności, powierzchniowa lokalizacja, wysoki poziom wytwarzania). W doświadczeniach laboratoryjnych i przedklinicznych przetestowano: katalazę, białka Hsp, IceA, BabA, CagA, VacA oraz podjednostki ureazy, ale niektóre z nich w związku z zachowanymi w ewolucji sekwencjami aminokwasowymi indukowały krzyżowe reakcje immunologiczne. Dodatkowo nie wszystkie z wymienionych antygenów są obecne w proteomach wszystkich klinicznych izolatów. I tak np. nie wszystkie szczepy kodują CagA, a Yan i Mao [59] wykazali, że tylko u 65,6% *H. pylori* gen *vacA* ulega ekspresji. Jest wysoce prawdopodobne, że skuteczna szczepionka podjednostkowa będzie zawierała kilka antygenów.

Szczepionka może być podawana drogą doustną jak i pozajelitową. W większości doświadczeń związanych z immunizacją doustną, antygeny były aplikowane razem z adiuwantem. Najczęściej stosowane adiuwanty to różnorodne warianty toksyn LT i CT oraz sole glinu. Pozajelitowa immunizacja to przede wszystkim próby szczepionek DNA związanych z wprowadzeniem wektora plazmidowego, kodującego silnie immunogenne białka *H. pylori* [60,61]. Według Johansson i wsp. [62], którzy porównywali różne drogi immunizacji najbardziej optymalną jest immunizacja doustna, która indukuje odpowiedź specyficzną związaną z

Tabela 2. Charakterystyka potencjalnie ochronnych antygenów *Helicobacter pylori*.

Nazwa	Wykryte metodami proteomicznymi	Wysoki poziom wytwarzania	Wysoki poziom immunogenności	Powierzchniowa lokalizacja
Ureaza A	+	+	+	+
Ureaza B	+	+	+	+/-
Katalaza	+	+	+	+
HspA	+	+	-	+/-
HspB	+	+	+	+/-
VacA	+	+	-	+
Lipoproteina Lpp20	-	n.w.	-	+
L7/L12 białko rybosomalne	+	+	+	n.w.
Hipotetyczne białko sekrecyjne HP1488	-	n.w.	-	?
Hipotetyczne białko sekrecyjne HP1117	--	n.w.	-	?
Hemolizyna białko sekrecyjne prekursor	+	+	+	?
Syntaza cytrynianowa	+	+	-	n.w.
NapA	+	+	+	+
CagA	+	+	+	+
HP0231	+	+	+	+
HP0410	+	+	+	+

Skróty: n.w. – nie wykryto, +/- dane kontrowersyjne; ? – dane nie potwierdzone doświadczalnie, lokalizacja powierzchniowa przewidywana w oparciu o badania *in silico*, ale teoretycznie możliwe [20]. Według [29] za zgodą wydawcy Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KG.

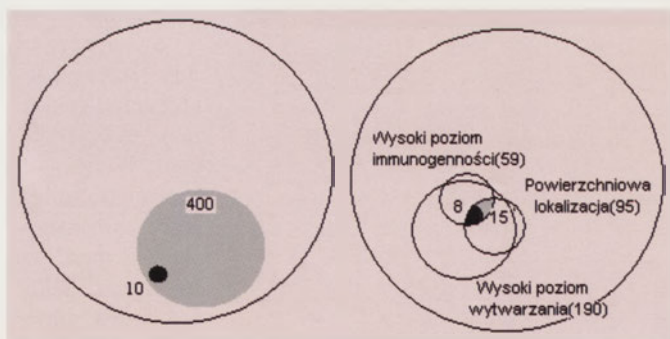
produkcją przeciwciał IgA w błonie śluzowej żołądka. Do najbardziej zaawansowanych doświadczeń, z których niektóre weszły już w fazę badań klinicznych należą trzy prototypy szczepionek: zawierająca inaktywowane komórki *Helicobacter* (Heli-vax), szczepionka podjednostkowa zawierająca trzy antygeny CagA, VacA i NapA oraz szczepion-

ka, gdzie jako nośnik genów *Helicobacter* (ureaza) wykorzystany jest atenuowany szczep rodzaju *Salmonella*.

Istotnym problemem jest także sposób dostarczenia antygeny tak, aby zaindukować ochronny typ odpowiedzi immunologicznej. Naturalna infekcja *H. pylori* indukuje u ludzi mieszany typ odpowiedzi immunologicznej: aktywację limfocytów Th1 i Th2. Analiza profilu wytwarzanych cytokin wskazuje raczej na przewagę stymulacji limfocytów Th1 odpowiedzialnych za indukcję odpowiedzi typu komórkowego. Organizm nie jest jednak w stanie zwalczyć infekcji. Rozważane są dwie możliwości: zastosowanie adiuwantów wzmacniających odpowiedź immunologiczną typu Th1 lub modulowanie odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th2. Poza tym w niektórych przypadkach dane doświadczalne dotyczące skuteczności testowanych prototypów szczepionek otrzymane na modelu zwierzęcym (myszy) nie potwierdzały się przy aplikacji tych samych preparatów ludziom [63].

Przed określeniem sekwencji nukleotydu genomu *H. pylori* strategię selekcji potencjalnych kandydatów do konstrukcji podjednostkowych szczepionek bazowały na empirycznej analizie poszczególnych białek będących istotnymi czynnikami wirulencji. W następnym etapie wymienione techniki zastąpiono immunologicznym (surowice mysie i od osób zainfekowanych *H. pylori*) przeszukiwaniem bibliotek chromosomowego DNA konstruowanych w komórkach *E. coli* oraz typowaniem potencjalnie użytecznych do celów terapeutyczno/profilaktycznych białek metodami *in silico*. Ta ostatnia strategia wykorzystuje sekwencje nukleotydu materiału genetycznego tylko dwóch szczepów *H. pylori*, a jak wielokrotnie wykazano poszczególne kliniczne izolaty *H. pylori* mogą zawierać od 15–22% unikatowych, charakterystycznych dla szczepu genów [18]. Dodatkowo analizy *in silico* nie zawsze są w stanie określić prawidłowo lokalizację białek. Jak wspomniano wyżej, kilka pozacytoplazmatycznych białek *H. pylori*, zgodnie z bioinformatycznymi przewidywaniami, powinno być umiejscowione w cytoplazmie (np. Hsp czy katalaza).

Wyniki badań wskazują na zestaw ok. 300–400 białek *H. pylori* będących punktem wyjścia do wyboru właściwego kandydata do stworzenia szczepionki. Na podstawie dostęp-



Rycina 1. Porównanie metody konwencjonalnej selekcji antygenów (po lewej) i selekcji antygenów z użyciem metod proteomicznych (po prawej). Duże koła przedstawiają cały proteom *Helicobacter*, szare obszary odpowiadają pojedynczo testowanym antygenom, a czarne obszary reprezentują zidentyfikowane antygeny protekcyjne. Liczba zidentyfikowanych antygenów należących do każdego z 3 subproteomów podana jest w nawiasach. Część wspólna 3 subproteomów zawiera 15 antygenów, z czego przynajmniej 8 to antygeny protekcyjne [20]. Według [29] za zgodą wydawcy Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KG.

nych danych doświadczalnych można stwierdzić, że tylko 2,5% wszystkich białek stanowią antygeny protekcyjne [64]. Dodatkowo około 4 – 7% wszystkich genów ulega ekspresji jedynie *in vivo*, gdy patogen znajduje się w organizmie gospodarza. Analizując zarówno metodami klasycznymi jak i proteomicznymi białka patogenu hodowanego *in vitro* nie identyfikujemy białek ekspresowanych *in vivo*. Metody immunoproteomiki oferują rozwiązanie, dzięki któremu powinna zaistnieć możliwość identyfikacji zestawu białek *H. pylori* spełniających przedstawione wyżej kryteria. Większość wytypowanych we wcześniejszych doświadczeniach antygenów została także wyselekcjonowana w badaniach proteomicznych, co potwierdziło wiarygodność techniki [27,30,65]. Każda z przeprowadzonych analiz immunoproteomicznych doprowadzała do wytypowania kilku nowych białek, o potencjalnym zastosowaniu terapeutyczno/profilaktycznym [31,50,54,66]. Niektóre z nich były z pozytywnym efektem testowane na modelu zwierzęcym, np. białko HP0410 i HP0231 [52]. Trzeba jednak podkreślić, że znane są silnie immunogenne białka rzadko lub nigdy nie wykryte w testach immunoproteomicznych ze względu na różnorodne ograniczenia tej techniki. Do tej grupy można zaliczyć między innymi dwie błonowe lipoproteiny (białko Lpp20 i HpaA-HP0797) [67,68]. W opublikowanych w ostatnim roku wynikach badań, opisanych wyżej, przeprowadzonych przez Mini i wsp. [31], zwrócono uwagę na istotną rolę porównawczej immunoproteomiki prowadzonej z użyciem nie tylko surowic otrzymanych od pacjentów z różnymi objawami chorobowymi, ale także białek izolowanych z komórek jak największej liczby klinicznych izolatów. Tabela 2 przedstawia zidentyfikowane (do roku 2004) protekcyjne antygeny *H. pylori*, a rycina 1 porównanie skuteczności dwóch strategii do identyfikacji kandydatów do konstrukcji szczepionek.

W większości badań zmierzających do wytworzenia skutecznej szczepionki na etapie przedklinicznym, do oceny immunogenności białek oraz efektu ochronnego immunizacji stosowany jest model myszy. *H. pylori* nie infekuje myszy z wyjątkiem nielicznych zaadaptowanych szczepów, jak np. *H. pylori* SS1 [69]. Dodatkowo, w badaniach klinicznych prototypy szczepionek wykazujące wysoki poziom protekcji na modelu mysim okazywały się mało skuteczne. Także objawy chorobowe indukowane infekcją są różne u ludzi i zwierząt. W celu oceny wiarygodności modelu mysiego Bumann i wsp. [70] przebadali immunoproteom szczepu *H. pylori* SS1, a otrzymane dane porównali z wynikami badań otrzymanymi z użyciem surowicy ludzkiej [30]. Generalnie nie zauważono znaczących różnic w rozpoznawanych przez przeciwciała białkach, co raczej potwierdza przydatność modelu mysiego. Trzeba jednak pamiętać o ogromnych rozbieżnościach występujących pomiędzy danymi doświadczalnymi w badaniach stosujących ludzkie surowice (mniej niż 50% białek identyfikowanych jest we wszystkich doświadczeniach).

PIŚMIENNICTWO

1. Solnick JV, Schauer DB (2001) Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. Clin Microbiol Rev 14: 59-97
2. Kidd M, Modlin IM (1998) A century of *Helicobacter pylori*: paradigms lost-paradigms regained. Digestion 59: 1-15


3. Everhart JE (2000) Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 29: 559-578
4. Blaser MJ, Atherton JC (2004) *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 113: 321-333
5. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M (2002) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 295: 683-686
6. Aras RA, Lee Y, Kim SK, Israel D, Peek RM Jr, Blaser MJ (2003) Natural variation in populations of persistently colonizing bacteria affect human host cell phenotype. *J Infect Dis* 188: 486-496
7. Girardin SE, Philpott DJ (2004) Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity. *Eur J Immunol* 34: 1777-1782
8. Inohara N, Nunez G (2003) NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature Rev/Immunol* 3: 371-382
9. Guillemin K, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S (2002) Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15136-15141
10. Nilsson C, Sillen A, Eriksson L, Strand ML, Enroth H, Normark S, Falk P, Engstrand L (2003) Correlation between cag pathogenicity island composition and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease. *Infect Immun* 71: 6573-6581
11. Godlewska R, Jagusztyn-Krynicka EK (2003) Analiza czynników wirulencji *Helicobacter pylori* w świetle genomiki. *Post Mikrobiol* 42: 115-137
12. Bourzac KM, Guillemin K (2005) *Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol* 7: 911-919
13. Radosz-Komoniewska H, Bek T, Józwiak J, Martirosian G (2005) Pathogenicity of *Helicobacter* infection. *Clin Microbiol Infect* 11: 602-610
14. Reider G, Fischer W, Haas R (2005) Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: Functions of secreted and translocated molecules. *Curr Opin Microbiol* 8: 67-73
15. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388: 539-547
16. Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B, Guild BC, deJonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria-Nickelsen M, Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397: 176-180
17. Bjorkholm BM, Oh JD, Falk PG, Engstrand LG, Gordon JI (2001) Genomics and proteomics converge on *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Microbiol* 3: 237-245
18. Salama N, Guillemin K, McDaniel TK, Sherlock G, Tompkins L, Falkow S (2000) A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14668-14673
19. Gressmann H, Linz B, Ghai R, Pleissner KP, Schlapbach R, Yamaoka Y, Kraft C, Suerbaum S, Meyer TF, Achtman M (2005) Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. *PLoS Genet* 1: e43
20. Kraft C, Stack A, Josenhans C, Niehus E, Dietrich G, Correa P, Fox JG, Falush D, Suerbaum S (2006) Genomic changes during chronic *Helicobacter pylori* infection. *J Bacteriol* 188: 249-254
21. Suerbaum S, Josenhans C, Sterzenbach T, Drescher B, Brandt P, Bell M, Droge M, Fartmann B, Fischer HP, Ge Z, Horster A, Holland R, Klein K, Konig J, Macko L, Mendz GL, Nyakatura G, Schauer DB, Shen Z, Weber J, Frosch M, Fox JG (2003) The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7901-7906
22. Poly F, Threadgill D, Stintzi A (2004) Identification of *Campylobacter jejuni* ATCC 43431-specific genes by whole microbial genome comparisons. *J Bacteriol* 186: 4781-95
23. Beier D, Frank R (2000) Molecular characterization of two-component systems of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 182: 2068-2076
24. Eppinger M, Baar C, Raddatz G, Huson DH, Schuster SC (2004) Comparative analysis of four *Campylobacteriales*. *Nat Rev Microbiol* 2: 872-885
25. Raymond J, Thiberg JM, Chevalier C, Kalach N, Bergeret M, Labigne A, Dauga C (2004) Genetic and transmission analysis of *Helicobacter pylori* strains within a family. *Emerg Infect Dis* 10: 1816-1821
26. Bae SH, Harris AG, Hains PG, Chen H, Garfin DE, Hazell SL, Paik YK, Walsh BJ, Cordwell SJ (2003) Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects. *Proteomics* 3: 569-579
27. Bumann D, Meyer TF, Jungblut PR (2001) Proteome analysis of the common human pathogen *Helicobacter pylori*. *Proteomics* 1: 473-479
28. Krah A, Schmidt F, Becher D, Schmid M, Albrecht D, Rack A, Buttner K, Jungblut PR (2003) Analysis of automatically generated peptide mass fingerprints of cellular proteins and antigens from *Helicobacter pylori* 26695 separated by two-dimensional electrophoresis. *Mol Cell Proteomics* 2: 1271-1283
29. Bumann D, Jungblut PR, Meyer TF (2004) *Helicobacter pylori* vaccine development based on combined subproteome analysis. *Proteomics* 4: 2843-2848
30. Jungblut PR, Bumann D, Haas G, Zimny-Arndt U, Holland P, Lamer S, Siejak F, Aebischer A, Meyer TF (2000) Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 36: 710-725
31. Mini R, Bernardini G, Salzano AM, Renzone G, Scaloni A, Figura N, Santucci A (2006) Comparative proteomics and immunoproteomics of *Helicobacter pylori* related to different gastric pathologies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 833: 63-79
32. Uwins C, Deitrich C, Argo E, Stewart E, Davidson I, Cash P (2006) Growth-induced changes in the proteome of *Helicobacter pylori*. *Electrophoresis* 2006 27: 1136-1146
33. Slonczewski JL, McGee DJ, Phillips J, Kirkpatrick C, Mobley HL (2000) pH-dependent protein profiles of *Helicobacter pylori* analyzed by two-dimensional gels. *Helicobacter* 5: 240-247
34. Chuang MH, Wu MS, Lin JT, Chiou SH (2005) Proteomic analysis of proteins expressed by *Helicobacter pylori* under oxidative stress. *Proteomics* 5: 3895-3901
35. Wen Y, Marcus EA, Matrubutham U, Gleeson MA, Scott DR, Sachs G (2003) Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 71: 5921-5939
36. Thompson LJ, Merrell DS, Neilan BA, Mitchell H, Lee A, Falkow S (2003) Gene expression profiling of *Helicobacter pylori* reveals a growth-phase-dependent switch in virulence gene expression. *Infect Immun* 71: 2643-2655
37. Gancz H, Censini S, Merrell DS (2006) Iron and pH homeostasis intersect at the level of Fur regulation in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 74: 602-614.
38. Backert S, Kwok T, Schmid M, Selbach M, Moese S, Peek RM Jr, Konig W, Meyer TF, Jungblut PR (2005) Subproteomes of soluble and structure-bound *Helicobacter pylori* proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 5: 1331-1345
39. Molloy MP, Phadke ND, Maddock JR, Andrews PC (2001) Two-dimensional electrophoresis and peptide mass fingerprinting of bacterial outer membrane proteins. *Electrophoresis* 22: 1686-1696
40. Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B (2002) Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun* 70: 2311-2318
41. Baik SC, Kim KM, Song SM, Kim DS, Jun JS, Lee SG, Song JY, Park JU, Kang HL, Lee WK, Cho MJ, Youn HS, Ko GH, Rhee KH (2004) Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Helicobacter pylori* strain 26695. *J Bacteriol* 186: 949-955
42. Bumann D, Aksu S, Wendland M, Janek K, Zimny-Arndt U, Sabarth N, Meyer TF, Jungblut PR (2002) Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 70: 3396-3403
43. Windle HJ, Fox A, Ni Eidhin D, Kelleher D (2000) The thioredoxin system of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 275: 5081-5089

44. Jungblut PR (2001) Proteome analysis of bacterial pathogens. *Microbes Infect* 3: 831-40
45. Rain JC, Selig L, De Reuse H, Battaglia V, Reverdy C, Simon S, Lenzen G, Petel F, Wojcik J, Schachter V, Chemama Y, Labigne A, Legrain P (2001) The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* 409: 211-215
46. Terradot L, Durnell N, Li M, Li M, Ory J, Labigne A, Legrain P, Colland F, Waksman G (2004) Biochemical characterization of protein complexes from the *Helicobacter pylori* protein interaction map: strategies for complex formation and evidence for novel interactions within type IV secretion systems. *Mol Cell Proteomics* 3: 809-819
47. Krogfelt A, Lehours P, Megraud F (2005) Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter Suppl* 1: 5-13
48. Mini R, Annibale B, Lahner E, Bernardini G, Figura N, Santucci A (2006) Western blotting of total lysate of *Helicobacter pylori* in cases of atrophic body gastritis. *Clin Chem* 52: 220-226
49. McAtee CP, Lim MY, Fung K, Velligan M, Fry K, Chow T, Berg DE (1998) Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by two-dimensional gel electrophoresis, sequence analysis, and serum profiling. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 537-542
50. Lock RA, Coombs GW, McWilliams TM, Pearman JW, Grubb WB, Melrose GJ, Forbes GM (2002) Proteome analysis of highly immunoreactive proteins of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 7: 175-182
51. Utt M, Nilsson I, Ljungh A, Wadstrom T (2002) Identification of novel immunogenic proteins of *Helicobacter pylori* by proteome technology. *J Immunol Methods* 259: 1-10
52. Sabarth N, Hurwitz R, Meyer TF, Bumann D (2002) Multiparameter selection of *Helicobacter pylori* antigens identifies two novel antigens with high protective efficacy. *Infect Immun* 70: 6499-6503
53. Kimmel B, Bosserhoff A, Frank R, Gross R, Goebel W, Beier D (2000) Identification of immunodominant antigens from *Helicobacter pylori* and evaluation of their reactivities with sera from patients with different gastroduodenal pathologies. *Infect Immun* 68: 915-920
54. Haas G, Karaali G, Ebermayer K, Metzger WG, Lamer S, Zimny-Arndt U, Diescher S, Goebel UB, Vogt K, Roznowski AB, Wiedenmann BJ, Meyer TF, Aebischer T, Jungblut PR (2002) Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. *Proteomics* 2: 313-324
55. Bytzer P, O'Morain C (2005) Treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 10 Suppl 1: 40-46
56. Rowland M, Daly L, Vaughan M, Higgins A, Bourke B, Drumm B (2006) Age-specific incidence of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 130: 65-72
57. Michetti P (2004) Experimental *Helicobacter pylori* infection in humans: a multifaceted challenge. *Gut* 53: 1220-1221
58. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O (1999) Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 340: 825-831
59. Yan J, Mao YF (2004) Construction of a prokaryotic expression system of vacA gene and detection of vacA gene, VacA protein in *Helicobacter pylori* isolates and anti-VacA antibody in patients' sera. *World J Gastroenterol* 10: 985-990
60. Dzwonek A, Mikula M, Woszczynski M, Hennig E, Ostrowski J (2004) Protective effect of vaccination with DNA of the *H. pylori* genomic library in experimentally infected mice. *Cell Mol Biol Lett* 9: 483-495
61. Hatzifoti C, Bajaj-Elliott M, Dorrell N, Anyim M, Prentice MB, Nye KE, Wren B, Morrow WJ (2004) A plasmid immunization construct encoding urease B of *Helicobacter pylori* induces an antigen-specific antibody response and upregulates the expression of beta-defensins and IL-10 in the stomachs of immunized mice. *Vaccine* 22: 2651-2659
62. Johansson EL, Bergquist C, Edebo A, Johansson C, Svennerholm AM (2004) Comparison of different routes of vaccination for eliciting antibody responses in the human stomach. *Vaccine* 22: 984-990
63. Ruggiero P, Peppoloni S, Rappuoli R, Del Giudice G (2003) The quest for a vaccine against *Helicobacter pylori*: how to move from mouse to man? *Microbes Infect* 5: 749-756
64. Ferrero RL, Labigne A (2001) *Helicobacter pylori* vaccine development in the post-genomic era: can in silico translate to in vivo. *Scand J Immunol* 53: 443-448
65. Lock RA, Cordwell SJ, Coombs GW, Walsh BJ, Forbes GM (2001) Proteome analysis of *Helicobacter pylori*: major proteins of type strain NCTC 11637. *Pathology* 33: 365-374
66. Govorun VM, Moshkovskii SA, Tikhonova OV, Goufman EI, Serebryakova MV, Momynaliev KT, Lokhov PG, Khryapova EV, Kudryavtseva LV, Smirnova OV, Toropyguine IY, Maksimov BI, Archakov AI (2003) Comparative analysis of proteome maps of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Biochemistry* 68: 42-49
67. Keenan JI, Rijpkema SG, Durrani Z, Roake JA (2003) Differences in immunogenicity and protection in mice and guinea pigs following intranasal immunization with *Helicobacter pylori* outer membrane antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 36: 199-205
68. Volland P, Hafsi N, Zeitner M, Laforsch S, Wagner H, Prinz C (2003) Antigenic properties of HpaA and Omp18, two outer membrane proteins of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 71: 3837-3843
69. van Doorn NE, Namavar F, Sparrius M, Stoof J, van Rees EP, van Doorn LJ, Vandenbroucke-Grauls CM (1999) *Helicobacter pylori*-associated gastritis in mice is host and strain specific. *Infect Immun* 67: 3040-3046
70. Bumann D, Holland P, Siejak F, Kesling J, Sabarth N, Lamer S, Zimny-Arndt U, Jungblut PR, Meyer TF (2002) A comparison of murine and human immunoproteomes of *Helicobacter pylori* validates the preclinical murine infection model for antigen screening. *Infect Immun* 70: 6494-6498

Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* – strategy for improvement of diagnostic tests and vaccine development

Paula Roszczenko, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka 

Department of Bacterial Genetics, Institute of Microbiology, Warsaw University, 1 Miecznikowa St., 02-096 Warszawa, Poland

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

Key words: *Helicobacter pylori*, immunoproteomics, diagnosis, prophilaxis

ABSTRACT

Helicobacter pylori, Gram-negative spiral-shaped bacteria, member of ϵ -Proteobacteria, colonizes the gastric mucosa of humans. *H. pylori* has been identified as the causative agent of chronic inflammation, chronic gastritis and peptic ulceration and is considered a risk factor for the development of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and adenocarcinoma of the stomach. Although more than 50% of human population is infected with *H. pylori* only a subset develops disease. The completion of two *H. pylori* genome sequences revealed the enormous strain heterogeneity and permitted comparative proteome analysis. Immunoproteomics, a novel strategy combining standard proteomics with immunological screening, is currently method of choice for identification of new antigens of diagnostic and protective values. Highly specific antigens will be used as biomarkers of different pathology induced by *H. pylori* infection whereas novel highly immunogenic, conserved, abundant and surface-located proteins will facilitate efficient anti-*Helicobacter* vaccine construction.

Pierwsza dekada ery genomicznej – przegląd metod stosowanych w poszukiwaniu funkcji genów drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

STRESZCZENIE

Ostatnie dziesięć lat, które upłynęły od zsekwencjonowania genomu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, przyniosły olbrzymi rozwój w technikach badania genów i ich produktów – białek na skalę globalną. Ta pierwsza okrągła rocznica ery genomicznej prowokuje do podsumowań. Powstał cały szereg nowych technik badawczych. Stworzono biblioteki szczepów drożdży niosących insercje transpozonowe, delecje genów, bądź znakowane epitopami białka. Ich wykorzystanie umożliwia sukcesywne poznawanie fenotypów korelujących z delecjami poszczególnych genów oraz aktywności biologicznych, lokalizacji i ewentualnych modyfikacji ich produktów. Zastosowanie seryjnej analizy ekspresji genów i mikromacierzy DNA pozwala na określanie wzorców ekspresji genów i budowanie sieci współzależności regulacyjnych. Analiza białkowych żeli dwukierunkowych, spektrometria masowa, macierze białkowe i system dwuhybrydowy dostarczają informacji o współdziałaniu, modyfikacjach i aktywnościach białek. Wszystkie wymienione metody pozwoliły znacznie rozszerzyć listę genów, których udział w procesach komórkowych został już poznany. Co więcej, ich przetestowanie na modelowym organizmie eukariotycznym jakim są drożdże *S. cerevisiae* umożliwiło ich zastosowanie do badania innych organizmów.

WPROWADZENIE

Przez ostatnie dziesięć lat jesteśmy świadkami ogromnego przedsięwzięcia jakim jest projekt sekwencjonowania genomów (patrz Tab. 1). Efekt tej pracy, sekwencje zgromadzone w bazach danych, stały się wstępem do dalszych badań tak ewolucyjnych jak i funkcjonalnych.

Tabela 1. Poznawanie sekwencji genomów.

Genomy	Gotowe	Składane	Sekwencjonowane	Razem
Organizmy eukariotyczne w tym:	21	100	164	285
Jednokomórkowce	5	11	33	49
Grzyby	9	43	31	83
Owady	1	16	27	44
Ssaki	2	20	23	45
Rośliny	3	2	29	34
Bakterie	321	248	312	881
Archebakterie	27	2	24	53
Wirusy	1626			1626

Stan na dzień 12.06 06 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/>).

Wraz z sekwencjonowaniem genomu drożdży [1], a następnie skonstruowaniem kolekcji szczepów drożdży pozbawionych poszczególnych ramek odczytu (ang. *Yeast Genome Deletion Project*) [2], pojawiła się szansa systematycznego zbadania genomu drożdży. Gdyby jednak nie rozwijające się w ogromnym tempie technologie badań opartych na całym genomie (genomika) i proteomie (proteomika) – szansy tej nie byłoby w stanie w pełni wykorzystać. Prowadzenie badań nad tysiącami genów metodami konwencjonalnymi trwałoby niezmiernie długo. Do ery genomicznej lepiej przystają metody globalne. Np. podejścia eksperymentalne, w wyniku których jesteśmy w stanie przypisać wiele genów jednemu lub kilku kluczowym procesom komórkowym (takim jak np. cykl komórkowy, mitoz, transport przez błony itp. [3]). Pozyskiwane w ten sposób informacje zachęcają badaczy do projektowania doświadczeń umożliwiających powiązanie specyficznych procesów komórkowych z daną grupą białek współdziałających dla osiągnięcia określonego celu oraz określenia jakie aktywności różnych systemów komórkowych są tu zaangażowane. I tak, dzięki kreatywności wielu osób, z prostej potrzeby poznania funkcji genów oraz z połączenia konwencjonalnych podejść eksperymentalnych z nanotechnologią i podejściem globalnym, powstał cały szereg nowych technik badawczych (Ryc. 1). Przygotowano biblioteki szczepów niosących insercje transpozonowe, delecje genów, czy znakowane epitopami białka. Ich wykorzystanie umożliwia poznawanie fenotypów korelujących z delecjami poszczególnych genów oraz aktywności biologicznych, lokalizacji i ewentualnych modyfikacji ich produktów.

Adrianna Skoneczna[✉]

Pracownia Mutageny i Reperacji DNA, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

[✉]Pracownia Mutageny i Reperacji DNA, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa; e-mail: ada@ibb.waw.pl, tel. (022) 592 13 14

Artykuł otrzymano 21 marca 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 11 września 2006 r.

Słowa kluczowe: metody globalne, genom, transkryptom, proteom, *Saccharomyces cerevisiae*

Wykaz skrótów: β-gal – β-galaktozydaza; mTn – mini-transpozon; RT-PCR – odwrotna transkrypcja-reakcja łańcuchowa polimerazy DNA; SAGE – seryjna analiza ekspresji genów; SGA (ang. *synthetic genetic array*); THS – system dwuhybrydowy

Podziękowania: Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego MNiSW Nr 302 007 31/1094



Rycina 1. Podejścia genomiczne stosowane w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*.

typów będących wynikiem delecji poszczególnych genów, lokalizację ich produktów oraz ich ewentualne modyfikacje i aktywność biologiczną. Zastosowanie seryjnej analizy ekspresji genów (SAGE, ang. *Serial Analysis of Gene Expression*) i mikromacierzy DNA pozwala na określanie wzorców ekspresji genów i budowanie sieci współzależności regulacyjnych. Analiza żeli dwukierunkowych, spektrometria masowa, mikromacierze białkowe i system dwuhybrydowy (THS, ang. *Two-Hybrid System*) przynoszą wiadomości o interakcjach, modyfikacjach i aktywności białek.

Wszystkie wymienione powyżej podejścia eksperymentalne pozwoliły znacznie rozszerzyć listę genów, których udział w procesach komórkowych jest znany. Tym niemniej, wśród 6 604 potencjalnych otwartych ramek odczytu¹ (ORF, ang. *Open Reading Frame*), których obecność stwierdzono w genomie drożdży, zweryfikowano dotychczas zaledwie 4 403². Funkcja wielu z nich jest wciąż hipotetyczna. 1 377 potencjalne ORF-y nie są nawet scharakteryzowane³. Zaś 824 kolejnych ma status ORF-ów wątpliwych⁴ (stan z dnia 12.06.06, *Saccharomyces Genome Database*, <http://www.yeastgenome.org/cache/genomeSnapshot.html>). Innymi słowy, dopiero dla 2/3 genów drożdży wykazano istnienie ich produktów w komórce. Zaś zaledwie 3 655 produktom

¹ORF ang. *Open Reading Frame* – odcinek DNA, który może kodować polipeptyd, a który zaczyna się od kodonu 'start' – ATG, a kończy jednym z 3 kodonów 'stop'. Za dobrego kandydata na gen kodujący białko przyjmuje się ORF kodujący białko o długości przynajmniej 100 aminokwasów. ORF może również kodować RNA.

²Za zweryfikowane uważa się ORF-y, dla których istnieją dowody eksperymentalne, że ich produkty są obecne w komórkach *S. cerevisiae*

³Za niescharakteryzowane uznaje się ORF-y, które uważane są za geny ze względu na istnienie ich ortologów w innych organizmach, ale dla których nie ma dowodów eksperymentalnych na obecność ich produktów w komórkach *S. cerevisiae*

⁴Za wątpliwe uważa się ORF-y, dla których nie ma dowodów doświadczalnych na obecność ich produktów w komórkach *S. cerevisiae*

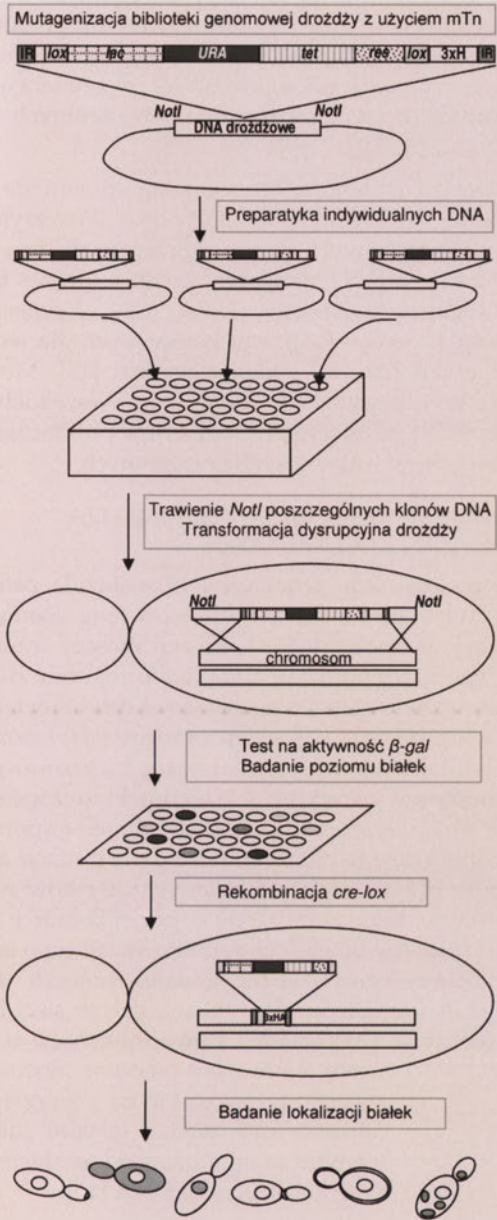
genów drożdży przypisano dotychczas funkcję na poziomie molekularnym. O blisko połowie genów drożdży nie wiadomo co właściwie robią w komórce! Przypuszczalnie długo jeszcze poczekamy na poznanie funkcji wszystkich genów drożdży. A przecież przed nami jeszcze parę innych gatunków... Warto zatem przyjrzeć się bliżej metodom genomiki funkcjonalnej.

METODY ANALIZY TRANSKRYPTOMU I PROTEOMU STOSOWANE W DROŹDZACH *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

INSERCJE TRANSPOZONOWE

W podejściu tym wykorzystuje się mini-transpozon mTn-3xHA/*lacZ*, będący modyfikacją bakteryjnego transpozonu Tn3. Zawiera on gen reporterowy *lacZ*, kodujący β -galaktozydazę (β -gal), pozbawiony zarówno promotora jak i kodonu inicjującego. Wprowadzenie transpozonu do sekwencji kodującej genu drożdży z zachowaniem ramki odczytu, tzn. stworzenie fuzji genowej między danym genem a *lacZ* spowoduje produkcję β -gal. Dodatkowo, mTn-3xHA/*lacZ* zawiera miejsca *lox* w pobliżu obu końców Tn3, przy czym jedno z nich przylega do sekwencji kodującej epitop hemaglutyninowy (3xHA). Produkcja rekombinazy Cre w drożdżach noszących mTn wywołuje rekombinację w miejscu *lox*, co prowadzi do wycięcia fragmentu DNA, a w rezultacie do redukcji mTn do fragmentu 279 bp (odpowiadającego 93 kodonom) kodującego epitop 3xHA. W efekcie otrzymujemy fuzyję genową w naturalnym locus pozwalającą na produkcję wyznakowanego epitopem białka pełnej długości.

mTn zostały wprowadzone do genomu drożdży metodą dwustopniową (Ryc. 2). Najpierw bank genomowych sekwencji DNA drożdży został zmutagenizowany w komórkach *E. coli* przy użyciu mTn. Następnie DNA genomowe drożdży zawierające mTn zostało wycięte z plazmidów wyizolowanych z bakterii. Fragmenty DNA posłużyły do transformacji diploidów drożdży, w których na drodze rekombinacji homologicznej zastąpiły jedną z kopii danego genu. Etap ten przeprowadzono przy użyciu płytek titracyjnych zawierających 96 dołków, co umożliwiło jednoczesną obróbkę setek szczepów. Zachowywane były: dysruptanty (czyli szczepy niosące delecję określonego genu) drożdży przejawiające aktywność β -gal, pochodzące od nich szczepy niosące białka wyznakowane epitopem 3xHA, oraz oryginalne plazmidy uzyskane z bakterii. Otrzymana tą metodą kolekcja szczepów drożdży, zawierająca wstawki w znanych loci, umożliwiła zbadanie zmian poziomu ekspresji pokażnej grupy białek w ponad 20 różnych warunkach, takich jak wzrost wegetatywny, sporulacja, traktowanie komórek feromonem płciowym, kofeiną, kalkoflorem czy SDS [4]. Wskazano na wyraźne różnice między poziomem ekspresji genów a ilością ich białkowych produktów w komórce w tych samych warun-

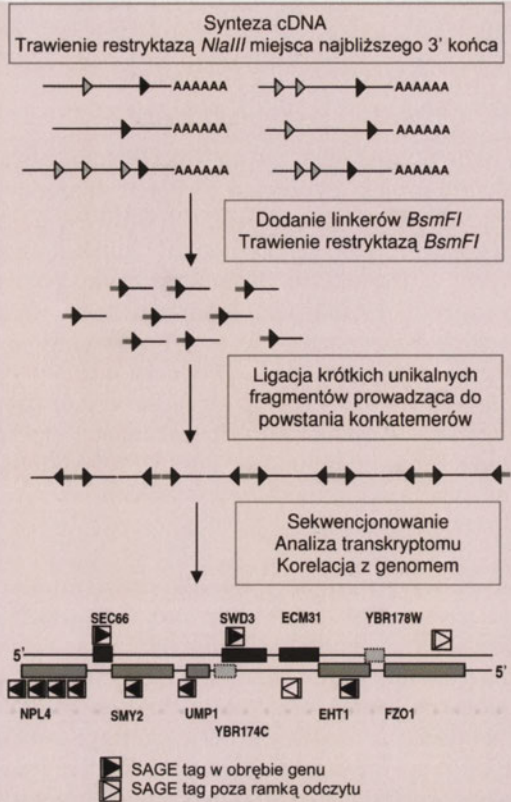


Rycina 2. Schemat postępowania w projekcie insercji mTn.

kach hodowli. Metodą immunocytochemiczną określono lokalizację 201 białek [5]. Metoda ta, choć daleka od doskonałości, zawiera w sobie wiele wątków podchwyczonych i udoskonalonych w podejściach metodycznych opisanych dalej, np. w projektach konstruowania delecji czy wprowadzania tag-ów (tj. peptydów znacznikowych, dla których przeciwciała dostępne są komercyjnie) do wszystkich genów drożdży.

SERYJNA ANALIZA EKSPRESJI GENÓW

Zastosowanie seryjnej analizy ekspresji genów (SAGE, ang. *Serial Analysis of Gene Expression*) pozwala określić poziom ekspresji genów bez znajomości ich sekwencji. SAGE wymaga wypreparowania i konkatameryzacji 15-nukleotydowych unikalnych sekwencji pochodzących z 3' końca klonów cDNA oraz ich późniejszego sekwencjonowania [6]. Sekwencje unikalne uzyskuje się przez trawienie dwuni-



Rycina 3. Zastosowanie techniki SAGE w drożdżach. Na dole rysunku pokazano przykładowy wynik SAGE - korelację tagów z określonym rejonem genomu drożdży (wszystkie dane dostępne są w bazie danych SGD - <http://www.yeast-genome.org/>).

ciowego cDNA restryktazą *NlaIII*. Do oczyszczonej frakcji fragmentów poliadenylowanych dodaje się oligonukleotyd łącznikowy, umożliwiający odtworzenie miejsca restrykcyjnego. Sekwencja rozpoznawana przez restryktazę *BsmFI* pokrywa się z tą rozpoznawaną przez *NlaIII*, ale miejsce cięcia dla tego enzymu znajduje się 14 nukleotydów dalej. Uzyskane w wyniku trawienia *BsmFI* krótkie fragmenty DNA łączą się na drodze ligacji, amplifikuje w reakcji PCR, a następnie sekwencjonuje (Ryc. 3).

Metoda ta pozwala na dokładne określenie liczby transkryptów przypadających na komórkę w danych warunkach. Wykazano, że komórka drożdży zawiera przeciętnie 15 000 transkryptów reprezentujących około 76% wszystkich ORF-ów. Znakomita większość transkryptów (aż 75% z nich) jest reprezentowana zaledwie przez jedną kopię na komórkę [6]. Wynika stąd, że aby pokryć cały transkryptom⁵ należałoby zsekwencjonować niemal 60 000 sekwencji unikalnych. Jest to zatem precyzyjna, ale niezwykle pracochłonna metoda. SAGE ma jednak dodatkową zaletę. Pozwala na identyfikację dotychczas nieznanych genów. Jak dotąd, technika ta z sukcesem posłużyła do badania poziomu ekspresji genów w komórkach wegetatywnych i zatrzymanych w różnych fazach cyklu komórkowego [6] oraz do identyfikacji nowych genów peroksysomalnych w badaniu porównawczym komórek typu dzikiego i komórek niosących mutacje *pip2Δ* i *oaf1Δ* (mutacje w genach kodujących czynniki transkrypcyjne wymagane do indukcji genów ko-

⁵transkryptom – obraz ekspresji wszystkich genów w danych warunkach określony przez poziomy mRNA

dujących białka peroksysomalne) hodowanych w pożywce z kwasem olejowym [7].

PROJEKT DELECJI WSZYSTKICH GENÓW DROŻDŻY I ANALIZA FUNKCJONALNA

Stosunkowo niedawno został ukończony wyjątkowo pracochłonny projekt tworzenia biblioteki szczepów drożdży niosących delecje poszczególnych ORF-ów (ang. *Yeast Genome Deletion Project*) [2]. Dostępność kolekcji mutantów delecyjnych w jednolitym tle genetycznym pozwala na przeprowadzenie bardzo wiarygodnych doświadczeń porównawczych. Korzysta się z tej możliwości na skalę masową. Przeprowadzono wiele doświadczeń porównawczych, w których testowano szczep po szczepie wypatrując różnic w ich wzroście w różnorodnych warunkach (np. projekt poznawania funkcji genów drożdży EUROFAN), bądź defektów w procesach komórkowych (takich jak np. wybór miejsca pączkowania [8]).

Innym podejściem do tego samego problemu jest metoda równoczesnej analizy funkcjonalnej wszystkich genów z wykorzystaniem 'kodów paskowych' zwana dalej 'populacyjną genomiką funkcjonalną' [9]. Projektując delecje poszczególnych ramek odczytu zadbano o to, by wprowadzić do genomu drożdży krótkie (20 bp) i unikalne sekwencje DNA specyficzne dla danej ramki odczytu i stanowiące swego rodzaju 'kod paskowy' danego genu (patrz: Ryc. 4, [10]). Każdy z genów otrzymał w efekcie dwa takie znaczniki: UPTAG i DOWNTAG (UP i DN na Ryc. 4). Natomiast znaczniki otoczone są, jednakowymi dla nich wszystkimi, krótkimi sekwencjami DNA (U1, U2, D1, D2 na Ryc. 4), co umożliwia użycie tylko dwóch par starterów do namnożenia techniką PCR sekwencji UPTAG i DOWNTAG każdej delecji obecnej w danej próbce DNA. W ten sposób wprowadzenie molekularnego 'kodu kreskowego'

umożliwia wykrycie obecności poszczególnych konstrukcji delecyjnych w puli mutantów. Zmiany poziomu ilości poszczególnych tag-ów w puli mogą być wychwycone dzięki hybrydyzacji do mikromacierzy zawierającej oligonukleotydy homologiczne do poszczególnych tag-ów (patrz Ryc. 5, [9,11]).

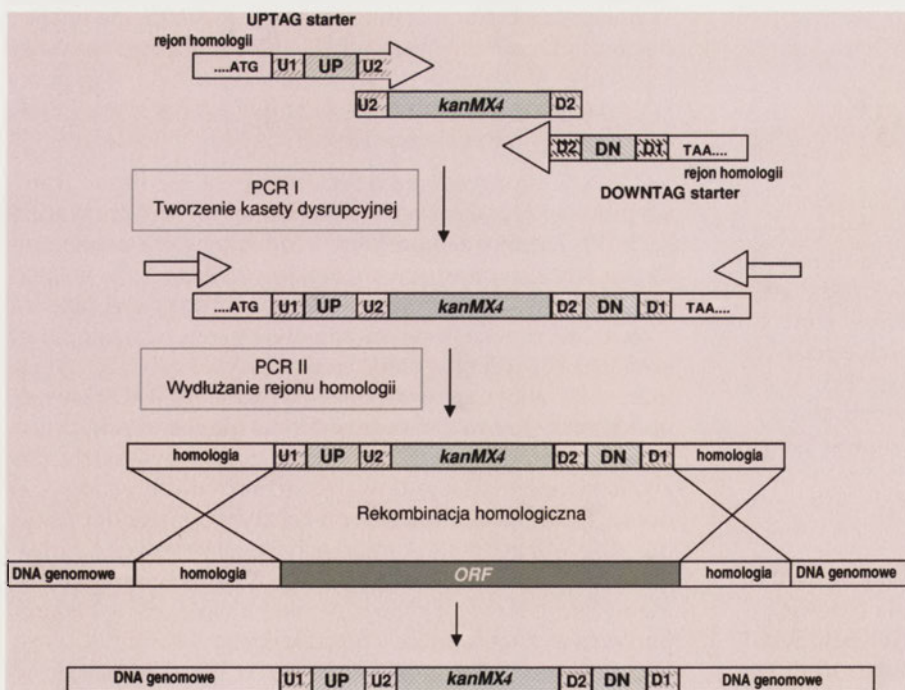
Populacyjna genomika funkcjonalna sprawdziła się już wielokrotnie od czasu jej wynalezienia. Posłużyła m.in. do identyfikacji nowych genów koniecznych do sporulacji i kiełkowania [12]; zaangażowanych w proces łączenia niehomologicznych końców DNA (ang. *Nonhomologous End-joining*, NHEJ – [13]); czy koniecznych dla właściwej ochrony przed różnego rodzaju stresem [14]. Metoda ta może być wykorzystana do identyfikacji wszelkich zmian w reprezentacji poszczególnych delecji w puli mutantów w zmieniających się warunkach fizjologicznych.

INTERAKCJE GENETYCZNE CZYLI ANALIZA SYNTETYCZNEJ KOLETALNOŚCI

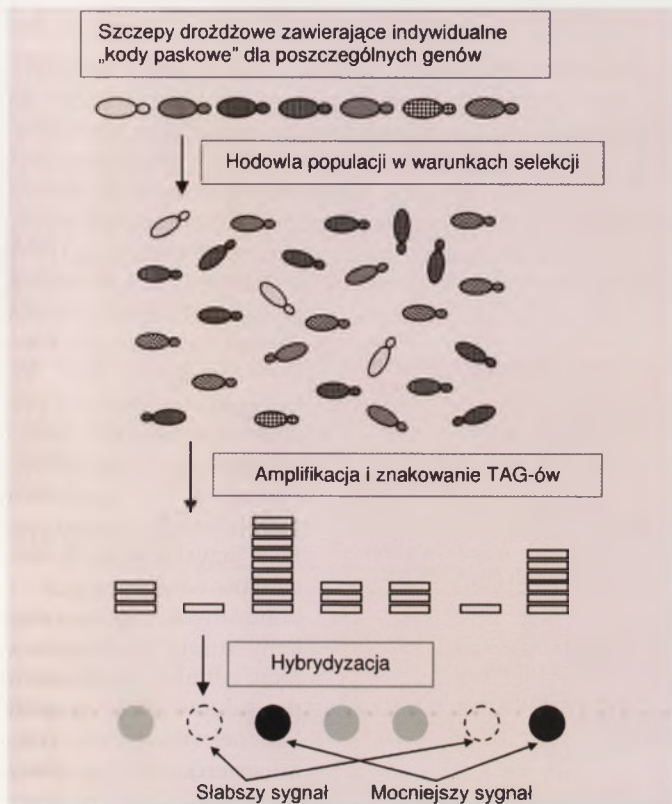
Badaniu interakcji genetycznych posłużyła całkowicie zautomatyzowana metoda zwana SGA (ang. *Synthetic Genetic Array*). Do potrzeb SGA, szczep niosący mutację interesującego nas genu oraz dodatkowo reporter *HIS3* pod promotorem genu *MFA1* ulegającego ekspresji wyłącznie w komórkach typu *MATa* (system umożliwiający późniejszą selekcję haploidów) jest systematycznie krzyżowany z każdym z mutantów delecyjnych z biblioteki szczepów drożdży (Ryc. 6). Uzyskane diploidy poddawane są sporulacji, a wyselekcjonowane haploidy niosące dwie mutacje analizuje się pod względem ich potencjalnych defektów wzrostowych. Mutacje, które zestawione w jednej komórce hamują jej wzrost (mutacje koletalne) dobitnie świadczą o istnieniu interakcji genetycznej między genami, których dotyczą. Analiza SGA umożliwia identyfikację całych sieci interakcji genetycznych, przynosi też nowe informacje o funkcji wielu genów. Już pierwsze zastosowanie tej metody pozwoliło na stworzenie sieci oddziaływań między genami zaangażowanymi w organizację cytoszkieletu oraz syntezę i reperację DNA [15].

MIKROMACIERZE DNA

Mikromacierze DNA są to macierze prób DNA upakowanych z wysoką gęstością i unieruchomionych na powierzchni szkła, używane są głównie do monitorowania ekspresji genów. mRNA uzyskane z interesujących nas komórek oraz z puli kontrolnej, znakowane są fluorescencyjnie i hybrydyzowane ze zdefiniowaną grupą fragmentów DNA (np. reprezentujących wszystkie potencjalne ORF-y drożdży) umieszczonych na mikromacierzy (Ryc. 7). Laserowy odczyt fluorescencji umożliwia jej kwantyfikację i określenie względnych ilości poszczególnych mRNA w komórkach badanych i kontrolnych. Mikromacierzowa analiza transkryptomów pozwala zatem na wyłonienie grup genów, które ulegają wspólnej regula-

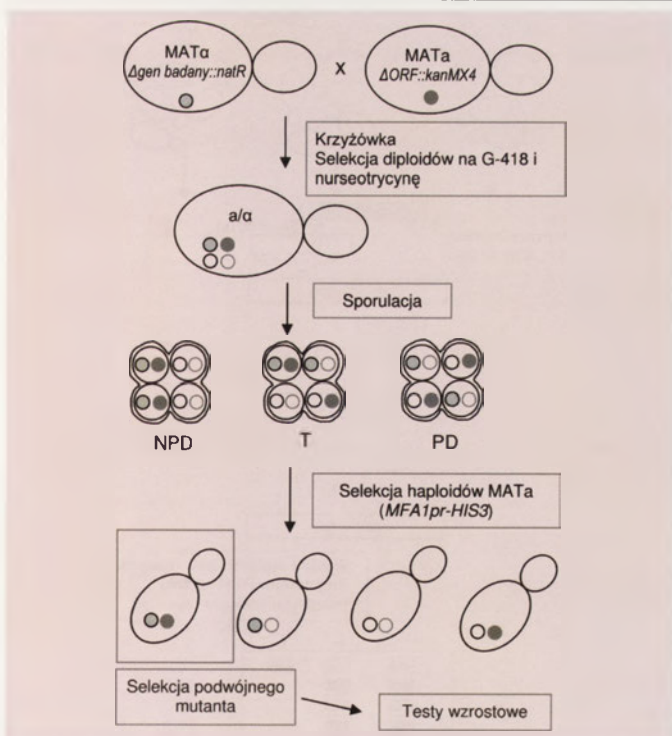


Rycina 4. Schemat konstrukcji kasety dysrupcyjnej *kanMX4* i strategia wprowadzania molekularnych „kodów paskowych” do usuwanych genów.

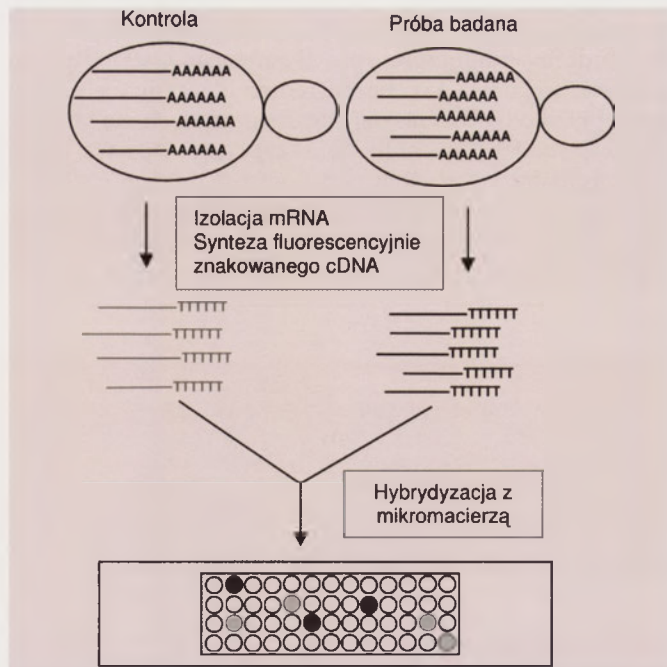


Rycina 5. Zastosowanie biblioteki szczepów zawierających delekcje genów wyznaczone „kodami paskowymi” w doświadczeniu fizjologicznym.

cji w określonych warunkach (np. w warunkach stresu i uszkodzeń DNA [16,17], w różnych warunkach wzrostu [18,19]), czasie (np. w różnych fazach cyklu komórkowego



Rycina 6. Strategia SGA. T – tetraploid, zawiera jedną sporę niosącą obie mutacje, NPD (ang. *nonparental ditypes*) – typ przeciwny do rodzicielskiego zawiera dwie spory niosące podwójną mutację, PD (ang. *parental ditypes*) – typ rodzicielski zawiera spory o genotypie identycznym z genotypem rodziców.



Rycina 7. Użycie mikromacierzy DNA do badania transkryptomu drożdży.

[20]) lub procesie (np. sporulacji [21]). Technika ta jest już tak rozpowszechniona, że nie sposób wyliczyć jej wszystkich zastosowań. Dane z przeprowadzonych doświadczeń zgromadzone są w kilku bazach danych m.in. w ‘yeast microarray global viewer’ (<http://www.transcriptome.ens.fr/yimgv/>), ‘expression connection’ (<http://genome-www.stanford.edu/cgi-bin/SGD/expression/expressionConection>), ‘webminer’ ([http://webminer.ucsf.edu.](http://webminer.ucsf.edu/)) i ‘ArrayExpress’ (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>).

Mikromacierze DNA można stosować nie tylko do badania transkryptomów, ale i do innych celów (patrz Tab. 2, [22]). Stosując jako substrat do znakowania DNA genomowe można z ich pomocą określić względną liczbę kopii genów. Ten rodzaj doświadczenia pozwala udokumentować występowanie aneuploidii i duplikacji genów [23], umożliwia określenie dynamiki replikacji [24], zmapowanie miejsc rekombinacji [25] czy detekcję polimorfizmu [26].

Innym zastosowaniem techniki mikromacierzy DNA jest równoczesna analiza funkcjonalna wszystkich genów (omówiona szerzej w podrozdziale ‘Projekt delekcji wszystkich genów drożdży i analiza funkcjonalna’) i tzw. re-sekwencjonowanie, czyli sprawdzanie znanych sekwencji i wykrywanie ewentualnych wariantów mutacyjnych, a w szczególności: SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) tj. polimorfizmu pojedynczych nukleotydów [27], używane obecnie w diagnostyce medycznej.

Wprowadzenie do procedury kolejnej modyfikacji, doprowadziło do powstania jeszcze jednej technologii wykorzystującej mikromacierze, tym razem do badania m.in. czynników transkrypcyjnych, tzw. ChIP-chip (ang. *Chromatin Immunoprecipitation – DNA chip analysis*). Metoda ta służy identyfikacji sekwencji docelowych DNA, z którymi bezpośrednio wiąże się interesujące nas białko [28]. W tym

przypadku mikromacierze zawierają sekwencje promotorowe genów, a znakowane jest DNA, które uległo koprecypitacji podczas immunoprecypitacji badanego białka (Ryc. 8). Podejście to pozwala na bezpośrednią identyfikację genów (nawet tych o bardzo niskiej ekspresji, czy tych, na których ekspresję badany czynnik transkrypcyjny wpływa choćby marginalnie) będących pod kontrolą danego czynnika transkrypcyjnego [29,30]. Metoda ta umożliwiła też m.in. identyfikację *origin* replikacji (miejsc startu replikacji) w genomie drożdży [31].

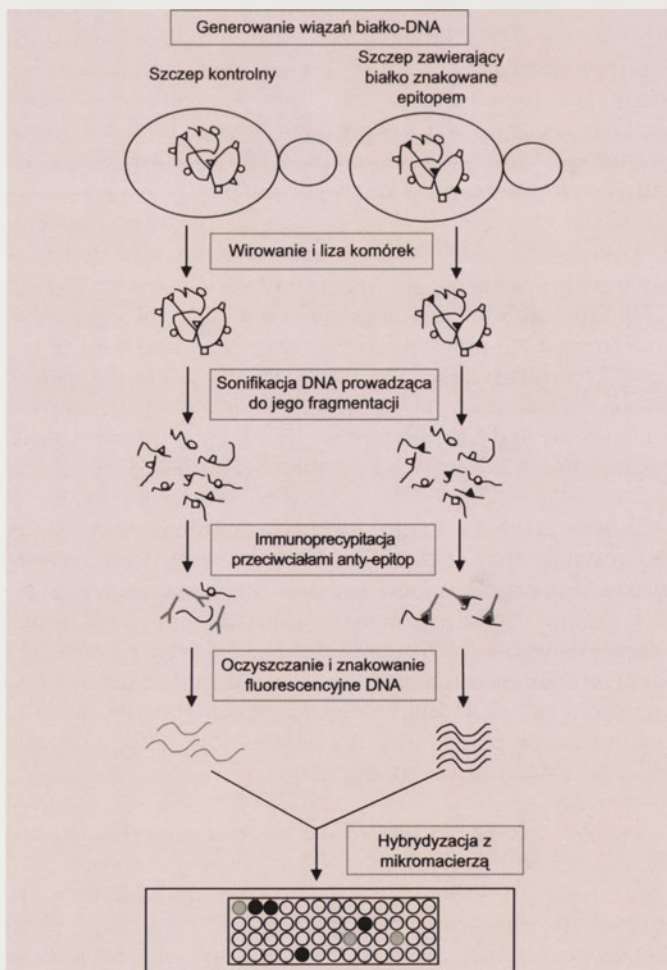
Tabela 2. Rodzaje mikromacierzy DNA i ich zastosowania.

Mikromacierze DNA			
	transkryptomowe	genomiczne	ChIP
Substrat	mRNA	DNA	DNA lub RNA związane z białkami
Znakowana próba	RNA	DNA kodujące lub nie kodujące	DNA lub RNA
Odczyt	poziomy transkryptów	liczba kopii DNA	miejsca wiążące dla białek wiążących DNA lub RNA
Interpretacja	określanie wzorców ekspresji budowanie sieci współzależności regulacyjnych	aneuploidia amplifikacja genów dynamika replikacji detekcja polimorfizmu mapowanie miejsc rekombinacji populacyjna genomika funkcjonalna	budowanie sieci współzależności regulacyjnych

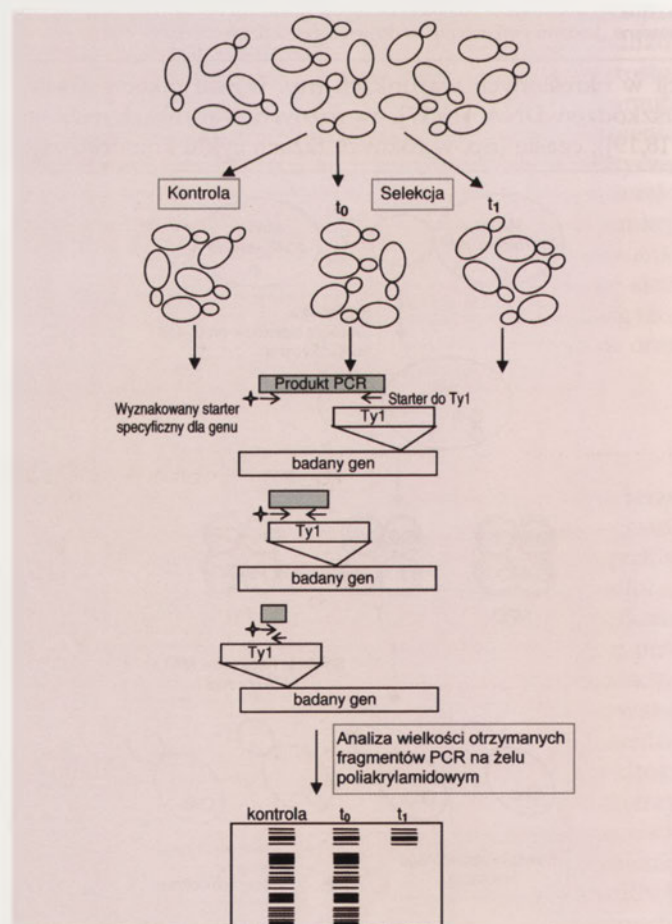
ANALIZA 'TROPÓW' GENETYCZNYCH (ANG. GENOMIC FOOTPRINTING)

Ta analiza fenotypowa wykorzystuje zdolność zmodyfikowanej wersji endogennego transpozonu Ty1 drożdży do transpozycji wywoływanej zmianą warunków zewnętrznych. W dużej populacji komórek indukcja retrotranspozycji Ty1 prowadzi do jego wstawienia w najróżniejsze miejsca genomu. Populację komórek poddaje się odpowiedniej selekcji i z puli zmutagenizowanych komórek izoluje się DNA genomowe, które służy następnie jako matryca w reakcji

PCR z użyciem startera do Ty1 i startera dla konkretnego genu (Ryc. 9). Do pokrycia genomu potrzeba ponad 6000 indywidualnych starterów. Porównując spektrum otrzymanych produktów PCR, uzyskanych dla warunków selekcyjnych i kontrolnych, zaobserwujemy utratę niektórych z nich. Brak określonych produktów PCR w puli badanej świadczy o tym, że insercja Ty1 w dany



Rycina 8. Schemat przedstawiający technikę ChIP-chip wykorzystującą znakowane epitopami białka wiążące DNA.



Rycina 9. 'Tropy' genetyczne. Obecność insercji Ty w obrębie genomu drożdży może być monitorowana za pośrednictwem fragmentów PCR powstałych przy użyciu starterów specyficznych do elementu Ty i znakowanego fluorescencyjnie startera dla określonego genu.

region DNA doprowadziła do zaniku z populacji komórek niosących te insercje, a tym samym, że gen, w obrębie którego nastąpiła insercja jest konieczny do przetrwania komórki w danych warunkach selekcji [32,33]. Takie podejście eksperymentalne, choć niesłychanie pracochłonne, stanowi jednak alternatywę dla wcześniej opisanych metod, wykorzystujących mTn czy kolekcję szczepów z delecjami wszystkich ORF-ów drożdży. Posiada bowiem cechę unikalną – pozwala mianowicie na analizę mutantów w warunkach selekcji bez stosowania prehodowli. Umożliwia to badanie genów, których usunięcie czyni komórkę niezdolną do wzrostu w warunkach standardowych. Ponadto, możliwe staje się ustalenie warunków pozwalających na wzrost szczepów z takimi delecjami. Wykazano np., że szczep niosący mutację genu *cho1*, którą uznawano dotychczas za letalną, może przeżywać w podłożu uzupełnionym 0,9M NaCl [11].

KINETYCZNY RT-PCR

Kinetyczny RT-PCR (ang. *real time reverse transcription polymerase chain reaction*) jest najczulszą znaną dotychczas metodą detekcji niskich poziomów mRNA otrzymywanych z niewielkiej ilości badanego materiału. Jest to metoda enzymatycznej amplifikacji określonych sekwencji RNA *in vitro*, przy użyciu dobrze zaplanowanych starterów [34], która podczas jednego eksperymentu, pozwala na analizę różnych prób z tak niewielkiej ilości materiału jak pojedyncza komórka [35,36]. Doświadczenia, w których wykorzystano

tę technikę wykazały, że ilość danego transkryptu przypadającego na jedną komórkę może wynosić nawet 0,001. Fakt ten wyjaśnia dlaczego przy użyciu takich podejść eksperymentalnych jak SAGE czy mikromacierze transkryptomowe nie udało się wykazać ekspresji 1/4 genów drożdży. Poziom czułości wspomnianych technik wynosi bowiem 0,3-0,5 transkryptu przypadającego na komórkę [37].

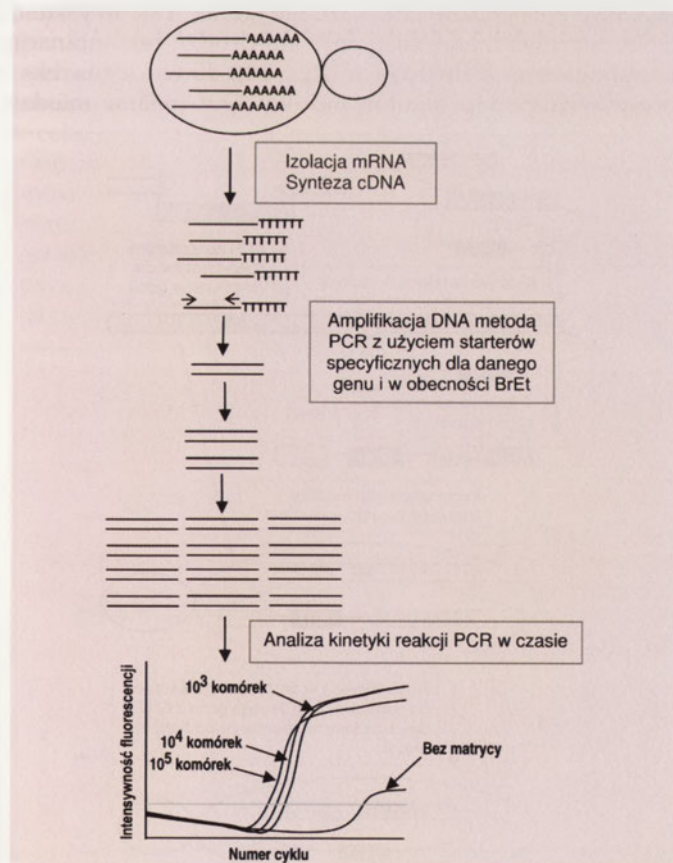
Kinetyczny RT-PCR może być używany nie tylko do detekcji rzadko występujących transkryptów, ale także do porównania poziomów mRNA w różnych populacjach komórek w celu określenia wzorów ekspresji mRNA, do odróżnienia podobnych mRNA, czy do analizy struktury RNA [36]. W metodzie tej stężenie specyficznych cDNA jest determinowane przez tempo akumulacji ich produktów PCR (Ryc. 10). Ponieważ do każdej reakcji PCR dodaje się fluorescencyjny indykator DNA (jak np. bromek etydyny), to akumulacja produktu może być monitorowana na każdym etapie jej przebiegu.

Badania poziomu transkrypcji 65 genów z lewego ramienia chromosomu III drożdży oraz 185 czynników transkrypcyjnych wykazały, że geny, których transkrypty występują w komórce najobficiej (50-200 kopii na komórkę) pełnią funkcje związane z syntezą białek lub metabolizmem komórkowym. Tymczasem poziomy transkryptów czynników transkrypcyjnych należą do najniższych w komórce [37]. Przy użyciu kinetycznego RT-PCR sprawdzono również poziom i stabilność mRNA genów związanych z replikacją DNA [38].

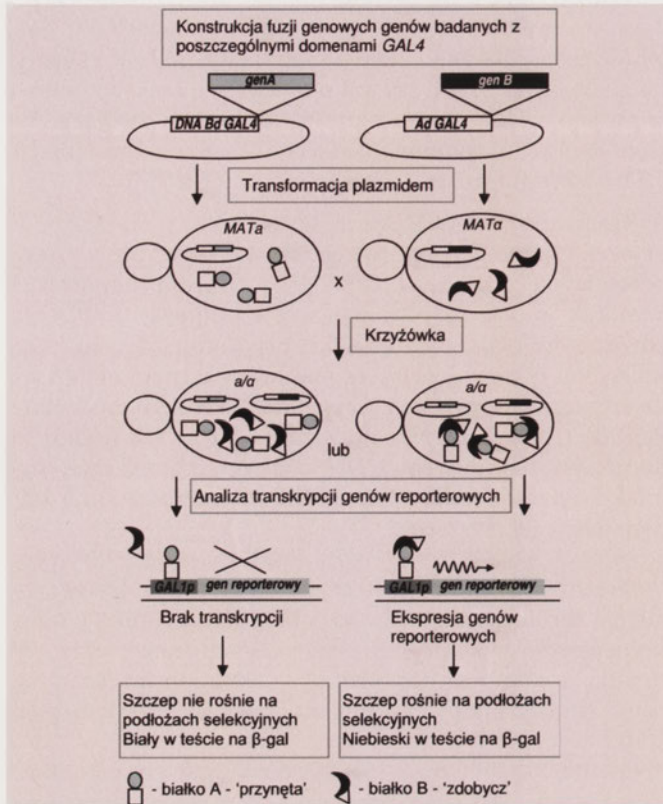
SYSTEM DWU-HYBRYDOWY

System dwu-hybrydowy (THS, ang. *two-hybrid system*) służy do identyfikacji par białek zdolnych oddziaływać ze sobą fizycznie [39]. Działanie systemu opiera się na fakcie, że dwie niezależne domeny czynnika transkrypcyjnego Gal4: domenę aktywacji transkrypcji i domenę wiążącą DNA, można fizycznie rozdzielić bez szkody dla ich funkcji. Rekonstrukcja czynnika transkrypcyjnego przez stworzenie sztucznego pomostu między domenami, umożliwia transkrypcję z promotorów podlegających regulacji Gal4 (np. z promotora *GAL1*). W THS pomost ten ma zapewnić konstrukcja dwóch białek hybrydowych, z których jedno to fuzja między domeną wiążącą DNA z Gal4 a białkiem badanym A, a drugie to fuzja między domeną aktywatora transkrypcji z Gal4 a białkiem badanym B (Ryc. 11). Natomiast pod promotor *GAL1* podłączone są geny reporterowe i/lub geny umożliwiające selekcję klonów, w których zachodzi oddziaływanie. Jeśli białko A tworzy dimer z białkiem B obserwujemy transkrypcję genów reporterowych.

W układzie THS zaadoptowanym do potrzeb genomycznych, fuzje genowe poszczególnych ORF-ów tworzone są przez klonowanie ich do wektorów niosących sekwencje kodujące odpowiednio: domenę wiążącą DNA z *GAL4* ('przynęta') i domenę aktywacji transkrypcji *GAL4* ('zdobycze'). Plazmidy niosące 'przynęty' i 'zdobycze' transformowane są do szczepów o odmiennym typie płciowym. Szczepy te są następnie krzyżowane, a selekcji diploidów towarzyszy selekcja pod kątem aktywacji transkrypcji z promotora *GAL1* (Ryc. 11). Pełna analiza interakcji między



Rycina 10. Schemat kinetycznego RT-PCR. Na dole rysunku pokazano przykładowy wynik kinetycznego RT-PCR otrzymanego dla jednej pary starterów, przy użyciu RNA otrzymanego odpowiednio z 10³, 10⁴ i 10⁵ komórek, oraz dla kontroli bez matrycy.



Rycina 11. Zastosowanie THS do potrzeb proteomiki.

białkami drożdży wymagałaby przeprowadzenia $6\ 604 \times 6\ 604 = 43\ 612\ 816$ krzyżówek. Przeprowadzenie takiej liczby krzyżówek przekracza obecne możliwości badaczy. Nie zdecydowano się zatem na przeprowadzenie analizy indywidualnej 'każdy ORF z każdym ORF'. Zastosowano inne podejścia: strategię grupową oraz badania wybranych genów [40,41]. It i współpracownicy [40], używając standardowych technik klonowania przygotowali konstrukty noszące w postaci 'przynęty' i 'zdobyczy' niemal każdy ORF drożdży. Następnie przeprowadzili transformację szczepów na płytkach titracyjnych (96-dółkowych) wprowadzając indywidualne 'przynęty' do szczepu o genotypie MATa GAL2::ADE2 GAL1::HIS3 a 'zdobycze' do szczepu o genotypie MATa SPAL10::URA3 UASGAL1::HIS3. Wszystkie klon z danej płytki titracyjnej, pozostałe po odrzuceniu partnera dwuhybrydowego, tworzyły po zmieszaniu pojedynczą pulę. Ostatecznie stworzono 62 pule zawierające do 96 klonów każda, zarówno dla klonów niosących 'przynęty' jak i 'zdobycze'. Używając techniki jednoczesnej filtracji prób przeprowadzono 3 844 krzyżówki pomiędzy poszczególnymi pulami. Genotypy szczepów rodzicielskich umożliwiły selekcję, uzyskanych w wyniku krzyżówek komórek diploidalnych, na podłożu bez adeniny, histydyny i uracylu. Otrzymane klon pasażowano, by potwierdzić aktywację genów reporterowych. Z wybranych klonów odyskiwano sekwencję 'przynęty' i 'zdobyczy', stosując kolejno PCR kolonijny i sekwencjonowanie jego produktu. Uzyskane sekwencje służyły do przeszukiwania bazy danych sekwencji genów drożdży w celu ich identyfikacji. W rezultacie otrzymano 15 523 klonów pozytywnych, w tym 4 546 par interaktantów pomiędzy 3 278 białkami. Szczę-

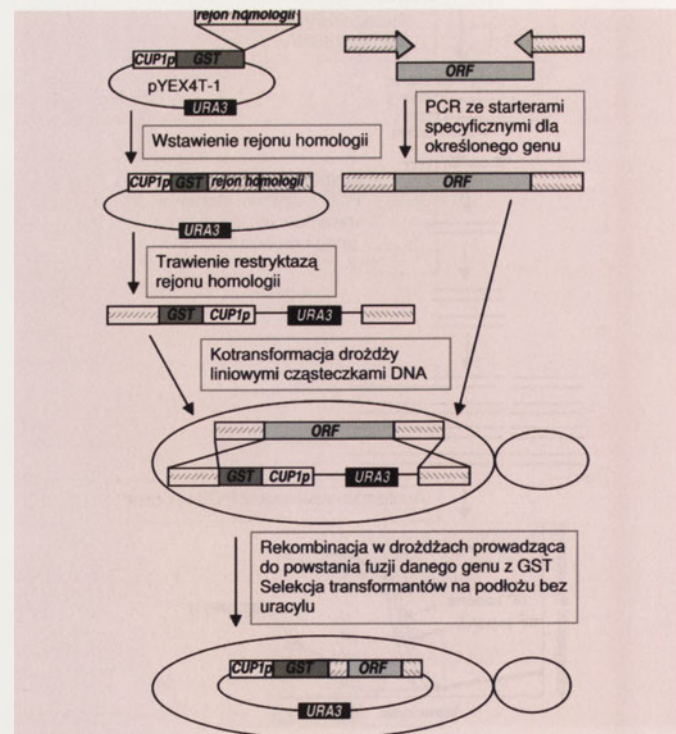
gółowe dane dostępne są pod adresem: <http://genome.c.kanazawa-u.ac.jp/Y2H>.

Uetz wraz ze współpracownikami [41] podeszli do zagadnienia inaczej. Skonstruowali macierz około 6 000 transformantów drożdży niosących 'zdobycze'. Uzyskane klon były systematycznie krzyżowane ze 192 szczepami drożdży niosącymi 'przynęty'. W drugim podejściu badacze ci mieszały 6 000 szczepów niosących potencjalne 'zdobycze' i użyli tak skonstruowanej puli do stworzenia biblioteki drożdży, po czym użyli tej biblioteki do krzyżówek z poszczególnymi 'przynętami'. W rezultacie udało się wykryć 957 potencjalnych oddziaływań, w których brały udział 1 004 białka.

ZNAKOWANIE BIAŁEK NA SKALĘ GENOMOWĄ

Korzyści płynące z badania znakowanych białek (białek z dołączonym do nich znacznikiem peptydowym zwanym inaczej tag-iem lub epitopem, do którego istnieją produkowane komercyjnie przeciwciała) są na tyle duże, że próbę wyznakowania białek na skalę globalną podjęło niezależnie kilka zespołów badawczych. Oprócz fuzji białek drożdży z β -gal i epitopem 3xHA (patrz rozdział „Insercje transpozonowe”), wykonano również fuzje z GST (ang. *glutathion S-transferase*), GFP (ang. *green fluorescent protein*) i TAP-tagiem (ang. *tandem affinity purification*).

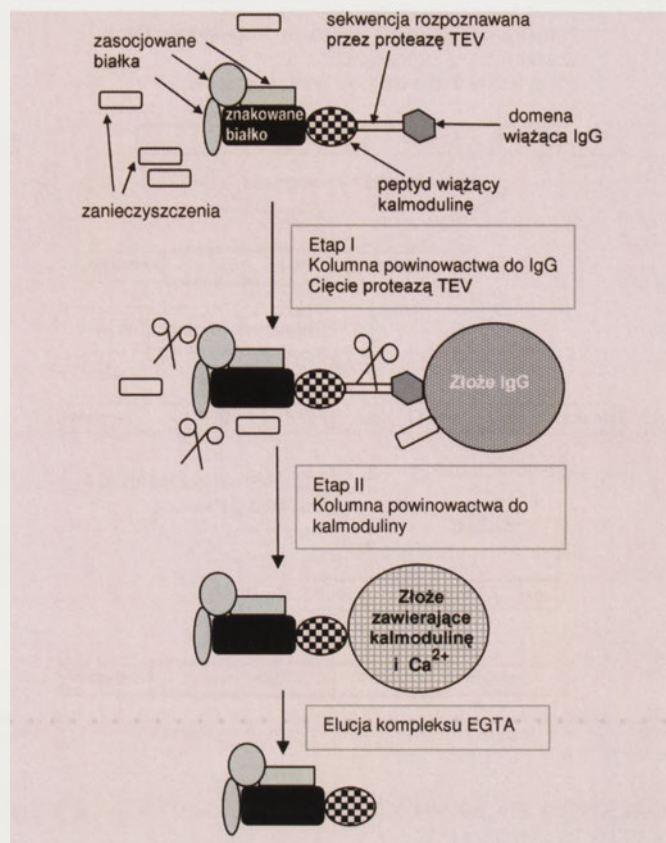
Do potrzeb znakowania ORF-ów GST wykorzystano wyprodukowane *in vitro* w reakcji PCR liniowe cząsteczki DNA specyficzne dla każdego genu. Tak uzyskane DNA wprowadzono następnie, na drodze rekombinacji homologicznej w drożdżach (Ryc. 12), do wektorów ekspresyjnych pod promotor indukowany jonami miedzi



Rycina 12. Schemat strategii, w której plazmidy, niosące fuzje genowe GST-ORF pod promotorem CUP1 indukowanym jonami miedzi, powstają na drodze rekombinacji w drożdżach.

[42]. W ten sposób uzyskano 6144 niezależnych plazmidów ekspresyjnych niosących fuzje genowe poszczególnych ORF-ów drożdży z GST. Nadprodukowane białka izolowane na drodze chromatografii powinowactwa do glutationu mogą zostać zbadane pod interesującym nas względem. Martzen i współpracownicy [42] przebadali 64 pule zawierające po 96 oczyszczonych białek w trzech różnych testach aktywności enzymatycznych, o których nie było wiadomo jakie białko je katalizuje. Za każdym razem obserwowaną aktywność można było przypisać pojedynczej puli białkowej. Dalsza analiza umożliwiała identyfikację pojedynczych fuzji GST-ORF odpowiedzialnych za daną reakcję. Postępowanie to doprowadziło do identyfikacji trzech enzymów: fosfodiesterazy cyklicznej działającej na cykliczny 1"-2"fosforan adenylozyny (Appr>p), enzymu procesującego Appr-1"-p, i metylotransferazy cytochromu c.

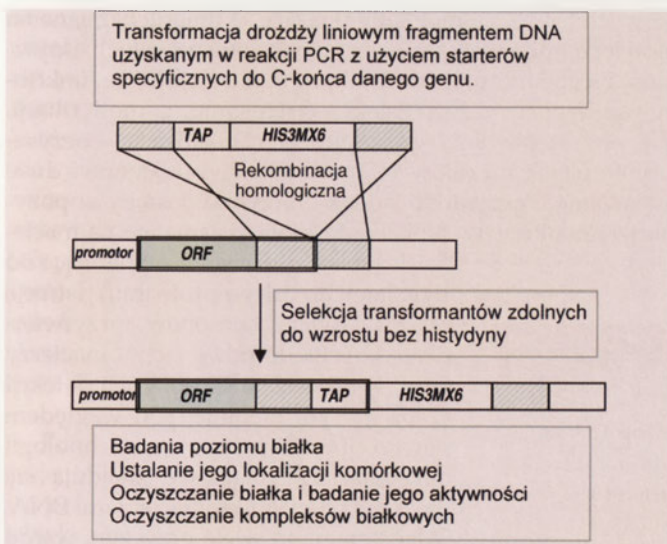
Fuzje poszczególnych ORF-ów z TAP-tagem umieszczonym na C-końcu wprowadzono bezpośrednio do genomu, w ich naturalne *loci*. Fuzje genowe uzyskano na drodze rekombinacji homologicznej w drożdżach z użyciem fragmentów DNA otrzymanych podczas reakcji PCR z zastosowaniem specyficznych dla danego ORF starterów i kasety niosącej oprócz tag-a również marker selekcyjny *HIS3MX6* (Ryc. 13). Sam TAP-tag jest zaprojektowany w ten sposób, by umożliwić wydajne i dokładne oczyszczenie wyznakowanego białka (Ryc. 14). Składa się on z dwóch epitopów: peptydu wiążącego kalmodulinę i powtórzonej dwukrotnie domeny wiążącej IgG, oddzielonych krótkim łącznikiem zawierającym sekwencję rozpoznawaną przez proteazę TEV. TAP-tagowane białka wychwytywane są z ekstraktów komórkowych na kolumnie powinowactwa do IgG, a następnie trawione proteazą TEV w celu uwolnienia związanego materiału. Eluat inkubuje się ze złożem opłaszczonym kalmoduliną w obecności jonów wapnia. Etap ten umożliwia nie tylko usunięcie proteazy TEV, ale i uwolnienie oczyszczanego białka od resztek zanieczyszczeń pozostałych po pierwszym etapie oczyszczania. Po dokładnym odpłukaniu związany materiał odzyskuje się ze złoża używając EGTA. Przedstawio-



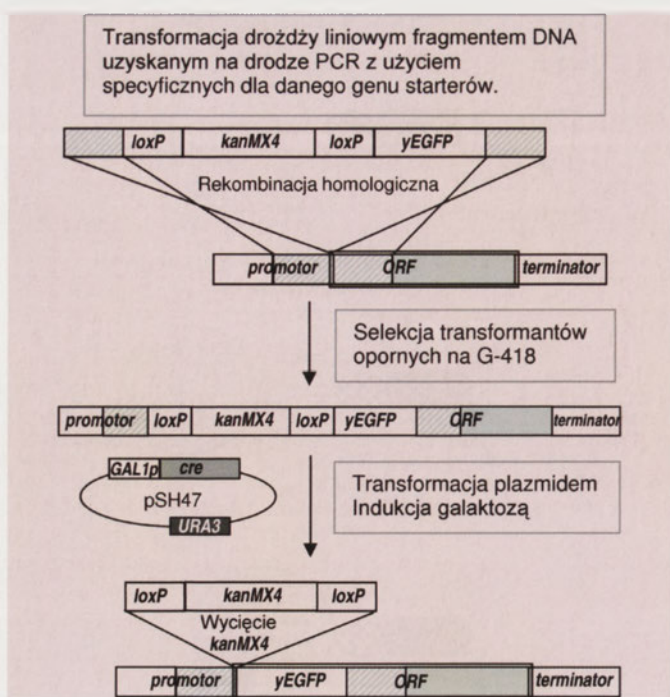
Rycina 14. Strategia oczyszczania białek znakowanych TAP-tagem.

na metoda umożliwia pozyskanie materiału do przeprowadzenia testów aktywności badanych białek; pozwala również na oczyszczanie kompleksów białkowych [43]. Skonstruowanie pełnej kolekcji fuzji genowych dla każdego ORF z TAP-tagem w połączeniu z immunodetekcją umożliwiło zbadanie poziomu ekspresji wszystkich białek drożdży [44]. Dowiedzieliśmy się m.in., że około 80% proteomu jest wyrażane w logarytmicznej fazie wzrostu w warunkach standardowych hodowli. Ilość białek w komórce waha się od kilkudziesięciu do miliona cząsteczek na komórkę. A wiele z białek kluczowych dla życia komórki oraz większość czynników transkrypcyjnych występuje w komórce w tak niewielkiej ilości, że inne metody proteomiczne czy genomiczne nie były nawet w stanie ich wychwycić.

N-terminalne fuzje z GFP stworzono przez integrację do genomu liniowego fragmentu DNA, otrzymanego w reakcji PCR, z użyciem kasety *loxP kanMX4 loxP-yEGFP* i 70-nukleotydomowych starterów o sekwencji homologicznej odpowiednio do sekwencji znajdującej się tuż przed i tuż za kodonem START danego genu (Ryc. 15). Obecny w kasecie marker *kanMX4* umożliwia selekcję integranów na G-418. Wprowadzenie do otrzymanych szczepów plazmidu ekspresyjnego niosącego gen kodujący rekombinazę Cre, umożliwia zajście rekombinacji *Cre-loxP* po indukcji promotora, co w efekcie prowadzi do powstania fuzji genowej *GFP-ORF* z naturalnego promotora. Otrzymane w ten sposób fuzje genowe z GFP umożliwiają przeprowadzenie badań lokalizacyjnych poszczególnych białek [45].



Rycina 13. Schemat przedstawiający zasadę konstrukcji fuzji genowych poszczególnych ORF-ów z TAP-tagem w ich naturalnych *loci*.



Rycina 15. Schemat przedstawiający zasadę konstrukcji fuzji genowych GFP-ORF w naturalnych loci poszczególnych genów.

BIAŁKOWE ŻELE DWUKIERUNKOWE I SPEKTROMETRIA MAS

Innym podejściem do zrozumienia funkcji genu jest studiowanie właściwości białka, które dany gen koduje. Odpowiedzi na pytania o to, czy badane białko ulega modyfikacji w określonych warunkach i czy znana jest funkcja białek, z którymi tworzy kompleks, mogą nam zasugerować funkcję jaką dane białko pełni. Technika, która dobrze sprawdza się w badaniach mieszanki białek jest elektroforeza dwukierunkowa wysokiej rozdzielczości. Przy jej użyciu możemy rozdzielić próbki uzyskane na drodze immunoprecypitacji kompleksów komórkowych, a nawet ekstrakty komórkowe uzyskane z komórek hodowanych w różnych warunkach. Uzyskane podczas rozdzielania elektroforetycznego plamy odpowiadające poszczególnym białkom, a uwidocznione bądź barwieniem, bądź radiograficznie, mogą być następnie wycięte z żelu i poddane dalszej analizie. Jeden ze stosowanych sposobów identyfikacji plam obejmuje określenie: masy, punktu izoelektrycznego oraz poziomu włączonego znakowanego radioaktywnie aminokwasu dla każdej plamy porównanie wyników z danymi wydedukowanymi dla poszczególnych białek [46]. Inną metodą identyfikacji plam

Tabela 3. Rodzaje mikromacierzy białkowych i ich zastosowania.

Mikromacierze	Unieruchomiona frakcja	Znakowana próba	Badane oddziaływanie
Immunologiczne	przeciwciało antygen	przeciwciało przeciwciało	antygen-przeciwciało
Analityczne	białko	farmaceutyk	białko-białko
		substrat	białko-mała cząsteczka
		liposom	enzym-substrat białko-lipid
Analityczne	ligand	białko	receptor-ligand
	białko	ligand	

jest stosowana coraz częściej spektrometria mas. Badane białko trawi się enzymatycznie, a uzyskane peptydy poddaje analizie w spektrometrze masowym. Uzyskane dane, po porównaniu z przewidywanymi dla poszczególnych białek danych teoretycznych, umieszczonych w bazach danych i obejmujących cały proteom drożdży, pozwalają na identyfikację białek w próbce [47,48]. Technika tę zastosowano z powodzeniem do badania zmian proteomu spowodowanych: szokiem cieplnym [46], stresem oksydacyjnym [49] lub osmotycznym [50]. Z jej pomocą wykazano również m.in. N-acetylację wielu białek oraz obecność białek będących produktami genów, których mRNA podlega składaniu [46]. Technika ta służyć może również identyfikacji nowych komponentów danego procesu, jak w przypadku badania rybosomów [51].

ANALIZA 'TROPÓW METABOLICZNYCH'

'Tropy metaboliczne', to zestaw metabolitów, które pozostawia po sobie lub wydziela do podłoża każda komórka. Szczepy niosące mutacje różnych genów różnią się między sobą w sposób powtarzalny 'tropami metabolicznymi', które mogą być zanalizowane spektrometrią mas poprzez bezpośrednie wstrzyknięcie badanej próbki do elektrozpylacza [52] lub spektroskopią w podczerwieni z transformacją Fourier'a. Często zmiany w aktywności określonego enzymu powodują tylko niewielkie zmiany w wydajności danej ścieżki metabolicznej i mogą pozostać niezauważone w typowych testach fenotypowych. Tymczasem, zmiany takie mogą mieć olbrzymi wpływ na stężenie metabolitów pośrednich szlaku. Przedstawiona tu metoda jest tania i ma dużą wydajność. Stosując liczne kontrole metaboliczne oraz badając komórki wystawione na działanie czynników o znanym sposobie działania, można stworzyć wzorce rozpoznawania dla tej techniki [53].

MIKROMACIERZE BIAŁKOWE

Powszechnie obecnie stosowane mikromacierze umożliwiają wygodną i szybką detekcję tysięcy uporządkowanych w znany sposób elementów, których właściwości mogą być mierzone równocześnie. W przypadku mikromacierzy białkowych [54,55,56] molekuly wiążące są unieruchamiane na powierzchni nośnika, a następnie testowana jest ich aktywność biochemiczna (Tab. 3). Ze względu na fakt, że funkcjonowanie białek często zależy od ich stanu, tj. modyfikacji, współwystępowania w kompleksach i lokalizacji – oczyszczenie białek do celów mikromacierzowych stanowi duże wyzwanie. Poczyniono jednak olbrzymie postępy w pozyskiwaniu aktywnych białek do umieszczania ich na macierzach (opisano macierze zawierające od 100 białek do całego proteomu). Istnieje również wiele sposobów przytwierdzenia białek do powierzchni macierzy (Tab. 4) i rozmaite sposoby ich detekcji (Tab. 5). Tym niemniej pod względem powszechności i rozwoju technologii mikromacierze białkowe znajdują się daleko w tyle za mikromacierzami DNA. Składa się na to wiele przyczyn, wśród nich labilność konformacji i aktywności unieruchomionego polipeptydu. Toteż

Tabela 4. Sposoby przyłączania białek do powierzchni mikromacierzy białkowych.

Sposób przyłączenia	Powierzchnia	Modyfikacja białka	Orientacja białka
Absorbpcja i adsorbpcja	PVDF* nitroceluloza powlekanie polilizyną	brak	przypadkowa
Wiązanie kowalencyjne	aktywowanie grupą aldehydową lub epoksydową silikon powlekany złotem nanostudzienki PDMS**	brak	przypadkowa
Dyfuzja	trójwymiarowa wyściółka z żelu cienki film agarozowy	brak	przypadkowa
Hybrydyzacja	powlekanie DNA/RNA	brak	uporządkowana
Wiązanie powinowactwa	powlekanie awidyną powlekanie Ni-NTA***	biotynylacja His6-tag	uporządkowana

*PVDF – polifluorek winylidenu, **PDMS – polidimetylosiloksan, ***Ni-NTA – złoże niklowe

Tabela 5. Metody detekcji używane w eksperymentach z wykorzystaniem mikromacierzy białkowych.

Detekcja	Znakowanie	Odczyt danych
Immunologiczna	enzymatyczne fluorescencyjne	kamera CCD skanowanie laserem
Izotopowa	izotopowe	fosfoobrazowanie klisza rentgenowska
Elektrochemiczna	sprzężenie z metalem	konduktometria
Bezpośrednia	brak	spektrometria mas pomiar zmian powierzchni mikroskopią sił atomowych pomiar współczynnika załamania światła

mimo pojedynczych publikacji dowodzących wielkich możliwości mikromacierzy białkowych [57,58], musimy jeszcze poczekać na ich upowszechnienie.

PODSUMOWANIE

Opisane powyżej metody, których działanie przetestowane zostało na przykładzie modelowego organizmu eukariotycznego jakim są drożdże *S. cerevisiae* mogą być, a nawet już są stosowane do badania dowolnego innego organizmu [59-64]. Oprócz informacji, które uzyskać można równie dobrze (choć wolniej), korzystając z metod biologii konwencjonalnej, jest coś jeszcze, co oferuje nam nowe genomiczne podejście. Poznajemy mianowicie sieci zależności pomiędzy genami, białkami, szlakami metabolicznymi czy też procesami komórkowymi. Nie tylko uzyskujemy wiadomości o pojedynczych genach i ich funkcji, ale możemy je również umiejscowić w *organellum* komórkowym czy fazie cyklu komórkowego. Dodatkowy atut stanowi fakt, że informacje, które o genach pozyskujemy, ukazują nam je z różnych stron, co prowadzi do poznania rzeczywistej roli ich produktów w komórce. Wydaje się też, że stosowanie metod genomiki funkcjonalnej i budowanie sieci zależności między genowych ułatwić może wyjaśnienie uzyskanych dawniej, ale dotąd niejasnych danych, np. istoty działania supresorów uzyskanych dla niektórych genów.

Prowadzenie badań w skali globalnej praktycznie eliminuje możliwość stosowania 'myślenia życzeniowego'. Można powiedzieć, że takie podejście eksperymentalne sprzyja obiektywizacji uzyskiwanych wyników. Wydaje się też, że użycie technik globalnych zbliża nas do osiągnięcia infor-

macyjnej masy krytycznej, która wyzwoli falę nowych odkryć.

Warto jednak pamiętać, że tak w biologii klasycznej jak i genomicznej najważniejsze są: prawidłowe formułowanie pytań i właściwy wybór warunków doświadczenia. O ile jednak stosowanie technik genomiki funkcjonalnej przyczynia się do zwiększenia tempa zdobywania nowych danych, o tyle metody biologii konwencjonalnej umożliwiają nie tylko weryfikację tych danych, ale i projektowanie nowych podejść metodycznych. Wszak przy ich tworzeniu bazuje się na dotychczasowej wiedzy.


PIŚMIENNICTWO

- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274: 546, 563-567
- Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Veronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, Andre B, Arkin AP, Astromoff A, El-Bakkoury M, Bangham R, Benito R, Brachat S, Campanaro S, Curtiss M, Davis K, Deutschbauer A, Entian KD, Flaherty P, Foury F, Garfinkel DJ, Gerstein M, Gotte D, Guldener U, Hegemann JH, Hempel S, Herman Z, Jaramillo DF, Kelly DE, Kelly SL, Kotter P, LaBonte D, Lamb DC, Lan N, Liang H, Liao H, Liu L, Luo C, Lussier M, Mao R, Menard P, Ooi SL, Revuelta JL, Roberts CJ, Rose M, Ross-Macdonald P, Scherens B, Schimmack G, Shafer B, Shoemaker DD, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Strathern JN, Valle G, Voet M, Volckaert G, Wang CY, Ward TR, Wilhelmly J, Winzeler EA, Yang Y, Yen G, Youngman E, Yu K, Bussey H, Boeke JD, Snyder M, Philippsen P, Davis RW, Johnston M (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418: 387-391
- Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connelly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H, Liebundguth N, Lockhart DJ, Lucau-Danila A, Lussier M, M'Rabet N, Menard P, Mittmann M, Pai C, Rebischung C, Revuelta JL, Riles L, Roberts CJ, Ross-MacDonald P, Scherens B, Snyder M, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Veronneau S, Voet M, Volckaert G, Ward TR, Wysocki R, Yen GS, Yu K, Zimmermann K, Philippsen P, Johnston M, Davis RW (1999) Functional characterization of *Saccharomyces cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285: 901-906
- Ross-Macdonald P, Coelho PS, Roemer T, Agarwal S, Kumar A, Jansen R, Cheung KH, Sheehan A, Symoniatis D, Umansky L, Heidtman M, Nelson FK, Iwasaki H, Hager K, Gerstein M, Miller P, Roeder GS, Snyder M (1999) Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. *Nature* 402: 413-418
- Kumar A, Cheung KH, Ross-Macdonald P, Coelho PS, Miller P, Snyder M (2000) TRIPLES: a database of gene function in *Saccharomyces cerevisiae*. *NAR* 28: 81-84

6. Velculescu V, Zhang L, Zhou W, Vogelstein J, Basrai MA, Bassett DE Jr, Hieter P, Vogelstein B, Kinzler KW (1997) Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* 88: 243-251
7. Kal AJ, van Zonneveld AJ, Benes V, van den Berg M, Koerkamp MG, Albermann K, Strack N, Ruijter JM, Richter A, Dujon B, Ansoerge W, Tabak HF (1999) Dynamics of gene expression revealed by comparison of serial analysis of gene expression transcript profiles from yeast grown on two different carbon sources. *Mol Biol Cell* 10: 1859-1872
8. Ni L, Snyder M (2001) A genomic study of the bipolar bud selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 12: 2147-2170
9. Shoemaker DD, Lashkari DA, Morris D, Mittmann M, Davis RW (1996) Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy. *Nat Genet* 14: 450-456
10. Eason RG, Pourmand N, Tongprasit W, Herman ZS, Anthony K, Jejelowo O, Davis RW, Stolc V (2004) Characterization of synthetic DNA bar codes in *Saccharomyces cerevisiae* gene-deletion strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 11046-11051
11. Ross-Macdonald P (2000) Functional analysis of the yeast genome. *Funct Integr Genomics* 1: 99-113
12. Deutschbauer AM, Williams RM, Chu AM, Davis RW (2002) Parallel phenotypic analysis of sporulation and postgermination growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15530-15535
13. Ooi SL, Shoemaker DD, Boeke JD (2001) A DNA Microarray-based genetic screen for Nonhomologous End-Joining mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 294: 2552-2556
14. Mercier G, Berthault N, Mary J, Peyre J, Antoniadis A, Comet JP, Cornuejols A, Froidevaux C, Dutreix M (2004) Biological detection of low radiation doses by combining results of two microarray analysis methods. *Nucleic Acid Res* 32: e12
15. Tong AH, Evangelista M, Parsons AB, Xu H, Bader GD, Page N, Robinson M, Raghibizadeh S, Hogue CW, Bussey H, Andrews B, Tyers M, Boone C (2001) Systematic genetic analysis with ordered array of yeast deletion mutants. *Science* 294: 2364-2368
16. Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11: 4241-4257
17. Gasch AP, Huang M, Metzner S, Botstein D, Elledge SJ, Brown PO (2001) Genomic Expression Responses to DNA-damaging Agents and the Regulatory Role of the Yeast ATR Homolog Mec1p. *Mol Biol Cell* 12: 2987-3003
18. DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genome scale. *Science* 278: 680-686
19. Ferea TL, Botstein D, Brown PO, Rosenzweig RF (1999) Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9721-9726
20. Cho RJ, Campbell MJ, Winzeler EA, Steinmetz L, Conway A, Wodicka L, Wolfsberg TG, Gabrielian AE, Landsman D, Lockhart DJ, Davis RW (1998) A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell* 2: 65-73.
21. Chu S, DeRisi J, Eisen M, Mulholland J, Botstein D, Brown PO, Herskowitz I (1998) The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* 282: 699-705
22. Panda S, Sato TK, Hampton GM, Hogenesch JB (2002) An array of insights: application of DNA chip technology in the study of cell biology. *Trends Cell Biol* 13: 151-156
23. Hughes TR, Roberts CJ, Dai H, Jones AR, Meyer MR, Slade D, Burchard J, Dow S, Ward TR, Kidd MJ, Friend SH, Marton MJ (2000) Widespread aneuploidy revealed by DNA microarray expression profiling. *Nat Genet* 25: 333-337
24. Raghuraman MK, Winzeler EA, Collingwood D, Hunt S, Wodicka L, Conway A, Lockhart DJ, Davis RW, Brewer BJ, Fangman WL (2001) Replication dynamics of the yeast genome. *Science* 294: 115-121
25. Lemoine FJ, Degtyareva NP, Lobachev K, Petes TD (2005) Chromosomal translocations in yeast induced by low levels of DNA polymerase a model for chromosome fragile sites. *Cell* 120: 587-598
26. Primig M, Williams RM, Winzeler EA, Tevzadze GG, Conway AR, Hwang SY, Davis RW, Esposito RE (2000) The core meiotic transcriptome in budding yeasts. *Nat Genet* 26: 415-423
27. Winzeler EA, Castillo-Davis CI, Oshiro G, Liang D, Richards DR, Zhou Y, Hartl DL (2003) Genetic diversity in yeast assessed with whole-genome oligonucleotide arrays. *Genetics* 163: 79-89
28. Horak CE, Snyder M (2002) Global analysis of gene expression in yeast. *Funct Integr Genomics* 2: 171-180
29. Ren B, Robert F, Wyrick JJ, Aparicio O, Jennings EG, Simon I, Zeitlinger J, Schreiber J, Hannett N, Kanin E, Volkert TL, Wilson CJ, Bell SP, Young RA (2000) Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* 290: 2306-2309
30. Lieb J, Liu X, Botstein D, Brown PO (2001) Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nat Genet* 28: 327-334
31. Wyrick JJ, Aparicio JG, Chen T, Barnett JD, Jennings EG, Young RA, Bell SP, Aparicio OM. (2001) Genome-wide distribution of ORC and MCM proteins in *Saccharomyces cerevisiae*: high-resolution mapping of replication origins. *Science* 294: 2357-2360
32. Smith V, Botstein D, Brown PO (1995) Genetic footprinting: A genomic strategy for determining a gene's function given its sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6479-6483
33. Smith V, Chou KN, Lashkari D, Botstein D, Brown PO (1996) Functional analysis of the genes of yeast chromosome V by genetic footprinting. *Science* 274: 2069-2074
34. Graham KJ, Holland MJ (2005) PrimerSelect: a transcriptome-wide oligonucleotide primer pair design program for kinetic RT-PCR-based transcript profiling. *Methods Enzymol* 395: 544-553
35. Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z (1988) Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors *in vivo*: analysis by mRNA phenotyping. *Science* 241: 708-712
36. Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25: 169-193
37. Holland M (2002) Transcript abundance in yeast varies over six orders of magnitude. *J Biol Chem* 277: 14363-14366
38. Michan C, Monje-Casas F, Pueyo C (2005) Transcript copy number of genes for DNA repair and translesion synthesis in yeast: contribution of transcription rate and mRNA stability to the steady-state level of each mRNA along with growth in glucose-fermentative medium. *DNA Repair* 4: 469-78
39. Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246
40. Ito T, Tashiro K, Muta S, Ozawa R, Chiba T, Nishizawa M, Yamamoto K, Kuhara S, Sakaki Y (2000) Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: a comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between yeast proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1143-1147
41. Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M, Pochart P, Qureshi-Emili A, Li Y, Godwin B, Conover D, Kalbfleisch T, Vijayadamar G, Yang M, Johnston M, Fields S, Rothberg JM (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403: 623-627
42. Martzen MR, McCraith SM, Spinelli SL, Torres FM, Fields S, Grayhack EJ, Phizicky EM (1999) A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science* 286: 1153-1155
43. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotech* 17: 1030-1032
44. Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425: 737-741
45. Prein B, Natter K, Kohlwein SD (2000) A novel strategy for constructing N-terminal chromosomal fusions to green fluorescent protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 485: 29-34

46. Garrels JI, McLaughlin CS, Warner JR, Futcher B, Latter GI, Kobayashi R, Schwender B, Volpe T, Anderson DS, Mesquita-Fuentes R, Payne WE (1997) Proteome studies of *Saccharomyces cerevisiae*: identification and characterization of abundant proteins. *Electrophoresis* 18: 1347-1360
47. Sagliocco F, Guillemot JC, Monribot C, Capdevielle J, Perrot M, Ferran E, Ferrara P, Boucherie H (1996) Identification of proteins of the yeast protein map using genetically manipulated strains and peptide-mass fingerprinting. *Yeast* 12: 1519-1533
48. Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Boucherie H, Mann M (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14440-14445
49. Godon C, Lagniel G, Lee J, Buhler JM, Kieffer S, Perrot M, Boucherie H, Toledano MB, Labarre J (1998) The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 22480-22489
50. Blomberg A (1997) Osmoresponsive proteins and functional assessment strategies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Electrophoresis* 18: 1429-1440
51. Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM, Yates JR 3rd (1999) Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 17: 676-682
52. Allen JK, Davey HM, Broadhurst D, Heald JK, Rowland JJ, Oliver SG, Kell DB (2003) High-throughput characterisation of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nat Biotechnol* 21: 692-696
53. Ott K-H, Aranibar N, Singh B, Stockton GW (2003) Metabonomics classifies pathways affected by bioactive compounds. Artificial neural network classification of NMR spectra of plant extracts. *Phytochemistry* 62: 971-985
54. Zhu H, Snyder M (2003) Protein chip technology. *Curr Opin Chem Biol* 7: 55-63
55. Templin MF, Stoll D, Schrenk M, Traub PC, Vohringer CF, Joos TO (2002) Protein microarray technology. *Drug Discov Today* 7: 815-822
56. Poetz O, Schwenk JM, Kramer S, Stoll D, Templin MF, Joos TO (2005) Protein microarrays: catching the proteome. *Mech Ageing Dev* 126: 161-170
57. Zhu H, Klemic JF, Chang S, Bertone P, Casamayor A, Klemic KG, Smith D, Gerstein M, Reed MA, Snyder M (2000) Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet* 26: 283-289
58. Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N, Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Mitchell T, Miller P, Dean RA, Gerstein M, Snyder M (2001) Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 293: 2101-2105
59. Bono H, Okazaki Y (2005) The study of metabolic pathways in tumors based on the transcriptome. *Semin Cancer Biol* 15: 290-299
60. Clarke JD, Zhu T (2006) Microarray analysis of the transcriptome as a stepping stone towards understanding biological systems: practical considerations and perspectives. *Plant J* 45: 630-650
61. Calvo KR, Liotta LA, Petricoin EF (2005) Clinical proteomics: from biomarker discovery and cell signaling profiles to individualized personal therapy. *Biosci Rep* 25: 107-125
62. Saito H (2005) Mast cell-specific genes-new drug targets/pathogenesis. *Chem Immunol Allergy* 87: 198-212
63. Stoll D, Templin MF, Bachmann J, Joos TO (2005) Protein microarrays: applications and future challenges. *Curr Opin Drug Discov Devel* 8: 239-252
64. Nau GJ, Richmond JFL, Schlesinger A, Jennings EG, Lander ES, Young RA (2002) Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1503-1508

Decade of genomics – methods for genome investigation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Adrianna Skoneczna 

Institute of Biochemistry and Biophysics PAS, 5A Pawińskiego St., 02-106 Warszawa, Poland

e-mail: ada@ibb.waw.pl

Key words: global methods, genom, transcriptome, proteome, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

The last ten years, since yeast *Saccharomyces cerevisiae* genome was sequenced, brought a big impact in genome-wide techniques. The tenth anniversary of genomic era provokes the following resume: a lot of new methods were invented. The yeast strains libraries carrying transposon insertions, gene deletions or tagged proteins have been created. Using them, the phenotypes of gene deletions, as well as the biological activity, cellular localization and possible modifications of their protein products were elucidated. SAGE analysis and DNA microarray experiments showed gene expression profiles and allowed to build interaction networks of gene regulation. The two dimensional gels, mass spectrometry, protein arrays and two-hybrid system carry information about protein interactions, modifications, and biochemical activities. All these methods permit to increase the number of genes with known cellular functions. Moreover, testing these techniques on yeast *S. cerevisiae* - a model eukaryotic organism - opened the door for their usage in all other species.

Przemysław Nuc^{1,✉}

Katarzyna Nuc²

¹Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Poznań
²Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Poznań

✉Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań; e-mail: przem@amu.edu.pl, tel.: (061) 829 59 06

Artykuł otrzymano 26 września 2006 r.

Słowa kluczowe: *Escherichia*, nadprodukcja, system, wektor

Wykaz skrótów: cAMP – cykliczny adenozynomonofosforan; f-Met – formylometionina; GFP – białko zielonej fluorescencji; IPTG – izopropyl-β-D-1-tiogalaktopiranozyd; IF2 – bakteryjny czynnik inicjacyjny 2; MBP – białko wiążące maltozę; DnaK – białko szoku termicznego z rodziny Hsp 70

Artykuł sponsorowany przez firmę MERCK Sp. z o.o.



STRESZCZENIE

Rosnące zapotrzebowanie na wydajną produkcję rekombinowanych białek stawia liczne wyzwania; począwszy od optymalizacji hodowli komórek w warunkach nadekspresji, dostosowania sekwencji wektora, genu i kodowanego białka do systemu biosyntezy białka gospodarza, poprzez poznawanie mechanizmów zwijania białek, konstrukcję białek fuzyjnych i układów koekspresyjnych, po konieczność ulepszania metod oczyszczania i reaturacji białek. Obecnie *Escherichia coli* jest najbardziej zdefiniowanym i najtańszym systemem biosyntezy białka. Z bogactwem dostępnych i wypróbowanych mutantów najlepiej się nadaje do ekonomicznego testowania nowych konstrukcji genowych i podejmowania prób zwiększania skali produkcji rekombinowanych białek.

WPROWADZENIE

Systemy ekspresji rekombinowanych białek w komórkach pro- i eukariontów opracowuje się by tanio, szybko i bezpiecznie produkować duże ilości białka lub enzymu, który można łatwo oczyścić. Oprócz systemów, których gospodarzem jest *E. coli*, do najpopularniejszych należą: *Bacillus subtilis* oraz *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia pastoris* [1]. Nadprodukcja białek w komórkach ssaków i owadów ogranicza się do skali laboratoryjnej ze względu na drogie podłoża do hodowli. Zwierzęta i rośliny transgeniczne znajdują zastosowanie w produkcji rekombinowanych białek na dużą skalę, lecz początkowy koszt uzyskania, w przypadku zwierząt, a w przypadku roślin spełnienia wymogów bezpieczeństwa, związanych z nierozprzestrzenieniem może być wysoki [2]. Rekombinowane białka warto zatem produkować w systemach eukariotycznych wtedy, gdy nie można ich otrzymać w systemach ekspresyjnych *E. coli* ani w układach drożdżowych.

Systemy ekspresyjne *E. coli* ze względu na dobrze poznaną sekwencję genu, najlepiej zdefiniowany układ transkrypcyjny i translacyjny, duży wybór opisanych promotorów, replikonów oraz mutantów, łatwość ich samodzielnego przygotowania, a także możliwość prowadzenia hodowli w tanich pożywkach i z wykorzystaniem tak prostych czynników selekcyjnych jak antybiotyki, są najczęściej stosowane do nadprodukcji rekombinowanych białek. Trudności nadal sprawiają białka bardzo duże, zawierające liczne mostki dwusiarczkowe, liczne niesparowane grupy tiolowe oraz takie, które wymagają modyfikacji potranslacyjnych. W komórkach *E. coli* z powodzeniem produkuje się interferon, albuminę człowieka, hormony wzrostu i prawie wszystkie rekombinowane enzymy dla diagnostyki i biologii molekularnej [3].

WARUNKI HODOWLI *ESCHERICHIA COLI*

Od warunków w jakich prowadzi się hodowlę *E. coli* zależy to jaką ilość rekombinowanego białka można uzyskać, w jaki sposób i jakiej jakości produkt będzie można oczyścić. Ponieważ nadprodukcja białek w formie ciał inkluzyjnych, wymaga ich denaturacji i ponownego zwijania, co bywa skomplikowane, a na większą skalę zbyt kosztowne, dąży się do uzyskania produktu w formie rozpuszczalnej. Poza dobozem warunków hodowli ważne jest również coraz lepsze poznawanie mechanizmów zwijania białek, roli białek opiekuńczych i izomeraz w tym procesie, a także mechanizmów sekrecji, co pozwala na wykorzystanie przydatnych mutantów i zastosowanie koekspresji białek systemu sekrecyjnego. Po opracowaniu systemu wydajnego w skali laboratoryjnej pojawia się zadanie zwiększenia skali produkcji. Tylko na rynku amerykańskim co roku sprzedaje się około 100 ton wołowego hormonu wzrostu, a w przypadku produkcji białka o zastosowaniach terapeutycznych produkcję trzeba rozpoczynać od kilkudziesięciu kilogramów rocznie [3,4]. Proces zwiększania skali nie jest prosty i wymaga dokładnego skalkulowania opłacalności, a to często wymusza prowadzenie hodowli o dużej gęstości (HCDC – ang: *high cell density cultures*), przekraczającej 50g suchej masy komórek na litr [g(DCW)l⁻¹]

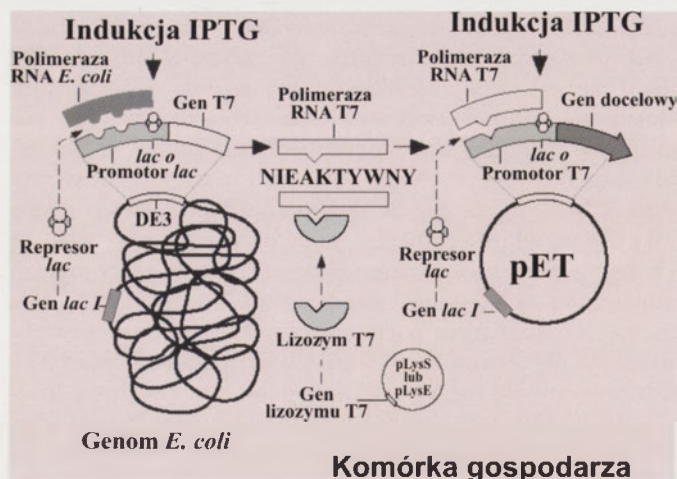
(ang: *dry cell weight*). Żeby planować zwiększanie skali trzeba bardzo dobrze poznać fizjologiczne uwarunkowania dynamiki wzrostu i metabolizmu *E. coli* w warunkach nadprodukcji określonego białka. Mimo ograniczeń, które trzeba przezwyciężyć, takich jak gorsza wymiana gazowa i cieplna, inhibicja substratowa i gromadzenie się substancji hamujących wzrost (koszt dializy bywa za wysoki), takie podejście często się w końcu opłaca. Niektóre składniki pożywek hamują wzrost komórek *E. coli* kiedy występują w zbyt wysokich stężeniach, stąd proste zwiększenie stężenia składników pokarmowych nie daje dobrych efektów. Przykłady granicznych stężeń niektórych składników pożywek: glukoza (50 g/l), amoniak (3 g/l), żelazo (1,15 g/l), magnez (8,7 g/l), fosfor (10 g/l), cynk (0,038 g/l) [4]. Nie jest proste odniesienie warunków produkcji białka w kolbie do fermentora, gdzie w warunkach hodowli o dużej gęstości trzeba uzupełniać składniki pożywki, kontrolować pH, natlenienie i wymianę ciepłą, a jeśli to konieczne, usuwać powstające substancje hamujące wzrost. Jako uzupełniające źródło azotu można stosować np. wodorotlenek amonu by jednocześnie kontrolować pH pożywki. Największe gęstości *E. coli* jakie udało się uzyskać dla szczepów B to 174 g(D-CW)l⁻¹, w warunkach dializowanej hodowli, gdzie źródłem węgla był glicerol. Zwiększanie gęstości hodowli *E. coli* powyżej 200 g(DCW)l⁻¹ nie ma już sensu. Przy takich gęstościach następuje gwałtowny wzrost lepkości hodowli. Przy 400 g(DCW)l⁻¹, jeśli przyjąć, że średnia cylindryczna komórka ma 3 μm długości i 1 μm średnicy, pożywka stanowi już tylko 25% objętości hodowli. Jednym z największych problemów związanych z kulturami *E. coli* o dużej gęstości jest produkcja octanu, która pojawia się zwykle w warunkach ograniczonego natlenienia lub nadmiaru glukozy. Nadmiar glukozy powoduje, że bakterie produkują octan nawet w warunkach tlenowych na skutek wysycenia szlaku kwasów trikarboksylowych. Stężenie octanu przekraczające 5 g/l w pH = 7,0 już hamuje wzrost komórek *E. coli*. Uprotonowany octan blokuje produkcję ATP zmniejszając udział ΔpH w sile protonomotorycznej. To skutkuje zahamowaniem replikacji, transkrypcji i translacji. Octan powstaje także kiedy tempo wzrostu jest za wysokie – najczęściej rzędu 0,2–0,35 h⁻¹, ale zależy to od składu pożywki i od szczepu. Problem hamowania biosyntezy białka przez nadmierną produkcję octanu rozwiązuje się przez ograniczenie źródeł C i N [4,5]. Kiedy źródłem węgla jest glicerol, octan zwykle nie powstaje, prawdopodobnie z powodu powolnego pobierania glicerolu i spowolnienia przepływu węgla przez szlak glikolizy. Czasami wystarczy obniżenie temperatury, co zmniejsza tempo wzrostu i zapotrzebowanie na tlen, a jednocześnie ogranicza powstawanie ciał inkluzyjnych. W niektórych przypadkach, zależnie od nadprodukowanego białka, warto pożywkę uzupełnić odpowiednimi aminokwasami – np. glicyną czy metioniną. Mutacje genów *Ack* (kinazy octanowej) lub *Pta* (fosfotransacetylazy acetylo-CoA), które zaangażowane są w uwalnianie octanu z acetylo-CoA również pozwalają na ograniczenie akumulacji octanu. Mutanta *pta* wykorzystano z powodzeniem w warunkach gęstej hodowli do nadprodukcji ludzkiej interleukiny 2 i lipazy. Można też ograniczyć pobieranie glukozy stosując jej analog – nietoksyczny kompetycyjny inhibitor pobierania glukozy – metylo- α -glukozyd. Czynnikiem ograniczającym wzrost w HDCD bywa także stężenie tlenu. W stanie na-

syconym ilość tlenu rozpuszczonego w wodzie o temperaturze 25°C wynosi 7 mg/litr. Jego ilość w hodowli należy zwiększyć – przez napowietrzanie (zastosowanie czystego tlenu nie jest tanie), szybkie mieszanie pożywki. Czasami stosuje się hodowlę pod zwiększonym ciśnieniem lub koekspresję hemoglobiny. Dobre mieszanie pożywki zapewnia jednorodność produktu – wszystkie komórki powinny mieć jednakowy dostęp do tlenu i do uzupełnianych składników pożywki. Stężenie CO₂ ma wpływ na tempo wzrostu HDCD, ponieważ jego cząstkowe ciśnienie większe niż 0,3 atm zmniejsza tempo wzrostu *E. coli* i powoduje gromadzenie się octanu. Najbardziej kontrolowane warunki wzrostu uzyskuje się stosując wykładnicze uzupełnianie pożywki, dostosowane do logarytmicznego tempa podziałów komórek. W hodowlach o dużych gęstościach problemem staje się nawet metaboliczna produkcja ciepła [4]. Trzeba pamiętać, że już wydajna replikacja plazmidu w komórce jest stresem, a nadprodukcja rekombinowanego białka wprowadza „molekularne zamieszanie”, które objawia się zmianą tempa podziałów, wzrostu i metabolizmu komórki w wyniku gwałtownej utraty energii i zapasu substancji niskocząsteczkowych. Stężenie białka w komórce *E. coli* waha się od 200–300 mg/ml. Nadmierna produkcja heterologicznego białka często kończy się powstawaniem ciał inkluzyjnych lub (i) jego częściową degradacją [6].

WYBÓR PROMOTORA

Promotor powinien być indukowany i pozwalać na wydajną produkcję rekombinowanego białka, tak by jego ilość w krótkim czasie mogła osiągać 10–30% całkowitego białka komórki. Podstawowa ekspresja z takiego promotora (bez indukcji) powinna być jak najmniejsza. Powinien być łatwo indukowany – fizycznie lub chemicznie, z wykorzystaniem prostego induktora, jak *t*-arabinoza lub IPTG. Ponieważ IPTG jest toksyczny, nie zawsze można go stosować, np. do produkcji białek o zastosowaniach leczniczych. Indukcja termiczna jest prosta, ale szczep powinien mieć zmutowany gen *rpoH*, inaczej przy zmianie temperatury zostanie wzbudzona ekspresja białek opiekuńczych i proteaz. Najpopularniejsze systemy do ekspresji białek w *E. coli* wykorzystują specyficzną transkrypcję z udziałem polimerazy RNA faga T7, której gen pod kontrolą promotora *lac* można indukować za pomocą IPTG. Najczęściej wykorzystywane są plazmidy pET (Novagen) – aktualnie ponad 40 wersji. W roku 2003 ponad 90% struktur zdeponowanych w PDB (Protein Data Bank) było wynikiem nadprodukcji białek w tym systemie [7].

Ekspresja w systemie pET najczęściej polega na tym, że genom gospodarza ma wbudowany fragment genomu faga (λ DE3), zawierający gen polimerazy RNA faga T7, pod kontrolą promotora *lacUV5*. Chociaż promotor *lacUV5* jest mniej wrażliwy na regulację przez cAMP-CRP niż promotor *lac*, dodatek glukozy do pożywki w ilości 1% ogranicza poziom cAMP i wzmacnia jego represję. Białko LacI lub jego 10 razy bardziej skuteczny mutant LacI^d jest represorem promotora *lacUV5* i hybrydowego promotora *T7 / lac*, znajdującego się na plazmidzie ekspresyjnym. Gen *lacI* naturalnie występuje na chromosomie *E. coli*, a w niektórych systemach także na plazmidzie ekspresyjnym – zawierają go wektory pET i ich pochodne. Kiedy IPTG wiąże się z LacI, tetrameryczny



Rycina 1. Indukcja ekspresji genu z promotorem T7 za pomocą IPTG w systemie pET (Novagen).

repressor uwalnia promotor polimerazy RNA T7 i hybrydowy promotor na plazmidzie ekspresyjnym, co uruchamia transkrypcję i translację polimerazy T7. Powstała polimeraza RNA T7 rozpoznaje promotor T7 – unikalną 20-nukleotydową sekwencję (TAATACGACTCACTATAGGG) plazmidu ekspresyjnego i rozpoczyna transkrypcję z szybkością osiągającą 230 nt/s – prawie pięciokrotnie szybciej niż polimeraza RNA *E. coli* (50 nt s⁻¹). Śladowy (podstawowy) poziom ekspresji polimerazy RNA T7 jest dodatkowo eliminowany przez koekspresję lizozymu T7 – naturalnego inhibitora polimerazy RNA T7 z plazmidu pLysS (*silent*) lub pLysE (*expressed*). Ramka odczytu lizozymu na tych dwóch plazmidach ma różną orientację – zgodną (pLysE) lub odwrotną (pLysS) w stosunku do promotora Tc – indukowanego przez tetracyklinę [7] (Ryc. 1).

WYBÓR SZCZEPU *ESCHERICHIA COLI*

Do nadprodukcji białek w systemach zależnych od polimerazy RNA faga T7 najczęściej wybieramy odpowiednie szczepy typu (DE3). Szczepy *trxB/gor* – zapewniają środowisko dla powstawania mostków dwusiarczkowych w cytoplazmie, np. szczep Origami (Novagen). Szczep *E. coli* Turner (Novagen) ma uszkodzony gen permeazy laktozy – *lacY*, co pozwala na płynną regulację ekspresji rekombinowanych białek w tym systemie stężeniem IPTG. Jest to przydatne gdy obniżenie poziomu produkcji rekombinowanego białka pozwala uzyskać produkt o lepszej rozpuszczalności i aktywności. Szczepy Rosetta i Rosetta-gami (Novagen) z plazmidami pLysRARE pozwalają na ekspresję heterologicznych białek, których ramki odczytu zawierają rzadko wykorzystywane u *E. coli* kodony, np. AGA.

Szczepy C41(DE3) i C43(DE3) to mutanty przeznaczone do ekspresji białek błonowych, które w innych szczepach tworzą ciała inkluzyjne. W warunkach nadprodukcji białka dochodzi raczej do proliferacji błon, aniżeli do powstawania ciał inkluzyjnych. Zwiększoną stabilność mRNA zapewniają szczepy BL21, posiadające mutację *rne131*.

W przypadku białek silnie toksycznych, gen polimerazy T7 wprowadza się infekując szczepy, które nie posiadają

genu polimerazy RNA T7 (np. BL21, BLR) bakteriofagiem λ CE6. BLR to pochodna BL21 z uszkodzonym genem *recA* co pozwala na utrzymanie i stabilną ekspresję genu z sekwencjami powtórzonymi, a B834 ma uszkodzone geny proteaz *lon* i *ompT*. Infekcja hodowli fagiem λ CE6 wprowadza konstytutywnie ekspresyjny gen polimerazy RNA faga T7. Nie dochodzi do lizy komórek, a w ciągu 2-3 godzin można uzyskać do 200 mg rekombinowanego białka z 1 litra hodowli [8].

REPLIKON

Gen służący do nadprodukcji rekombinowanego białka najczęściej włącza się do plazmidu o niskiej liczbie kopii, zwykle zawierający replikon ColE1 lub p15A, aby jego replikacja nie obciążała nadmiernie metabolizmu komórki.

Ścisła kontrola liczby kopii plazmidu ekspresyjnego pozwala także na ograniczenie śladowej ekspresji wprowadzonego genu przed indukcją. Plazmid ekspresyjny pET-coco (Novagen), dzięki zastosowaniu elementów replikonu epizomu F – *oriS* i *repF*, a także elementów *cis parABC*, zapewniających rozdział plazmidów między komórki potomne, może być przed indukcją utrzymywany w liczbie 1 kopii na komórkę w pożywce LB zawierającej 0,2% D-glukozy. Przed indukcją ekspresji wprowadzonego genu można zwiększyć liczbę kopii plazmidu przez dodanie do pożywki L-arabinozy (0,01%), co powoduje, że replikator TrfA uruchamia miejsce początku replikacji *oriV* i liczba kopii plazmidu w komórce zwiększa się do 20-50. Zastosowanie takiego wektora w szczepie Turner pozwala na testowanie bardzo szerokiego zakresu poziomu ekspresji wprowadzonego genu [9].

Otrzymanie wieloenzymatycznego kompleksu czy badanie oddziaływań białko-białko może wymagać koekspresji dwóch białek, podobnie, uzyskanie aktywnego, prawidłowo zwinętego białka może wymagać jego koekspresji z białkiem opiekuńczym. Ramki odczytu umieszcza się albo na jednym wektorze typu Duet (Novagen) (Tab. 1), albo na kilku, których replikony należą do różnych grup niezgodności (Tab. 2). Dzięki możliwości utrzymania w komórce *E. coli* jednocześnie 4 z pięciu wektorów typu Duet możliwa jest koekspresja nawet ośmiu białek [10].

Tabela 1. Replikony plazmidów w systemach ekspresyjnych *E. coli*, na podstawie katalogu Novagen 2006/2007.

Plazmid(y)	Replikon (pochodzenie)	Liczba kopii
pET (all) pETDuetTM-1	ColE1 (pBR322)	~40
pACYCDuetTM-1 pLysS pLysE pLacI pRARE	P15A (pACYC184)	10-12
pRSF (all)	RSF1030	> 100
pCDF (all)	ClonDF13	20-40
pETBlueTM (all) pTriExTM (all)	ColE1 (pUC)	> 500
pETcoco (all)	Mini-F/RK2 (2) (pBeloBAC11, RK2)	1, amplifikowalny do ~40
pCOLADuetTM-1	ColA	~20-40

Kiedy warunki nadprodukcji i sposób oczyszczania rekombinowanego białka są już dopracowane, warto pomyśleć o trwałym zabezpieczeniu hodowli, której skala ma być powiększona przed pojawianiem się segregantów nie posiadających wprowadzonego genu. Jednym ze sposobów jest zbudowanie takiej konstrukcji genetycznej *cis* (*locus parABC* plazmidu R1, j.w. lub *ccdAB* plazmidu F) lub *trans* (komplementacja uszkodzenia niezbędnego genu na chromosomie supresorem kodowanym przez plazmid), w której utrata plazmidu spowoduje śmierć komórki, a innym – ustabilizowanie szczepu przez wbudowanie jednej lub kilku kopii genu do chromosomu [7].

STABILNOŚĆ I SEKWENCJA NUKLEOTYDOWA mRNA

Okres półtrwania mRNA w komórkach *E. coli* wynosi od kilku sekund do 20 minut. Wydajne wiązanie rybosomów zwiększa stabilność mRNA, a zmniejsza występowanie struktur drugorzędowych i końca poli-A. W komórkach *E. coli* za poliadenylację odpowiadają dwie poliadenylujące polimerazy RNA: PAPI i PAPII, a za degradację, przede wszystkim dwie egzonukleazy: RNaza II i PNPaza i endorybonukleaza RNaza E. Poliadenylacja ułatwia degradację mRNA z udziałem RNazy II i PNPazy. Koniec 5' mRNA nie powinien zawierać sekwencji tworzących strukturę spinki do włosów, co może utrudnić wiązanie rybosomu i przyspieszyć jego degradację. Chociaż udaje się stabilizować koniec 5' mRNA przez wprowadzenie struktury spinki do włosów (przykład *ompA*), nie może ona zawierać niesparowanych nukleotydów po stronie 5'. Strukturę spinki do włosów z pewnością warto umieścić w rejonie 3'-UTR. Na obydwu końcach mRNA można umieścić dodatkowe sekwencje stabilizujące – np. *ompA* na końcu 5' lub GFP na końcu 3'. Nie jest jednak znana uniwersalna sekwencja lub struktura zwiększająca stabilność wszystkich mRNA [6,7].

W rejonie inicjacji translacji musi się znaleźć miejsce wiązania rybosomu zawierające sekwencję Shine-Dalgarno (SD: UAAGGAGG) położone 7±2 nt powyżej kodonu AUG. Jeśli ma dojść do wydajnej inicjacji translacji rejon ten musi być bogaty w reszty A i T, a pierwszym nukleotydem za kodonem AUG powinna być adenina. Jeśli sekwencja SD wchodzi w skład struktur II-rzędowych na końcu 5' mRNA, silnie zmniejsza się wydajność inicjacji translacji. Zmniejszenie odległości między SD a kodonem AUG do 4 nt lub zwiększenie powyżej 14 nt także znacznie osłabia wydajność inicjacji translacji. Należy pamiętać, że około 8% miejsc inicjacji translacji *E. coli* to kodony GUG, UUG lub AUU [6,7].

Wydajność inicjacji translacji może istotnie wzmocnić sekwencja DB (ang: *downstream box*) położona tuż poniżej kodonu AUG, jeśli jej konsensus: 5'-AUGAAUCACAAAGUG-3' zawiera zasady komplementarne do zasad 1469-1483 16S rRNA. Wzmacniający efekt tej sekwencji jest zależny od właściwego działania sekwencji SD i utrzymuje się w zakresie przesunięć początku DB od pozycji +1 do +6 sekwencji kodującej [6,7,11].

Poniżej sekwencji kodującej powinno się znajdować miejsce terminacji transkrypcji (palindromowa sekwencja tworząca strukturę spinki do włosów), co poprawia stabilność mRNA. Najlepiej jeśli to są dwa kolejne kodony stop zaczynające się tetranukleotydem UAAU ponieważ u *E. coli* najskuteczniejszym kodonem stop jest kodon UAA, zwłaszcza kiedy występuje po nim reszta U. Częstość wykorzystania poszczególnych kodonów w komórce *E. coli* dokładnie odpowiada poziomowi poszczególnych aminoacylo-tRNA w cytozolu [12]. Jeśli zatem ramka odczytu zawiera liczne kodony, które rzadko występują w sekwencjach kodujących genów *E. coli*, jej ekspresja obniża się, ponieważ dochodzi do substytucji (np. arginina jest zastępowana lizyną), przesunięć ramki odczytu, a nawet przeskoku dwóch kolejnych kodonów argininowych AGA albo przedwczesnej terminacji translacji. Ramka odczytu nie powinna też zawierać kolejno po sobie występujących kodonów lizyny AAG, odczytywanych przez tRNA^{Lys}UUU [13,14].

Dane dotyczące częstości wykorzystywania poszczególnych kodonów u różnych organizmów można znaleźć na stronie Codon Usage Database: www.kazusa.or.jp/codon/. Są to dane statystyczne, których istotność zależy od liczby zsekwenjonowanych genów organizmu i właściwego określenia sekwencji kodujących.

STABILNOŚĆ I STRUKTURA PRODUKTU TRANSLACJI

Na stabilność rekombinowanych białek znaczny wpływ ma reszta aminokwasowa występująca bezpośrednio po metioninie (w komórkach *E. coli* – fMet). Od niej zależy wydajność usuwania formylometioniny. W komórkach *E. coli*, takie cięcie jest katalizowane przez aminopeptydazę metioninową. Jeżeli zaraz po f-Met występuje reszta His, Gln, Glu, Phe, Met, Lys, Tyr, Trp lub Arg, cięcie następuje z wydajnością rzędu 16%. W pozostałych przypadkach formylometionina jest odcinana z wydajnością 97%. Jeżeli po odcięciu f-Met pierwszą resztą jest: Arg, Lys, Phe, Leu, Trp albo Tyr, okres półtrwania białka w komórce *E. coli* wynosi zaledwie 2 minuty, podczas gdy w pozostałych przypadkach dochodzi do 10 godzin. Najgorsza sytuacja ma miejsce kiedy za metioniną występuje reszta leucyny, wtedy istnieje wysokie prawdopodobieństwo odcięcia formylometioniny (powyżej), a powstały polipeptyd posiadający na aminowym końcu leucynę, ulega szybkiej proteolizie. By uniknąć takiej sytuacji, należy wziąć pod uwagę możliwość zmiany sekwencji aminokwasowej końca N lub umieszczenie dodatkowej domeny przed Met-Leu [14].

Jeśli produkt translacji rekombinowanego białka ma oryginalny koniec karboksylowy należy zwrócić uwagę by jego sekwencja aminokwasowa nie była zbyt podobna do peptydu ANDENYALAA, syntetyzowanego w komórkach *E. coli* na końcach przedwczesnie terminowanych łańcuchów polipeptydowych, powstałych w wyniku translacji uszkodzonych mRNA, które nie posiadają kodonów stop. Sekwencje prokariotycznych peptydów, będących znacznikami uszkodzonych produktów translacji można znaleźć na stronie tmRNA Database: [://www.ag.auburn.edu/mirror/tmRDB/](http://www.ag.auburn.edu/mirror/tmRDB/).

ROZPUSZCZALNOŚĆ NADPRODUKOWANEGO BIAŁKA

To, czy w wyniku nadekspresji można otrzymać duże ilości rozpuszczalnego i dobrze zwiniętego, a zatem aktywnego białka zależy od kilku czynników. Zwykle tym trudniej im rekombinowany polipeptyd jest dłuższy, im więcej zawiera skrętów, reszt proliny, cysteiny i reszt hydrofobowych, a także od tego czy do prawidłowego zwijania może dojść bez odpowiednich białek opiekuńczych i bez modyfikacji potranslacyjnych i czy w komórce *E. coli* jest podatny na proteolizę. Dla zwiększenia wydajności translacji i prawidłowego zwijania w *E. coli*, a także po to żeby zwiększyć rozpuszczalność rekombinowanych białek, na końcu N dołącza się białko wiążące maltozę – MBP (40kDa), NusA (54,8 kDa) lub IF2(17,4 kDa). Indeks rozpuszczalności białka w cytosolu *E. coli* można wyliczyć na stronie: www.biotech.ou.edu. Jest to tylko kalkulacja, która sprawdza się dla większości białek [15].

Do nadprodukcji krótkich peptydów, których rozpuszczalne produkty ekspresji są toksyczne lub szybko degradowane, wykorzystuje się N-końcowy, silnie hydrofobowy fragment bakteryjnej izomerazy ketosteroidowej, który w komórkach *E. coli* ulega wydajnej translacji (peptyd KSI; pET-31b, Novagen). Umieszcza się go na końcu N takiego peptydu lub jego tandemowych powtórzeń (wtedy należy stosować szczep BLR, Novagen). Produkt zostanie zdeponowany w postaci ciał inkluzyjnych [16]. Oczyszczanie białek które tworzą ciała inkluzyjne na większą skalę zwykle się nie opłaca, jednak niektóre enzymy deponowane w tych porowatych strukturach zachowują aktywność, a inne po solubilizacji ciał inkluzyjnych w obecności soli chaotropowych, w środowisku redukującym można zrenaturować. Ciała inkluzyjne powstają w wyniku znacznego nagromadzenia białek (>50% całkowitego białka komórki) łatwo wchodzących w „niespecyficzne” oddziaływania hydrofobowe. Zwykle ponad 90% masy ciał inkluzyjnych stanowi nadprodukowane białko, które nie uzyskało właściwej konformacji ze względu na proteolizę, niemożność utworzenia mostków dwusiarczkowych, brak modyfikacji potranslacyjnych czy nieobecność odpowiednich białek opiekuńczych. W skład ciał inkluzyjnych wchodzi także białka opiekuńcze *E. coli*: GroEL, DnaK, IbpA i IbpB, które uczestniczą w ich solubilizacji *in vivo*, w warunkach zahamowanej biosyntezy białka.

Powstawanie ciał inkluzyjnych można ograniczyć przez zmianę warunków hodowli (składu pożywki, temperatury, obniżenie poziomu ekspresji – szczep Turner), zastosowanie koekspresji izomeraz prolinowych lub disulfidowych (DsbA i DsbC), a także wysoko lub niskocząsteczkowych białek opiekuńczych. Ograniczenie proteolizy wymaga stosowania szczepów z defektywnymi genami proteaz lub z uszkodzonym systemem odpowiedzi na szok termiczny. W przypadku „trudnych” białek o charakterze hydrofobowym dobre efekty przynosi stosowanie szczepów C41(DE3) lub C43(DE3) pochodzących od BL21(DE3), w których można produkować białka błonowe, ponieważ w wyniku nadekspresji dochodzi raczej do proliferacji wewnętrznych błon aniżeli do powstawania ciał inkluzyjnych [17].

Uzyskanie wydajnej nadprodukcji heterologicznego białka w *E. coli*, w formie rozpuszczalnej, mimo że układ jest najlepiej poznany wymaga zwykle wypróbowania kilku różnych konstrukcji, w różnych warunkach hodowli, z zastosowaniem różnych szczepów albo podjęcia prób solubilizacji renaturacji i doczyszczania białka zdeponowanego w ciałach inkluzyjnych. W tym ostatnim przypadku trzeba podjąć jeszcze więcej prób, optymalizując tempo renaturacji, pH zastosowanego buforu, temperaturę, siłę jonową, zastosowanie detergentu i jego stężenie, soli chaotropowych, czynników redukujących, związków chelatujących, jonów metali czy niskocząsteczkowych dodatków ułatwiających zwijanie, jak np. glicyna albo L-arginina. Ponad 600 protokołów renaturacji białek z solubilizowanych ciał inkluzyjnych można znaleźć w bazie danych REFOLD: <http://refold.med.monash.edu.au>. W oparciu o te dane opracowano 96-dokłowy system iFOLD (Novagen) pozwalający na szybkie wyszukanie warunków renaturacji rekombinowanego białka zbliżonych do optymalnych [18].

SEKRECJA DO PRZESTRZENI PERIPLAZMATYCZNEJ

Cytosol *E. coli* to środowisko redukujące, gdzie nie chodzi do powstawania mostków dwusiarczkowych. Zaobserwowano to na przykładzie alkalicznej fosfatazy, która zostaje właściwie zwinięta dopiero w przestrzeni periplazmatycznej. W cytosolu *E. coli* nie są właściwie zwijane również te białka, które w natywnej konformacji zawierają liczne, niesparowane reszty cysteiny. W takich przypadkach mamy do wyboru albo pozostać przy ekspresji białka w cytosolu i stosować szczepy z uszkodzonym systemem tioredoksyny (*trxB*) (szczep AD494, Novagen) lub także glutaredoksyny (*trxB/gor*) (Origami, Novagen), zastosować koekspresję izomerazy disulfidowej DsbC pozostającej w cytosolu, albo zdecydować się na ekspresję rekombinowanego białka kierowanego do przestrzeni periplazmatycznej. W tym celu, na końcu N dołącza się peptyd sygnałowy rozpoznawany przez translokazę Sec. Podczas translokacji jest on odcinany przez proteazę związaną z wewnętrzną błoną, której centrum aktywne znajduje się po stronie periplazmatycznej. Najczęściej stosowane peptydy sygnałowe pochodzą z genów *ompT*, *ompA*, *pelB* (pET22b), *phoA*, *malE*, *lamB* i z β -laktamazy. Zwykle składają się z 18–30 reszt aminokwasowych: dwóch lub większej liczby reszt zasadowych na końcu aminowym, siedmiu reszt budujących hydrofobowy rdzeń i hydrofilowego końca C, rozpoznawanego przez proteazę. Hydrofilowy koniec zawiera zwykle małe reszty (Ala, Gly lub Ser) w pozycjach od -1 do -3 (jeśli +1 to pierwsza pozycja dojrzałego białka), poprzedzone w pozycji -6 resztą łamiącą helisę (Pro lub Gly) [17,19].

Niektóre białka tworzą ciała inkluzyjne także w periplazmie, stąd, przydatna bywa koekspresja izomeraz disulfidowych, eksportowanych do tego przedziału. Inne zalety to mniejsze ryzyko proteolizy, łatwe uwolnienie produktu z tego przedziału przez szok osmotyczny i mniejsza pula białek na początku oczyszczania. System wykorzystujący sekrecję nadprodukowanego białka do periplazmy ma także wady. Może on wymagać ograniczonej nadekspresji, by system sekrecji nie został zablo-

Tabela 2. Zastosowanie wektorów Duet i szczepów do koekspresji od czterech do ośmiu rekombinowanych białek, na podstawie katalogu Novagen 2006/2007.

Odpowiednie kombinacje wektorów				Rekombinowane białka (liczba)	Grupa odpowiednich szczepów
Wektor 1	Wektor 2	Wektor 3	Wektor 4		
pETDuet TM -1 (Amp ^R)	pACYCDuet TM -1 (Cam ^R)	pRSFDuet TM -1 lub pCOLADuet TM -1(Kan ^R)	pCDFDuet TM -1 (Sm ^R)	8	A
pRSFDuet TM -1 lub pCOLADuet-1(Kan ^R)	pCDFDuet-1 (Sm ^R)	pACYCDuet-1 (Cam ^R)	żaden	6	A
pETDuet-1 (Amp ^R)	pACYCDuet-1 (Cam ^R)	pRSFDuet-1 lub pCOLADuet-1(Kan ^R)	żaden	6	A
pACYCDuet-1 (Cam ^R)	pRSFDuet-1 lub pCOLADuet-1(Kan ^R)	żaden	żaden	4	A
pETDuet-1 (Amp ^R)	pACYCDuet-1 (Cam ^R)	pCDFDuet-1	żaden	6	B
pETDuet-1 (Amp ^R)	pACYCDuet-1 (Cam ^R)	żaden	żaden	4	B
pACYCDuet-1 (Cam ^R)	pCDFDuet-1 (Sm ^R)	żaden	żaden	4	B
pETDuet-1 (Amp ^R)	pRSFDuet-1 lub pCOLADuet-1(Kan ^R)	pCDFDuet-1 (Sm ^R)	żaden	6	C
pETDuet-1 (Amp ^R)	pRSFDuet-1 lub pCOLADuet-1(Kan ^R)	żaden	żaden	4	C
pRSFDuet-1 lub pCOLADuet-1(Kan ^R)	pCDFDuet-1 (Sm ^R)	żaden	żaden	4	C
pETDuet-1 (Amp ^R)	pCDFDuet-1 (Sm ^R)	żaden	żaden	4	D

Grupy szczepów				
Grupa A	Grupa B	Grupa C	Grupa D	
B834(DE3)	B834(DE3)	B834(DE3)	B834(DE3)	Rosetta-gami (DE3)*
BL21(DE3)	BL21(DE3)	B834(DE3)pLysS [†]	B834(DE3)pLysS	Rosetta-gami(DE3)pLysS*
BLR(DE3)	BLR(DE3)	BL21(DE3)	BL21(DE3)	Rosetta-gami 2(DE3)*
HMS174(DE3)	HMS174(DE3)	BL21(DE3)pLysS [†]	BL21(DE3)pLysS	Rosetta-gami 2(DE3)pLysS*
NovaBlue(DE3)	NovaBlue(DE3)	BLR(DE3)	BLR(DE3)	Rosetta-gami B(DE3)
Origami TM 2(DE3)*	Origami(DE3) *	BLR(DE3)pLysS [†]	BLR(DE3)pLysS	Rosetta-gami B(DE3)pLysS
Tuner TM (DE3)	Origami 2(DE3)*	HMS174(DE3)	HMS174(DE3)	Tuner(DE3)
	Origami B(DE3)	HMS174(DE3)pLysS [†]	HMS174(DE3)pLysS	Tuner(DE3)pLysS
	Tuner(DE3)	NovaBlue(DE3)	NovaBlue(DE3)	
		Origami 2(DE3)*	Origami (DE3)*	
		Origami 2(DE3) pLysS [†]	Origami (DE3) pLysS*	
		Rosetta TM (DE3)	Origami 2(DE3)*	
		Rosetta(DE3)pLysS [†]	Origami 2(DE3)pLysS*	
		Rosetta 2(DE3)	Origami B(DE3)	
		Rosetta 2(DE3)pLysS [†]	Origami B(DE3)pLysS	
		RosettaBlue TM (DE3)	Rosetta(DE3)	
		RosettaBlue(DE3)pLysS [†]	Rosetta(DE3)pLysS	
		Rosetta-gami TM 2(DE3)*	Rosetta 2(DE3)	
		Rosetta-gami 2(DE3) pLysS [†]	Rosetta 2(DE3)pLysS	
		Tuner(DE3)	RosettaBlue(DE3)	
		Tuner(DE3)pLysS [†]	RosettaBlue(DE3)pLysS	

*Szczepy posiadające mutację rpsL, dającą oporność na streptomycynę; stąd do selekcji rekombinantów pCDFDuet trzeba używać spektynomycyny.

†Szczepy zawierające plazmid z replikonem P15A; przy stosowaniu do koekspresji plazmidów pETDuet-1 i pRSFDuet-1, może wystąpić znaczne obniżenie poziomu ekspresji ramek odczytu wklonowanych do pRSFDuet-1. Taki efekt nie występuje, kiedy zamiast pRSFDuet-1 stosuje się wektor pCOLADuet-1. Oznaczenia oporności na antybiotyki: Amp^R, ampicylina/karbamocylina; Kan^R, kanamycyna; Cam^R, chloramfenikol; Sm^R, streptomycyna/spektynomycyna. Informacje dotyczące szczepów można znaleźć na stronie: www.novagen.com

kowany. Można zdecydować się na koekspresję składników systemu Sec-SecY i SecE na poziomie zbliżonym do ekspresji genu rekombinowanego białka. Inny problem to łatwe przedostawanie się białek z przestrzeni periplazmatycznej przez zewnętrzną błonę do pożywki. System nadekspresji z sekrecją do periplazmy pozwala czasem uzyskać aktywną formę „trudnego” enzymu, lecz konieczność ograniczenia nadprodukcji i problemy z utrzymaniem produktu w tym przedziale czynią system sekrecyjny mało przydatnym do produkcji rekombinowanych białek na dużą skalę. Ważne jest uzyskanie szczepów o bardzo sprawnym systemie sekrecji i optymalizacja wa-

runków ich hodowli na przykład w warunkach szoku osmotycznego, np. z zastosowaniem takich dodatków jak sorbitol i glicylobetaina [17,19].

ZNACZNIKI UŁATWIAJĄCE OCZYSZCZANIE REKOMBINOWANYCH BIAŁEK

Produkcja rekombinowanych białek to często jedyna lub najtańsza metoda otrzymania homogennego preparatu enzymu, białka, peptydu, pozwalającego na zbadanie jego struktury i funkcji, często jedyny sposób, żeby enzym produkowany na potrzeby medycyny był dobrze

scharakteryzowany. Jeśli rekombinowane białko ma być narzędziem w przemyśle, rolnictwie, przetwarzaniu żywności, biologii molekularnej – umożliwia wprowadzenie pożądanych zmian struktury (unieruchomienie na wybranym podłożu, poprawienie odporności na wymagane warunki jak pH, temperatura, siła jonowa) i funkcji (zmiana specyficzności substratowej czy wprowadzenie nowych możliwości aktywacji lub blokowania aktywności itp.).

Żeby osiągnąć powyższe cele trzeba wyprodukowane w kontrolowanych warunkach białko oczyścić jak najszybciej i z jak największą wydajnością. Dlatego ramki odczytu rekombinowanych białek łączy się z sekwencjami kodującymi krótkie peptydy lub całe domeny innych białek, które pozwalają na oczyszczenie rekombinowanego białka w wyniku jednostopniowej chromatografii powinowactwa, przeprowadzonej niemal natychmiast po jego uwolnieniu z komórki.

Dołączony peptyd nie powinien zmieniać aktywności enzymu ani zaburzać jego struktury i powinien się nadawać do oczyszczania wielu różnych białek z wykorzystaniem tego samego, niedrogiego złoża (nośnik - łącznik - ligand). Jeśli trzeba dodany peptyd usunąć, rekombinowane białko musi być tak zaprojektowane, by po lub w trakcie oczyszczania można go było odciąć. Oczyszczanie rekombinowanych białek na złożu powinno być możliwe w różnych warunkach, czyli przy różnym stężeniu soli, pH, w obecności detergentów, czynników chelatujących, redukujących i związków chaotropowych. Elucja białka ze złoża powinna przebiegać w łagodnych warunkach tak, by nie dochodziło do jego denaturacji na tym etapie. Złoże powinno być trwałe: odporne na modyfikacje chemiczne, proteolizę i powinno się nadawać do wielokrotnego wykorzystania – łatwe i skuteczne usuwanie pozostałości oraz regeneracja.

Najbardziej wypróbowanym peptydem dołączanym do rekombinowanych białek jest heksapeptyd His₍₆₎, który można umieszczać na końcu N lub C rekombinowanych enzymów, rzadko hamuje ich aktywność i jest z powodzeniem stosowany w pro- i eukariotycznych układach ekspresyjnych.

W roku 1975 po raz pierwszy opisano możliwość wiązania i oczyszczania białek zawierających reszty histydyliny, cysteiny i tryptofanu na złożach chromatograficznych z unieruchomionymi jonami metali przejściowych, takich jak Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ i Zn²⁺ (IMAC, ang: *immobilized metal ion chromatography*). Pierwszym użytym w tym celu ligandem chelatującym jon metalu był kwas iminodioctowy. Okazało się, że najwydajniej można w ten sposób oczyszczać białka zawierające liczne, występujące po sobie reszty histydyliny. Pierścienie imidazolowe histydyliny są w pH fizjologicznym donorami elektronów tworząc koordynacyjne wiązania z unieruchomionymi jonami metali. Związane białka zawierające trakty reszt histydyliny można wymyć ze złoża obniżając pH (4,5–5,9) lub stosując imidazol (50–500 mM) [20].

W 1987 roku Hochuli opracował sposób wiązania Ni²⁺ do stałego podłoża za pomocą kwasu nitylotriooctowego (Ni²⁺-

NTA). Czterowartościowe wiązanie chelatujące jon niklu, pozostawia dwie wolne wartościowości, które mogą być wykorzystane do wiązania biopolimerów. Białka z motywem His₍₃₎ wiążą się wydajnie do takiego złoża tylko w warunkach natywnych, np. w buforach fosforanowych, a His₍₆₎ także w wysokim stężeniu soli i w obecności związków chaotropowych, takich jak mocznik czy chlorowodorek guanidyny. W złożach TALON jon kobaltu jest nieco silniej związany ze stałym podłożem – np. sefarozą za pośrednictwem karboksymetyloasparagianinu (Co²⁺-CMA), co zmniejsza ryzyko wymycia jonów kobaltu razem z oczyszczanym białkiem. Złoża Co²⁺-CMA pozwalają na elucję związanych białek w łagodniejszych warunkach, a jednocześnie powstaje mniej wiązań niespecyficznych niż na złożach Ni²⁺-NTA. Pojemność złożeń Ni²⁺-NTA i Co²⁺-CMA zwykle mieści się w zakresie od 5 do 15 mg białka na 1g złoża.

Jednostopniowa chromatografia na takich złożach pozwala na ponad 95% oczyszczenie białek ze znacznikiem His₍₆₎. Wiązanie białek przeprowadza się zwykle w buforach zawierających niewielkie stężenia imidazolu – zwykle 5–20 mM, co zabezpiecza przed niespecyficznym wiązaniem białek zawierających mniejszą ilość kolejno występujących reszt histydyliny. W komórkach *E. coli* nie występują białka z dłuższymi traktami reszt histydyliny. Żeby uniknąć izolacji białek, które mogą wiązać się z rekombinowanym białkiem-His₍₆₎ poprzez mostki dwusiarczkowe w buforach do lizy komórek stosuje się dodatek β-merkaptioetanolu w stężeniu do 20 mM w przypadku złożeń Ni²⁺-NTA, do 10mM w przypadku Co²⁺-CMA. Dla uniknięcia niespecyficznych oddziaływań oczyszczanego białka-His₍₆₎ z innymi białkami i z kwasami nukleinowymi stosuje się detergenty (0,1–1% Triton X-100 lub 0,5% sarkozynian sodowy), wysokie stężenie soli – nawet 2 M NaCl, a w celu ograniczenia oddziaływań hydrofobowych – dodatek etanolu lub glicerolu (do 30%) [20,21].

Na złożach Co²⁺-CMA, w podobnych warunkach można oczyszczać białka zawierające polihistydynowy znacznik naturalnego pochodzenia – tzw. HAT-tag. HAT to 19 aminokwasowa sekwencja pochodząca z końca N kurzej, mięśniowej dehydrogenazy mleczanowej, która ma mniejszy ładunek i mniej wpływa na rozpuszczalność rekombinowanych białek niż His₍₆₎. Mocznik osłabia wiązanie peptydu HAT do Co²⁺-CMA bardziej niż chlorowodorek guanidyny [15,21].

Strep-tag to nonapeptyd (AWRHPQFGG), wiążący się do streptawidyny w kieszeni, w której przyłącza się biotyna, a zatem biotyna lub jej pochodne są kompetytorem wiązania tego peptydu ze streptawidyną. Strep-tag można umieszczać tylko na końcu C rekombinowanych białek, aby było możliwe utrzymanie mostka solnego między wolną grupą karboksylową, a resztą Arg streptawidyny. W wyniku poszukiwań uniwersalnego peptydu nadającego się także do umieszczenia na końcu N rekombinowanych białek wyselekcjonowano strep-tagII (IBA GmbH) o sekwencji NWSHPQFEK, który można skrócić do WSH-PQFEK (pET 51, Novagen). Taki peptyd wykazuje obniżone powinowactwo do streptawidyny (K_D = 13 μM). W wyniku losowej mutagenazy pętli (pozycje od 44–52) znajdującej się w pobliżu kieszeni streptawidyny wiążącej bio-

tyną udało się wyselekcjonować mutanty silniej wiążące strep-tagII ($K_D = 1 \mu\text{M}$), mutant 2-44 Glu-Ile, 45 Ser-Gly, 47 Val-Arg. Tak zmodyfikowana streptawidyna występuje pod handlową nazwą Strep-Tacin (IBA GmbH). Strep-Tacin wiąże strep-tagII około 100 razy silniej niż streptawidyna. Strep-tag pozwala na jednostopniowe oczyszczenie rekombinowanego białka w 99%, a ze względu na neutralny skład reszt aminokwasowych zwykle nie wpływa na aktywność rekombinowanych enzymów i zwykle nie ma potrzeby usuwania tego znacznika. W przeciwieństwie do His-tagu nie powoduje agregacji i wytrącania się białek w obecności jonów metali ciężkich, a sposób oczyszczania nie stwarza zagrożenia występowaniem paramagnetycznych zanieczyszczeń uniemożliwiających zastosowanie NMR do badania struktury oczyszczonego białka. Możliwość zastosowania łagodnych warunków wiązania i elucji (2,5 mM detiobiotyna) pozwala na oczyszczanie aktywnych białek i kompleksów wieloenzymatycznych. Strep-tagII jest także przydatny do oczyszczania rekombinowanych białek błonowych, a największą jego zaletą jest jego „komplementarność” z His-tagiem, a mianowicie możliwość stosowania związków chelatujących (EDTA, EGTA) i redukujących (DTT i β -merkaptioetanolu – do 50 mM), a także umiarkowanych stężeń soli chaotropowych (GuHCl do 1 M), detergentów. 6M mocznik niszczy wiązanie strep-tag – Strep-Tacin, lecz nie denaturuje streptawidyny [22].

Do złóż Strep-Tacin wiążą się endogenne biotynylowane białka, lecz można temu zaradzić stosując bufony ekstrakcyjne zawierające awidynę. Kolejną zaletą takiego znacznika jest uniwersalny sposób detekcji rekombinowanego białka z wykorzystaniem streptawidyny i biotynylowanego przeciwciała sprzężonego z fosfatazą lub peroksydazą [23].

GFP – znajduje zastosowanie do produkcji rekombinowanych białek błonowych, ułatwia ich oczyszczanie poprzez chromatografię oddziaływań hydrofobowych, pozwala na monitorowanie ich ekspresji [24].

PKA – motyw o sekwencji RRASV (pET33, Novagen), fosforylowany przez kinazę białkową A, pozwala na wyznaczenie oczyszczonego białka fosforanem ^{32}P lub ^{33}P ATP w obecności kinazy z mięśnia sercowego zależnej od cAMP, a następnie detekcję rekombinowanego białka, produktów jego modyfikacji i proteolizy w badanym ekstrakcie, a także oddziaływań z innymi białkami [25].

S-tag – to 15-aminokwasowy fragment rybonukleazy A, odcinany przez subtylizynę, który silnie wiąże ($K_D = 10^{-9}\text{M}$) pozostałą część RNazy A – tzw. białko S. Komplementacja przywraca aktywność RNazy A, a sztuczny substrat ArU-AA z fluoroforem na końcu 5' i z wygaszaczem na końcu 3' pozwala na technicznie proste wykrycie ilości rekombinowanego białka mniejszych niż 1 fmol oraz określenie poziomu ekspresji badanego genu w surowych ekstraktach komórkowych [23].

ZAKOŃCZENIE

Systemy nadekspresji genów heterologicznych białek w komórkach *E. coli* są wciąż udoskonalane. Hodowle laboratoryjne mogą być automatyzowane. Opracowano pożywki

zapewniające autoindukcję (OvernightExpress, Novagen). Nadekspresję można zatem szybko optymalizować w coraz większej liczbie wariantów. Udało się przezwyciężyć „przećkanie” ekspresji promotora T7 (pETcoco, Novagen), a także opracować technologie wykorzystania wielu, również nie wymienionych tu peptydów do detekcji i oczyszczania rekombinowanych białek. Kłopotliwą pozostaje konieczność stosowania licznych antybiotyków i niestabilność wielokrotnych transformantów – stąd trudności w przygotowaniu zamrożonych zaszczepki o identycznym mianie. Istotne jest dopracowanie niezawodnych sposobów odcinania znaczników i dalsze gromadzenie danych dotyczących zwijania i renaturacji poszczególnych białek.

PIŚMIENNICTWO

1. Fisher R, Drossard J, Emans N, Commandeur U, Hellwig S (1999) Towards molecular farming in the future: *Pichia pastoris*-based production of single chain antibody fragments. *Biotechnol Appl Biochem* 30: 117-120
2. Peterson RKD, Arntzen CJ (2004) On risk and plant-based biopharmaceuticals. *Trends Biotech* 22: 64-66
3. Demian AL (2000) Microbial Biotechnology. *Trends Biotech* 18: 26-31
4. Lee SY (1996) High cell density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotech* 14: 98-105
5. Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA, Deckwer W-D (1994) Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 39: 59-65
6. Hannig G, Makrides SC (1998) Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotech* 16: 54-60
7. Sorensen HP, Mortensen KK (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli* *J Biotechnol* 115: 113-128
8. Novagen (2006) pET System Manual. Wydanie 11
9. Sektas M, Szybalski W (2002) Novel single-copy pETcoco vector with dual controls for amplification and expression. *inNovations* 14: 6-8
10. Held D, Yaeger K, Novy R (2003) New coexpression vectors for expanded compatibilities in *E. coli*. *inNovations* 18: 4-6
11. Kozak M (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eucaryotes. *Gene* 234: 187-208
12. Deutscher MP (1994) tRNA Processing Nucleases w tRNA, Structure, Biosynthesis and Function, W: Söll D, Rajbhandary UL (red) ASM Press, Washington, str. 51-65
13. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshul J (2004) Codon bias in heterologous protein expression. *Trends Biotech* 22: 346-353
14. Makrides S (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Reviews* 60: 512-538
15. Terpe K (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 523-533
16. Morreale G, Lee EG, Jones DB, Middelberg APJ (2004) Bioprocess-centered molecular design (BMD) for the efficient production of an internally active peptide. *Biotechnol Bioeng* 87: 912-923
17. Ventura S, Villaverde A (2006) Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotech* 24: 179-185
18. Leland P, Rane J, Grabski A (2006) Convenient optimization of protein refolding conditions with iFOLD Protein Refolding System1. *inNovations* 23: 3-8
19. Cornelis P (2000) Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Curr Opin Biotech* 11: 450-454
20. Qiagen (1999) NiNTA Magnetic Agarose Beads Handbook
21. www.clontech.com
22. Korndorfer IP, Skerra A (2002) Improved affinity of engineered streptavidin for the Strep-tag II peptide is due to a fixed open conformation of the lid-like loop at the binding site. *Protein Sci* 11: 883-893

23. Novagen (2006) Protein Purification and Detection Tools.
24. Drew D, Lerch M, Kunji E, Slotboom DJ, de Gier JW (2006) Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions. *Nature Methods* 3: 303-313

25. de Arruda M, Burgess RR (1995) pET-33b(+): a pET vector that contains a protein kinase A recognition sequence. *in* *Novations* 4: 7-8

Recombinant protein production in *Escherichia coli*

Przemysław Nuc^{1,✉}, Katarzyna Nuc²

¹Adam Mickiewicz University, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, 89 Umultowska St., 61-614 Poznań, Poland

²August Cieszkowski University of Agriculture, Department of Biochemistry and Biotechnology, 35 Wolyńska St., 60-637 Poznań, Poland

✉e-mail:przem@amu.edu.pl

Key words: *Escherichia*, overexpression, system, vector

ABSTRACT

Growing needs for efficient recombinant production pose new challenges; starting from cell growth optimization under overexpression conditions, improving vectors, gene and protein sequence to suit them to protein biosynthesis machinery of the host, through extending the knowledge of protein folding, fusion protein construction, and coexpression systems, to improvements in protein purification and renaturation technologies. Hitherto *Escherichia coli* is the most defined and the cheapest protein biosynthesis system. With its wealth of available mutants tested is the best suited to economically test new gene constructs and to scale up the recombinant protein production.

PROTEIN EXTRACTION

from Novagen

BugBusterTM

protein extraction reagent

Plus Benzonase[®]

nuclease

...lets you lyse *E. coli*,
extract soluble protein,
and reduce nucleic acid
viscosity - fast.

Compatible with 2-D
electrophoresis and other
proteomics applications

Available in a variety of configurations:

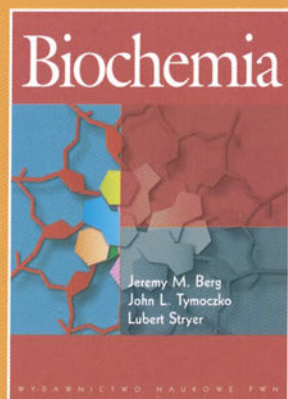
- Ready-to-use reagent
- 10X concentrate
- HT (premixed with Benzonase)
- Primary Amine-free
- Complete Purification Kits with Resins

 Novagen[®]

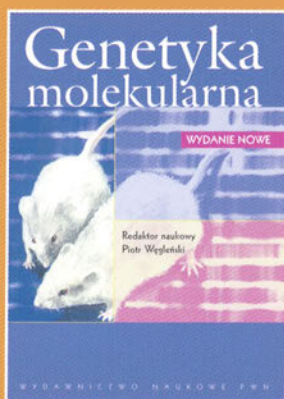
A brand of CN Biosciences, Inc.
an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany



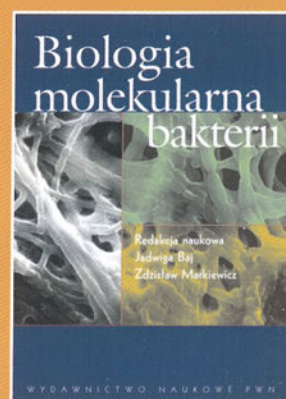
Warto przeczytać • Warto posiadać



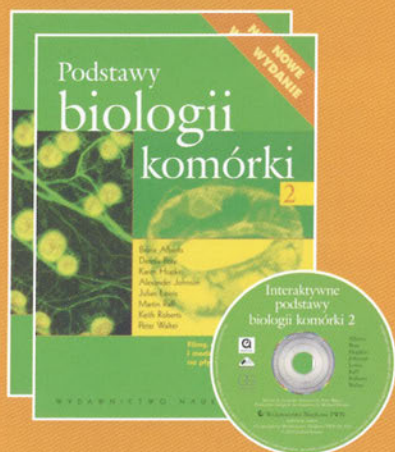
**BIBLIA KAŻDEGO
BIOCHEMIKA**



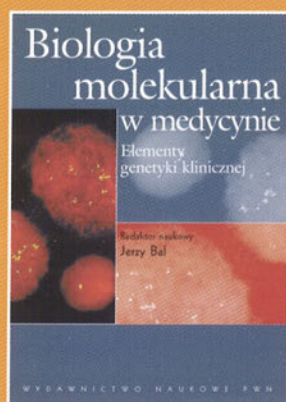
**ZWIĘŻŁA • PRZYSTĘPNA
NOWOCZESNA**



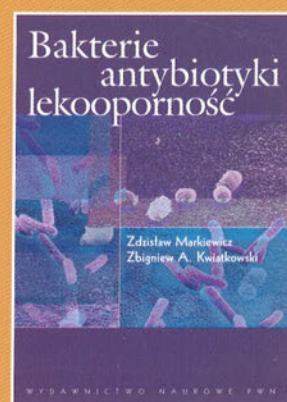
**WSZECHSTRONNA
AKTUALNA • KOMPLEKSOWA**



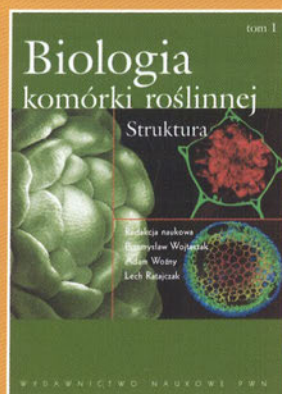
ŚWIATOWY BESTSELLER



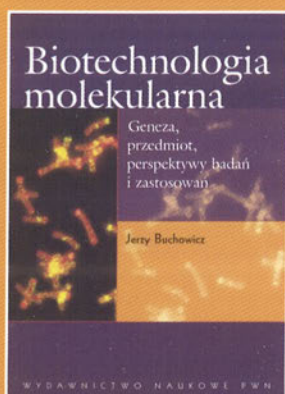
**OŚIĄGNIĘCIA
I ZASTOSOWANIA**



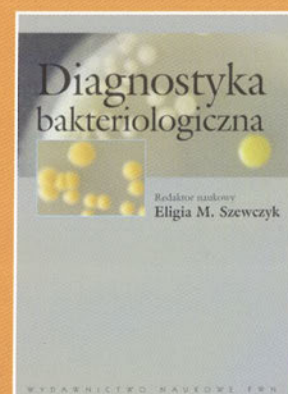
TEORIA I PRAKTYKA



**ZWIĄZKI MIĘDZY STRUKTURĄ
A FUNKCJONOWANIEM**



**JAK POWSTAŁA • CZYM JEST
DOKĄD ZMIERZA**



**DIAGNOSTYKA
PRZEGLĄD BAKTERII**

Produkcja rekombinowanych białek

W ofercie posiadamy:

- wektory plazmidowe
- zestawy do izolacji i oczyszczania DNA
- enzymy do biologii molekularnej
- komórki kompetentne
- podłoże Overnight Express do hodowli *E. coli*, zapewniające autoindukcję
- odczynniki do ekstrakcji białek z komórek gospodarza
- złoże i bufor do oczyszczania białek za pomocą chromatografii powinowactwa
- **NOWOŚĆ** system iFOLD ułatwiający szybkie wyszukanie optymalnych warunków renaturacji białek zdeponowanych w formie ciał inkluzyjnych

Merck Sp. z o.o.
Aleje Jerozolimskie 178
02-486 Warszawa
tel.: (0-22) 53 59 770
fax: (0-22) 53 59 925
dzial.handlowy@merck.pl
www.merck.pl

Doradztwo techniczne:
dr Karina Błachnio
tel.: (0-22) 53 59 829
fax: (0-22) 53 59 929
tel. kom. 604 799 046
karina.blachnio@merck.pl

