

P939

20.6.12

POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2012
TOM 58
NUMER 1

Hormony roślin
Karbonylacja białek
Kanały chlorkowe CIC



PL ISSN 0032-5422
Indeksowane w Medline /PubMed
www.postepybiochemii.pl

<http://rcin.org.pl>

Rozmiar: Nano. Możliwości: Mega.



Poznaj zupełnie nowe wymiary real-time PCR:
www.lightcycler-nano.com

LightCycler®

Produkt przeznaczony tylko do badań naukowych.
Nie stosować w procedurach diagnostycznych.

LIGHTCYCLER jest znakiem handlowym Roche.

Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.
ul. Wybrzeże Gdylskie 6B
01-531 Warszawa
www.roche.pl



© 2011 Roche Diagnostics
Wszystkie prawa zastrzeżone.

<http://rcin.org.pl>



W NASTĘPNYM NUMERZE:

Lipidy jako cząsteczki sygnałowe
Numer specjalny pod redakcją
Agnieszki Dobrzyń

W numerze m.in.:

Metaboliczna i regulacyjna rola
syntazy kwasów tłuszczowych
Julian Świerczyński,
Tomasz Śledziński

Tratwy lipidowe w chorobie
Alzheimera

Elżbieta Kania, Beata Pająk, Barbara
Gajkowska, Arkadiusz Orzechowski

Regulacja aktywności kanałów
potasowych przez kwasy
tłuszczowe

Anna Kajma

Wiadomości krajowe

pod red. Teresy Wesołowskiej

1

Listy do redakcji

9

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE**Gibereliny - struktura, biosynteza i dezaktywacja u roślin**

Katarzyna Marciniak, Jacek Kęsy, Andrzej Tretyn, Jan Kopcewicz

14

Biosynteza jasmonianów u roślin – najnowsze odkrycia

Emilia Wilmowicz, Kamil Frankowski, Magdalena Sidłowska, Agata
Kućko, Jacek Kęsy, Adam Gąsiorowski, Paulina Glazińska, Jan Kopcewicz

26

Karbonylacja białek i jej znaczenie dla
procesów fizjologicznych u roślin

Karolina Dębska, Renata Bogatek, Agnieszka Gniazdowska

34

Fotosynteza typu C4

Anna Drożak, Wioleta Wasilewska,

Alicja Buczyńska, Elżbieta Romanowska

44

Kanały chlorkowe CIC i ich funkcja w komórkach roślin

Agata Bogusz

54

Udział białek NRT1 w transporcie azotanów u roślin

Anna Warzybok, Magdalena Migocka

61

Rola czynników transkrypcyjnych z rodziny LSF/Grainyhead
w powstawaniu i funkcjonowaniu powłok ciała zwierząt

Agnieszka Kikulska, Michał Młacki, Tomasz Wilanowski

69

Szlaki kinaz białkowych MAP - ewolucja i rola w przebiegu
wybranych chorób neurozwyrodnieniowych

Iwona Wojda

79

Bazy danych mikroRNA

Michał Wojciech Szcześniak, Elżbieta Owczarkowska,
Jakub Gapski, Izabela Makałowska

91

Białka inherentnie nieuporządkowane

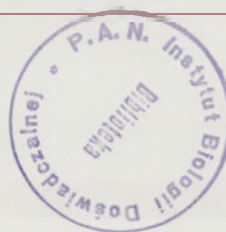
Agnieszka Dziedzic-Letka, Andrzej Ożyhar

100

Wybrane aspekty amyloidogenezy

Dariusz Stępkowski

110

**Zdjęcie na okładce:**

Jeden z najbardziej pospolitych w Polsce gatunków motyli z rodziny rusałkowatych, rusałka pawik (*Inachis io*), sfotografowany na liściach mięty.

Autorem zdjęcia jest Joanna Bandorowicz-Pikuła. Zdjęcie wykorzystano za zgodą autorki.

Events/Opinions/Comments	1
REVIEWS	
Gibberellins – structure, biosynthesis and deactivation in plants	14
Jasmonate biosynthesis – the latest discoveries	26
Protein carbonylation and its role in physiological processes in plants	34
C4 type photosynthesis	44
The CIC chloride channels and their role in plant cell	54
The function of nitrate transporters NRT1 in plants	61
The role of LSF/Grainyhead transcription factors in development and function of epidermal barrier in animals	69
MAP kinase pathways - their evolution and role in some neurodegenerative diseases	79
microRNA databases	91
Intrinsically disordered proteins	100
Selected aspects of amyloidogenesis	110

PROGRAM „RÓWNE SZANSE” FUNDACJI IM. STEFANA BATOREGO

Wielu młodych ludzi z niezamożnych środowisk, szczególnie z małych miejscowości, nie zdaje matury i nie idzie na studia. Są zdolni i ambitni, ale nie mają środków na kontynuowanie nauki w szkole średniej. Nie stać ich na bilet do szkoły, zakup podręczników, opłatę za internat. Żeby móc się uczyć muszą pokonać o wiele więcej barier niż ich lepiej sytuowani rówieśnicy. Mają też o wiele mniej możliwości korzystania z zajęć pozalekcyjnych, rozwijających ich zainteresowania czy wyrównujących braki w edukacji. Fundacja Batorego od 11 lat prowadzi, we współpracy z kilkudziesięcioma partnerami lokalnymi z całej Polski, program „Równe Szanse”, którego celem jest stworzenie systemu pomocy stypendialnej dla młodzieży szkolnej pragnącej ukończyć szkołę średnią i dostać się na studia. Program jest prowadzony dzięki darowiznom firm i osób prywatnych, ale przede wszystkim dzięki przekazywanym Fundacji od 2004 roku wpłatom 1% podatku. W ramach programu „Równe Szanse” całoroczna pomoc stypendialna trafia każdego roku do ponad 1000 młodych ludzi z niezamożnych środowisk, którzy chcą się uczyć i studiować. Stypendia w wysokości od 75 do 300 złotych miesięcznie mają na celu zmotywowanie ucznia do dalszej nauki i pomoc w pokonywaniu kolejnych progów edukacyjnych. Dotychczas ufundowano ponad 13 000 stypendiów. Absolwentami programu są młodzi ludzie z całej Polski: Paulina z wielodzietnej rodziny z Lusławic, która studiuje medycynę; Marcin z Kościana, który przygotowuje doktorat i odbywa staż w międzynarodowej firmie doradczej; Krzysztof z Radomska który studiuje w Warszawie w klasie gitary. Im więcej osób zechce włączyć się w działania Fundacji, tym więcej uczniów otrzyma stypendia i szansę na zdobycie wykształcenia. Mamy nadzieję, że w tym roku również Państwo zechcą wesprzeć program „Równe szanse”. Bez zainteresowanego wsparcia partnerów prowadzenie tej akcji nie byłoby możliwe.



FUNDACJA
IM. STEFANA
BATOREGO

Więcej na temat programu: <http://www.batory.org.pl/szanse/lokalne.htm>

Agnieszka Zowczak
e-mail: azowczak@batory.org.pl
tel.: 22 536 02 09

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 Wesołowska; 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 Długaj, Krystyna Grzelak, Lilla Hryniewiecka, Danuta Hulanicka, Andrzej Jerzmanowski, Andrzej Kasprzak, Wanda Kłopocka, Paweł Pomorski, Aleksander F. Sikorski, Anna Szakiel, Adam Szewczyk, Tomasz Twardowski, Marek Zembala, Krzysztof Zabłocki, Alicja Żylicz

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 (22) 5892499, e-mail: ptbioch@nencki.gov.pl; <http://www.ptbioch.edu.pl>

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

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



Fot. 1. Gliwickie Spotkania Naukowe 2011 - uczestnicy na sali obrad.

W dniach 18-19 listopada 2011 r. odbyła się po raz piętnasty doroczna międzynarodowa konferencja **Gliwickie Spotkania Naukowe 2011** (Fot. 1-3). Cykliczne spotkania stanowią platformę wymiany informacji między polskimi naukowcami, przede wszystkim naukowcami regionu śląskiego, i pracownikami naukowymi z wiodących ośrodków na całym świecie. Obecna edycja Spotkań zorganizowana została przez Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddział w Gliwicach, Województwo Śląskie, Stowarzyszenie na Rzecz Wspierania Badań nad Rakiem i Politechnikę Śląską. W konferencji uczestniczyło 199 osób, w tym 16 z zagranicy (Francja, Hiszpania, Niemcy, Ukraina, Czechy, Anglia, Szwecja, Kanada i USA). Oprócz pracowników naukowych w konferencji od kilku lat uczestniczą studenci starszych lat studiów, dla których opłata konferencyjna została obniżona do symbolicznej ceny biletu do kina. Studenci słuchali wykładów i dyskutowali z naukowcami prezentującymi plakaty, a także w wielu przypadkach byli czynnymi uczestnikami, jako współautorzy plakatów prezentujący wyniki swoich badań prowadzonych w ramach prac



Fot. 2. Od lewej prof. prof. Mieczysław Choraży, Czesław Radzikowski i Jan Filipowski.

inżynierskich i dyplomowych. Wydaje się, że włączenie studentów do poważnej międzynarodowej konferencji zachęca ich do zainteresowania się nauką. Sprawozdanie z Konferencji autorstwa uczestniczki, studentki kierunku Biotechnologia Politechniki Śląskiej, można przeczytać w czasopiśmie „Dolina Biotechnologiczna” (<http://dolinabiotechnologiczna.pl/diagnostyka/xv-gliwickie-spotkania-naukowe-juz-za-nami/>). Studenci Politechniki Śląskiej od kilku lat uczestniczą także w pracach organizacyjnych przed i po konferencji.

Tematyka konferencji od począt-



Fot. 3. Prof. Joanna Rzeszowska-Wolny.

ku związana jest z komórkowymi mechanizmami regulacyjnymi, które rządzą ekspresją genów w przebiegu prawidłowych i patologicznych procesów na poziomie komórki i organizmu. W tegorocznych Spotkaniach tematyka poszczególnych sesji i doniesień plakatowych koncentrowała się wokół mutagenyzy i kancerogenezy, mechanizmów przerzutowania, mechanizmów regulacji genów przez mikroRNA i odpowiedzi komórkowej na promieniowanie jonizujące. Trzy główne sesje: „Mechanisms of metastasis”, „Regulation of gene expression at the transcript level” i

„Genes and response to radiation” prowadzone były przez **prof. Macieja Ugorskiego** z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, **dr Martin Simarda** z Uniwersytetu Laval w Quebec w Kanadzie oraz przez **prof. Carmel Mothersill** z Uniwersytetu McMaster w Hamilton w Kanadzie.

Sesja pierwsza, zatytułowana „Mechanisms of metastasis”, obejmowała 6 wykładów, z których pięć zostało wygłoszonych przez gości zagranicznych. Jako pierwsza wystąpiła **Claudine Kieda** (Centre for Molecular Biophysics, UPR 4301 CNRS, Orlean, Francja), której wykład poświęcony był terapii polegającej na normalizacji nowotworowych naczyń krwionośnych, co w konsekwencji ma zapobiegać tworzeniu się przerzutów. Kolejne wystąpienie **Angels Sierra** (Bellvitge Biomedical Research Institute – IDIBELL, Barcelona, Hiszpania) dotyczyło biomarkerów w raku gruczołu piersiowego pozwalających na wytypowanie tych nowotworów, które dają przerzuty do mózgu. Wykład trzeci, wygłoszony przez **Inge Tinhofer** (Fot. 4) (Departament of Radiooncology, Carte campus Mitle, Berlin, Niemcy), poświęcony był z



Fot. 4. Prof. Czesław Radzikowski i prof Ingeborg Tinhofer.

kolei roli krążących komórek nowotworowych w raku głowy i szyi. Następnie **Ludmila Drobot** (Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kijów, Ukraina) omówiła rolę kompleksu białkowego Ruk/CIN85 w progresji raka gruczołu piersiowego, a kolejny wykładowca, **Marek Los** (Integrative Regenerative Medicine Centem, Linkoping University, Linkoping,

Szwecja) poświęcił swoje wystąpienia antybiotykowi salinomycynie, która preferencyjnie niszczy nowotworowe komórki macierzyste. Sesję zakończył referat **Macieja Ugorskiego** (Institute of Immunology and Experimental Therapy PAN, Wrocław, Polska), który omówił rolę enzymu UGT8 i galaktozyloceramidu w rozwoju raka gruczołu piersiowego.

Sesja druga koncentrowała się na problemach regulacji ekspresji genów poprzez mechanizmy angażujące mikroRNA. **Dr Martin Simard**, który tę sesję prowadził i organizował, pracuje obecnie jako kierownik grupy na Uniwersytecie Laval, ale wywodzi się z grupy badawczej laureata nagrody Nobla dr Craig Mello i jest jednym z najlepszych specjalistów w tej dziedzinie na świecie. W sesji wykłady wygłosili naukowcy z Kanady, Niemiec, Republiki Czeskiej, Wielkiej Brytanii, Stanów Zjednoczonych i Polski. Tematyka mikroRNA stała się najważniejszą dziedziną badań nad mechanizmami ekspresji genów w ostatnim dziesięcioleciu. Małe niekodujące cząsteczki RNA sterują poziomami transkryptów i białek we wszystkich komórkach eukariotycznych i często decydują o przebiegu procesów patologicznych, dlatego stały się ważnym obiektem w poszukiwaniach nowych celów dla terapii przeciwnowotworowej, a także w leczeniu innych chorób.

W sesji „Genes and response to radiation” dyskutowane były problemy komunikacji międzykomórkowej i jej wpływu na losy populacji komórek prawidłowych i nowotworowych poddanych działaniu promieniowania jonizującego. Bardzo interesujące doniesienia z tej dziedziny wskazują na możliwe obniżanie efektu radioterapii przez sąsiadujące z nowotworem komórki prawidłowe. Od kilkunastu lat wiadomo, że komórki sąsiadujące z komórkami eksponowanymi na promieniowanie odbierają sygnały, które powodują w nich uruchamianie procesów produkcji wolnych rodników i pojawianie się uszkodzeń podobnych do tych, jakie występują w komórkach bezpośrednio napromieniowanych. Wykład na ten temat miała **prof. Carmel Mothersill** jeden z radiobiologów najczęściej publikujących i specjalizujących się w badaniach efektu „bystander”. W wystąpieniu **prof. Marii Wideli** (Fot. 5)

przedstawione zostały wyniki badań nad odwrotnym efektem. **Prof. Wideli** wykazała, że niektóre komórki nie napromienione pod wpływem takich sygnałów wysyłają sygnały wtórne,



Fot. 5. Prof. Maria Wideli i prof. Andrzej Świerniak.

które obniżają efekt terapeutyczny w komórkach poddanych działaniu promieni jonizujących. W sesji pojawiła się również tematyka dotycząca zmian w transkryptomie i proteomie wywołanych promieniowaniem jonizującym oraz różne podejścia do modelowania matematycznego procesów związanych z oddziaływaniem między komórkami. Podczas konferencji zorganizowano zebranie polskich członków Europejskiego Stowarzyszenia Badań nad Rakiem (European Association for Cancer Research, EACR). Natomiast nową inicjatywą był udział w tegorocznych Spotkaniach niewielkiej grupy młodzieży ze szkół średnich, która słuchała wykładów dwóch sesji konferencyjnych; znalazło to pozytywny oddźwięk wśród młodzieży.

Sesja plakatowa była prezentacją 92 doniesień z różnych, głównie polskich ośrodków, choć były także doniesienia z Niemiec i Ukrainy. W ramach sesji plakatowej odbył się konkurs na najciekawsze doniesienia i ich prezentację ustną w drugim dniu konferencji. Plakaty oceniane były przez dwie komisje: jedną profesjonalną pod kierunkiem prof. Jana Filipskiego i drugą studencką złożoną ze studentów ostatnich lat kierunku Biotechnologia Politechniki Śląskiej. W przeprowadzonym konkursie najlepsze plakaty nagrodzono dyplomami. Najwyższe dziesięć miejsc uzyskali: Małgorzata Sekuła, Katarzyna Miękus, Marcin Majka (Kraków) za pracę „SDF-1/ITAC - CXCR7 axis in biology of cervical carcinoma”; Katarzyna Lubecka-Pietruszewska, Agnieszka Kaufman-Szymczyk, Ka-

tarzyna Majda, Barbara Cebula, Piotr Smolewski, Krystyna Fabianowska-Majewska (Łódź) za prezentację „Clofarabine regulates transcriptional activity of selected tumour suppressor genes in breast cancer lines”; Tomasz Owczarek, Jarosław Suchański, Ewa Stańczyk, Maciej Ugorski (Wrocław) za doniesienie „Ceramide galactosyltransferase (UGT8) expression facilitates breast cancer metastasis through proapoptotic ceramide glycosylation”; Artur Bal (Gliwice) za pracę „Segmentation of aggregate objects on the example of comet assay images”; Artur Zajkiewicz, Małgorzata Krześniak, Iwona Matuszczyk, Marek Rusin (Gliwice) za prezentację „NUTLIN-3a - the MDM2 antagonist and p53 activator helps to save the replicative potential of cancer cells treated with the genotoxic dose of resveratrol”; Tomasz Kujawa, Katarzyna Kujawa, Monika Kowal, Ewa Zembala-Nożyńska, Katarzyna Lisowska (Gliwice) za pracę „Periostin (POSTN) may potentially serve as prognostic marker for serious ovarian cancer”; G. Pasichnyk, N. Byts, A. Fedoseenko, A. Basaliy, A. Samoylenko, L. Drobot (Kijów) za prezentację „The regulatory role of adapter protein RUK CIN85 in the development and maintenance of cancer initiating cell phenotype”; Lidia Brodziak-Jarosz, Clarissa Gerhauser, Tobias Dick (Heidelberg) za pracę „Xanthohumol - cancer chemoprevention through redox modulation?”; R. Komor, W. Kowalczyk, R. Musioł, G. Pastuch, J. Polański, M. Serda, W. Szeja (Gliwice) za doniesienie „Synthesis and potential spectrum of biological activities of sugar derivatives of quinoline and isoquinoline”; Ewa Błaszczuk, Izabela Fulara, Danuta Ligocka, Sławomir Brzeziński, Ryszard Wiaderkiewicz, Danuta Mielżyńska-Svach (Katowice) za pracę „Non - invasive biomarkers in monitoring children's environmental exposure to PAHs”. Wyróżniono następujące plakaty: I. Roman Jaksik, Joanna Rzeszowska-Wolny (Gliwice) „The journey towards understanding the compositional properties of vertebrate genomes”; II. M. Szczygieł, B. Boroń, A. Susz, Z. Matuszak, K. Urbańska, L. Fiedor (Kraków) „Transdermal fluorescence measurement for *in vivo* monitoring of photosensitizer level”; III. Ewa Błaszczuk, Izabela

Fulara, Danuta Ligocka, Sławomir Brzeziński, Ryszard Wiaderkiewicz, Danuta Mielżyńska-Svach (Katowice) „Non-invasive biomarkers in monitoring children's environmental exposure to PAHs”. Konferencja połączona była z prezentacją wyrobów firm produkujących odczynniki i sprzęt laboratoryjny oraz ze sprzedażą polskiej i zagranicznej literatury naukowej (wg relacji prof. Joanny Rzeszowskiej-Wolny i prof. Macieja Ugorskiego)

Z inicjatywy i determinacji **prof. Mieczysława Chorążego**, czynnego członka PAU oraz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Polska Akademia Umiejętności oraz Miasto Gliwice zorganizowały jesienią ub. roku **Wszechnicę Naukowo-Kulturalną w Gliwicach**. Projekt jest realizowany wraz ze Śląskim Kuratorem Oświaty i jego Delegaturą w Gliwicach obejmującą swoim zasięgiem Gliwice, Zabrze, Rudę Śląską oraz powiat gliwicki. Wykłady finansowane są przez Miasto Gliwice w ramach wspierania realizacji zadania publicznego. W ramach Wszechnicy Naukowo-Kulturalnej odbyły się już i przewiduje się kolejne wykłady z cyklu wykładów z zakresu najnowszych osiągnięć nauki i problemów kultury. Na spotkania z wybitnymi osobowościami Nauki polskiej organizatorzy zapraszają młodzież szkół średnich oraz młodzież akademicką i wszystkich zainteresowanych. Dzięki przyjaznym gestom Kurii Diecezjalnej w Gliwicach spotkania odbywały się w sali Centrum Edukacyjnego Jana Pawła II w Gliwicach, miejscu umożliwiającym uczestnictwo dużej liczbie słuchaczy. Wykład inauguracyjny w październiku 2011 r. poprowadził prof. Janusz Sylwester z Zakładu Fizyki Słońca Centrum Badań Kosmicznych PAN we Wrocławiu. Temat wykładu Uczony zawarł w tytule: „Słońce coraz badamy lecz nie do końca rozumiemy”. Kolejne, comiesięczne wykłady poprowadzili: prof. Piotr Skubała z Katedry Ekologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, p.t. „Czy dobre czasy się skończyły” oraz prof. Jerzy Janik z Instytutu Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego PAN w Krakowie, p.t. „Fizycy a problem Boga. Pokora fizyka”.

W VII edycji konkursu „**Popularyzator Nauki 2011**” organizowanego

przez serwis internetowy Nauka w Polsce PAP we współpracy z Ministerstwem Nauki i Szkolnictwa Wyższego nagrody 1 lutego b.r. wręczali prezes PAP red. Jerzy Paciorkowski, przewodniczący konkursowego jury prezes Polskiej Akademii Nauk prof. Michał Kleiber oraz podsekretarz stanu w Ministerstwie Nauki i Szkolnictwa Wyższego prof. Witold Jurek. Podczas finału konkursu **prof. Łukasz Turski** z Centrum Fizyki Teoretycznej Polskiej Akademii Nauk **odebrał Nagrodę Specjalną za całokształt działalności popularyzatorskiej**. Laureat wymyślił Piknik Naukowy w Warszawie. Był jednym z pomysłodawców Centrum Nauki Kopernik. Ponadto nieustająco popularyzuje fizykę i wiedzę o zjawiskach fizycznych, które można odnaleźć w codziennym życiu. Jest pionierem ruchu popularyzatorskiego w Polsce, udało mu się zrealizować wielkie wyzwanie: wyprowadzić naukę z zamkniętych laboratoriów i sal wykładowych „do ludzi” i pokazać ją w atrakcyjny i przystępny sposób.

W kategorii **Naukowiec/Instytucja naukowa laureatami zostali prof. Stanisław Czachorowski** (Fot. 6) z Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, który popularyzuje biologię, **Agata Jurkowska** doktorantka na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego, organizująca m. in. warsztaty przyrodnicze i geologiczne dla dzieci i młodzieży w kinach i w centrach handlowych, oraz



Fot. 6. Prof. Stanisław Czachorowski.

dr Tomasz Samojlik (Fot. 7) pracownik naukowy Zakładu Badania Ssaków PAN w Białowieży, twórca bogato ilustrowanych przyrodniczych książek dla dzieci i komiksów popularnonaukowych, na co dzień badający tajemnice Puszczy Białowieskiej. Prof. Czachorowski popularyzuje biologię, głównie entomologię i eko-



Fot. 7. Dr Tomasz Samojlik (fot. P. Kieraciński).

logię, a także po części filozofię przyrody. Naukowo specjalizuje się w niewielkich owadach, chruścikach. Jest jednym z inicjatorów Olsztyńskich Dni Nauki i Sztuki, twórcą kawiarni naukowej, blogerem i autorem wielu kampanii społecznych. Mgr Agata Jurkowska jest koordynatorką Instytutu Nauk Geologicznych UJ podczas Festiwalu Nauki w Krakowie. Warsztaty, które współorganizowała razem z kolejnymi grupami studentów, pasjonatów, dotyczyły geologii, mineralogii, speleologii, ornitologii, botaniki, entomologii, paleontologii i neurobiologii. Jurkowska prowadziła akcję zaopatrywania szkół w geologiczne kolekcje dydaktyczne. Działa w Krakowskim Towarzystwie Przyjaciół Nauk i Sztuk.

W kategorii **Dziennikarz/Redakcja/Instytucja Nienaukowa**, na liście nagrodzonych znaleźli się: **dziennikarz Marek Nowicki**, który w „Faktach” TVN przybliżył widzom m. in. przełomowe operacje oraz nowe narzędzia stosowane w medycynie; **Fundacja NANONET**, której jednym z celów jest informowanie o korzyściach i zagrożeniach płynących z nanotechnologii, oraz **Stowarzyszenie Delta**, właściciel trzech placówek o nazwie JuraPark, popularyzujących wiedzę o dinozaurach i czasach, w których one żyły.

Nagrody w konkursie Popularyzator Nauki przyznano również w konkursowej kategorii **Prezentacja**

popularnonaukowa. Laureatami zostali: **Marek Golka**, nauczyciel fizyki i techniki z Gimnazjum nr 5 im. Jacka Malczewskiego w Radomiu (za pokazy w dziedzinie fizyki), **dr Marek Jurgowiak** z Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (za wykład „Granice długowieczności”) oraz **Ewa Sumelka** z Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu za „Biol Top Models, czyli komórka w szpilkach na wybiegu” (wykład połączony z pokazem kostiumów i tańca).

Wyróżnienie dla rzeczników, przyznane przez serwis Polskiej Agencji Prasowej Nauka w Polsce, otrzymał rzecznik Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie **Bartosz Dembiński**. Celem konkursu jest promowanie ludzi nauki, zespołów naukowych, dziennikarzy i redakcji, wyróżniających się w popularyzacji nauki polskiej wśród młodzieży i dorosłych. Pierwsza edycja Konkursu odbyła się w 2005 roku. Sylwetki uczestników konkursu w edycji roku 2011 były prezentowane na łamach serwisu Nauka w Polsce (www.naukawpolsce.pap.pl).

Fundacja na rzecz Nauki Polskiej udziela wsparcia naukowcom prowadzącym badania o istotnym znaczeniu dla nauki w Polsce, którzy nie mogą uzyskać dofinansowania z innych źródeł. **Nowy program** proponowany badaczom nosi nazwę **Exterius/Poza szlakiem**. Poprzez ten program Fundacja chce elastycznie i szybko reagować, w miarę swoich możliwości finansowych, na różnorodne potrzeby nauki, wykraczające poza zakres jej aktualnych programów. Fundacja nie określiła listy działań obejmowanych programem, a wnioski rozpatruje indywidualnie. Oceniane są: zasadność wniosku, jego walory naukowe, społeczne lub techniczne, a nade wszystko znaczenie danej inicjatywy dla środowiska naukowego. Fundacja rozpatruje wnioski instytucji naukowych i organizacji wspierających rozwój nauki w Polsce oraz wnioski autorów indywidualnych i zespołów naukowych. Konkurs odbywa się w trybie ciągłym.

Profesor Ryszard Horodecki, fizyk, laureat Nagrody FNP w obszarze nauk ścisłych z 2008 r. otrzymał prestiżowy **Advanced Grant** przyznawany doświadczonym badaczom przez

European Research Council (ERC) w programie „Ideas”. Prof. Horodecki otrzymał blisko 2 mln euro na realizację projektu „Kwantowe zasoby: koncepcje i zastosowania”. Będzie go realizował do końca 2016 r. na Uniwersytecie Gdańskim, we współpracy z innymi ośrodkami polskimi i zagranicznymi t.j. z Centrum Fizyki Teoretycznej PAN, Politechniką Gdańską, Uniwersytetem im. Adama Mickiewicza, Uniwersytetem Ludwiga Maximiliana w Monachium oraz Uniwersytetem w Sztokholmie. Prof. Horodecki jest trzecim polskim laureatem ERC Advanced Grant. Pozostali dwaj, prof. Tomasz Dietl (fizyk, grant w 2008 r.) i prof. Andrzej Udalski (astronom, grant w 2009 r.) są także laureatami Nagrody FNP. Advanced Grant jest przyznawany przez ERC uczonemu bez względu na uprawianą dziedzinę naukową, narodowość naukowca i jego wiek.

Prof. Michael Giersig (Fot. 8), specjalista w dziedzinie fizyki cząstek elementarnych i nanotechnologii z Wolnego Uniwersytetu w Berlinie, jest tegorocznym laureatem **Polskiego Honorowego Stypendium im. Aleksandra von Humboldta**. Wyróżnienie przyznaje Fundacja na rzecz Nauki Polskiej wybitnym niemieckim uczonym. Polskie Honorowe Stypendium im. A. von Humboldta honoruje osiągnięcia naukowe laureatów oraz stymuluje długookresową współpracę pomiędzy polskimi i niemieckimi badaczami. Jest odpowiednikiem „Humboldt-Forschungspreis”, prestiżowego wyróżnienia dla uczonych zagranicznych znanej niemieckiej Fundacji Aleksandra von Humboldta. Prof. Michael Giersig otrzymał stypendium na sześciomiesięczny pobyt w Poznaniu. Swoje badania będzie prowadził na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza (UAM)



Fot. 8. Prof. Michael Giersig.

oraz w Wielkopolskim Centrum Zaawansowanych Technologii. Laureat przyjeżdża do Polski na zaproszenie profesora Bogdana Marcińca z UAM. Uczony urodził się w Wielkopolsce i studiował na UAM. Swą karierę naukową kontynuował w niemieckich instytucjach naukowych m.in.: Instytucie Maxa-Plancka w Berlinie, Uniwersytecie Poczdamskim. Prof. Giersig zajmuje się nanometrowymi półprzewodnikowymi, metalicznymi cząsteczkami magnetycznymi. Tworzy również specjalne nanostruktury oparte na pojedynczych nanocząstkach. Jest autorem ponad 200 publikacji naukowych dotyczących chemii, inżynierii materiałowej, fizyki, biochemii, medycyny oraz nanotechnologii. Profesor jest laureatem nagrody naukowej Inovation competition in Medical Technology BMBF, zdobywcą medalu I stopnia za wybitne zasługi dla rozwoju Wydziału Inżynierii Fizycznej Politechniki Czeskiej w Pradze. Otrzymał również stypendium Fulbrighta na badania w Boston College oraz Harvard Medical School. Stypendium im. Aleksandra von Humboldta przyznawane jest na podstawie porozumienia z 1995 r. pomiędzy FNP a Fundacją Humboldta. Dzięki tej umowie FNP dołączyła do podobnych organizacji z 19 krajów, które z Fundacją Humboldta podpisały analogiczne partnerskie porozumienia o wzajemnym przyznawaniu tych wyróżnień najwyższym uczonym. Patron stypendium Aleksander von Humboldt (1769-1859) był niemieckim przyrodnikiem, podróżnikiem i geografem. Współpracował z wieloma Polakami, był honorowym członkiem Towarzystwa Przyjaciół Nauk w Warszawie i pierwszym propagatorem poezji Adama Mickiewicza w Niemczech.

Dr Marcin Nowotny (Fot. 9) z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie (IIMCB) otrzymał prestiżową nagrodę **International Early Career Award (IECS)** amerykańskiego Instytutu Medycznego Howarda Hughesa (HHMI) jest jednym z 28 tegorocznych laureatów tej nagrody. Nagroda wspierająca naukowców na wczesnym etapie kariery naukowej jest pięcioletnim grantem, w ramach którego naukowiec może zakupić sprzęt i materiały oraz zatrudnić wykonaw-



Fot. 9. Dr Marcin Nowotny.

ców projektu. Dr Nowotny jest kierownikiem Laboratorium Struktury Białka w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. Celem jego badań jest określenie mechanizmu działania deadenylaz, zaangażowanych w proces usuwania cząsteczek RNA z komórki. Warunkiem przystąpienia do konkursu było prowadzenie własnej pracowni w naukach biomedycznych przez nie więcej niż 7 lat, odbycie studiów doktoranckich lub stażu podoktorskiego w jednym z ośrodków w Stanach Zjednoczonych oraz publikacje w światowej klasy czasopismach naukowych, a najważniejszym kryterium wyboru była jakość naukowa kandydatów; rozważano dotychczasowe osiągnięcia, potencjał naukowy, a także jasność przedstawienia projektu naukowego oraz możliwość nawiązania kontaktów i trwałej współpracy z naukowcami amerykańskimi. Laureaci IECS będą zapraszani na organizowane przez Instytut spotkania i konferencje, na których będą mogli prezentować wyniki swoich prac. Nagroda IECS to najnowsza edycja grantów międzynarodowych udzielanych przez Instytut Howarda Houghesa od 1991 r. Do tej pory HHMI wydał na ten cel ponad 145 mln dolarów. HHMI to amerykański naukowy instytut medyczny o charakterze non-profit, znajdujący się w Chevy Chase, w stanie Maryland. Instytut założony został w 1953 r. przez Howarda Houghesa. Jest jedną z największych prywatnych organizacji finansujących oraz prowadzących biologiczne i medyczne badania naukowe w USA i na świecie. Z HHMI związanych jest 13 laureatów Nagrody Nobla i 147 członków Amerykańskiej Akademii Nauk. Więcej informacji o dr Marcinie Nowotnym można znaleźć na stronie http://www.hhmi.org/research/iecs/nowotny_bio.html, a o samej na-

grodzie IECS na stronie <http://www.hhmi.org/news/iecs20120124.html>.

Wybitne kobiety polskiej nauki (Fot. 10) otrzymały w styczniu b.r. odznaczenia państwowe z rąk prezydenta Bronisława Komorowskiego. Nagrodzono je za osiągnięcia i zasługi w pracy naukowo-badawczej, dydaktycznej i społecznej, popularyzowanie nauki w Polsce i na świecie. Krzyżem Oficerskim Orderu Odrodzenia Polski odznaczone zostały Pani profesor: Mirosława Marody, Maria Nowakowska, Jadwiga Puzynina, Elżbieta Frąckowiak, Ewa Kamler, Teresa Michałowska, Irena Szumiel. Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski wyróżnione zostały Pani profesor: Ewa Bartnik, Alina Nowicka-Jeż, Renata Bilewicz, Barbara Bilińska, Ewa Damek, Małgorzata



Fot. 10. Odznaczenia dla kobiet nauki polskiej.

Fuszara, Małgorzata Kujawińska, Ewa Łojkowska, Dorota Rosińska, Teresa Rząca-Urban, Barbara Żupańska, Małgorzata Witko. Krzyż Komandorski Orderu Odrodzenia Polski otrzymała prof. Hanna Świda-Ziemba, a prof. Janina Józwiak Krzyż Komandorski z Gwiazdą Orderu Odrodzenia Polski. Złoty Krzyż Zasługi otrzymały: dr hab. Joanna Cichy, prof. Maria Jarymowicz, dr hab. Barbara Klajnert, dr hab. Hanna Kocka-Krenz, prof. Jolanta Zakrzewska-Czerwińska. Prezydent gratulował uhonorowanym uczonym, mówiąc, że reprezentują one najwyższy poziom polskiej nauki, aspiracji i ambicji kobiet. Podobnie do Marii Skłodowskiej-Curie mają też umiejętność działania w niełatwych warunkach.

Profesorowie Arkadiusz Wójs, Andrzej Kowalczyk i Andrzej Kałużka odebrali 16 grudnia 2011 r. w Warszawie nagrody Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za najwybitniejsze osiągnięcia naukowe. Nagrody Ministra Nauki i Szkol-

nictwa Wyższego są przyznawane co roku w trzech kategoriach: badań podstawowych, badań na rzecz rozwoju gospodarki i badań na rzecz rozwoju społeczeństwa. W tym roku w dziedzinie badań podstawowych nagrodę otrzymał prof. Arkadiusz Wójs (Fot. 11) z Instytutu Fizyki Politechniki Wrocławskiej. Jego prace mogą przybliżyć uczonych do wybudowania komputera kwantowego. Prof. Wójs jest specjalistą w dziedzinie fizyki materii skondensowanej, a szczególnie niskowymiarowych układów elektronowych. Do jego szczególnych osiągnięć należą trzy prace przedstawione w 2010 roku w prestiżowym czasopiśmie fizycznym „Physical Review Letters”. Właśnie one stanowiły przełom w badaniach nad fizyczną realizacją „egzotycznych statystyk kwantowych”, ważnych w kontekście realizacji komputera kwantowego.

Prof. Andrzej Kowalczyk z Instytutu Fizyki Uniwersytetu Mikołaja Kopernika otrzymał nagrodę w kategorii badań na rzecz rozwoju gospodarki. Naukowiec prowadzi badania z zakresu optyki stosowanej, a jego wielkim osiągnięciem jest opracowa-



Fot. 11. Prof. Arkadiusz Wójs.

nie metody i wdrożenie w praktyce spektralnego tomografu optycznego. Metoda ta jest stukrotnie szybsza i lepiej wykorzystuje światło niż metody stosowane do tej pory. Ze względu na tę właściwość tomograficzne badania okulistyczne stały się bardziej przyjazne dla pacjenta.

W kategorii badań na rzecz rozwoju społeczeństwa nagrodę odebrał prof. Andrzej Kadłuczka z Instytutu Historii Architektury i Konserwacji Zabytków Politechniki Krakowskiej. Laureat od 35 lat prowadzi badania nad integracją zabytkowej architektury z potrzebami współczesnego społeczeństwa. Do jego najważniejszych osiągnięć należy zrealizowanie unikalnego w skali międzynarodowej Podziemnego Muzeum Rynku Głównego w Krakowie.

Nagrody Ministra za całokształt dorobku otrzymało dziesięcioro nauuczycieli akademickich: prof. Andrzej Antoszewski z Uniwersytetu Wrocławskiego; prof. Stanisław Białousz z Politechniki Warszawskiej; prof. Maria Dzielska z Uniwersytetu Jagiellońskiego; prof. Kazimierz Goebel z Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej; prof. Andrzej Jakubowski z Politechniki Warszawskiej; prof. Andrzej Korzeniowski z Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu; prof. Jan Łoboda z Uniwersytetu Wrocławskiego; prof. Rudolf Michałek z Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja; prof. Andrzej Skręt z Uniwersytetu Rzeszowskiego i prof. Aniela Styś z Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu. Nagrody Ministra są przyznawane od 2006 r.; do tej pory uzyskało je 15 wybitnych uczonych. W tym roku do konkursu wpłynęło 61 zgłoszeń. Wśród kandydatów znalazło się 18 kobiet; najwięcej zgłoszeń, bo 21, wpłynęło z warszawskich instytucji naukowych.

Sześciu naukowców nagrodziło Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu „Ideas Plus”. W programie ustanowionym przez ministerstwo nauki w listopadzie 2010 r. dofinansowanie na realizację całości lub części swoich badań naukowych otrzymują uczeni, którzy zgłosili je wcześniej do konkursu IDEAS Europejskiej Rady Badań Naukowych. Najwyższe dofinansowanie uzyskał dr Szymon Świeżewski (Fot. 12) z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, praca pt. „Molekularne podstawy porostania *Arabidopsis thaliana*”, prof. Ryszard Horodecki z Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki Uniwersytetu Gdańskiego, praca pt. „Wydajność kwantowo-mechanicznych zasobów” i dr hab. Szczepan Zapotoczny z Wy-

działu Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, praca pt. „Nanostrukturalne układy polimerowe do konwersji energii słonecznej”.

Dr hab. Grzegorz Piestrzyński z Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego otrzymał dofinansowanie na zrealizowanie badań w ramach pracy „Dokładna kalibracja kosmicznej skali odległości oraz precyzyjne wyznaczanie parametrów fizycznych gwiazd” oraz prof. Piotr Bogusław Mucha z Instytutu Matematyczne-



Fot. 12. Dr Szymon Świeżewski.

go PAN w Warszawie, autor pracy „Układy fizyczne oczyma matematyki”. Wśród szóstki nagrodzonych znalazła się również dr hab. Grażyna Jasiońska z Collegium Medicum UJ prowadząca badania w ramach projektu: „Płodność a starzenie się i długość życia kobiet”.

Według założeń MNiSW program Ideas Plus ma m.in. przeciwdziałać tendencji spadku zainteresowania polskich naukowców udziałem w konkursach organizowanych przez międzynarodowe instytucje oraz ma również zwiększyć dynamikę i kreatywność badań prowadzonych w jednostkach naukowych, wykraczających poza granice dzisiejszej wiedzy. Europejska Rada Badań Naukowych finansuje prowadzenie pionierskich badań o wysokim stopniu ryzyka, na granicy obecnej wiedzy. Preferowane są badania interdyscyplinarne, mogące doprowadzić do nowych, funda-

mentalnych odkryć. Program IDEAS ma pomóc naukowcom w urzeczywistnianiu i wdrażaniu najbardziej nowatorskich pomysłów z różnych dziedzin wiedzy.

Autor 130 patentów, dr hab. Stanisław Szczepaniak został uhonorowany Wielkim Krzyżem Oficerskim Orderu Wynalazczości, nadanym przez Najwyższą Komisję Odznaczeń Królestwa Belgii. Wyróżnienie zostało wręczone podczas specjalnego posiedzenia Senatu i Konwentu Politechniki Świętokrzyskiej oraz Rady Miasta Kielce. Odznaczenie jest przyznawane wynalazcom i racjonalizatorom, posiadaczom licznych patentów. Do tej pory jedynie 4 Polaków zostało odznaczonych Wielkim Krzyżem. Stanisław Szczepaniak opatentował 130 wynalazków i racjonalizatorskich rozwiązań. Jest prezesem innowacyjno-wdrożeniowej firmy Inwex, zajmującej się produkcją i sprzedażą ekologicznych rozwiązań m.in. dla przemysłu metalowego, hutniczego, górniczego, motoryzacyjnego, budowlanego i rolniczego. Produkty Szczepaniaka prezentowane podczas krajowych i światowych targów wynalazków były wielokrotnie nagrodzone złotymi medalami. Tylko w roku 2011 Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej udzielił 13 patentów na rozwiązania Stanisława Szczepaniaka.

Nagrodę im. Jana Uphagena, wyróżnienie dla młodych naukowców z uczelni Trójmiasta, otrzymały dr Sylwia Freza i dr Magdalena Giers z Uniwersytetu Gdańskiego. Dr Sylwia Freza, adiunkt na Wydziale Chemii UG, została doceniona za badania nad strukturą elektronową nietypowych anionów molekularnych oraz innych zagadnień związanych z projektowaniem i przewidywaniem stabilności cząsteczek chemicznych. Badaczka uczestniczy w projektach europejskich (MULTIPOL 2009-2011, PARYLENS 2011-2013 dotyczącym modelowania kinetyki reakcji polimeryzacji i kopolimeryzacji parylenu) oraz zakwalifikowanym do finansowania polsko-szwajcarskim projekcie badawczym ENERLIQ-2011-2014 dotyczącym konwersji energii w oparciu o ciecz jonowe i nowatorską technologię SOLID.

Dr Magdalena Giers otrzymała nagrodę w kategorii nauk humani-

stycznych za prace dotyczące funkcjonowania i rozwoju dzieci z zespołem Williama. Praca doktorska Laureatki „Funkcjonowanie poznawcze i społeczno-emocjonalne osób z zespołem Williama” stanowi ważne źródło wiedzy o rozwoju dzieci z tym rzadkim schorzeniem genetycznym. Praca ta, wraz z projektem badawczym, była przygotowywana w Instytucie Psychologii Uniwersytetu Gdańskiego we współpracy z Gdańskim Uniwersytetem Medycznym, z zespołem lekarzy genetyków.

Nagroda im. Jana Uphagena to prestiżowe wyróżnienie, które otrzymują najlepsi młodzi naukowcy z uczelni Trójmiasta. Co roku przyznawane są nagrody w dwóch kategoriach: jedna w kategorii nauk humanistycznych, a druga w kategorii nauk ścisłych i przyrodniczych. Laureatów wyłania kapituła, w której skład wchodzi przedstawiciele uczelni Trójmiasta, PAN oraz reprezentant Urzędu Prezydenta Miasta. Nagrody im. Jana Uphagena przyznawane są od 2003 roku. Do 2006 roku nagroda nosiła nazwę „Młody Heweliusz”. Szczegóły na stronie: <http://www.ug.edu.pl/>.

Michał Mikulski (Fot. 13) doktorant Politechniki Śląskiej zwyciężył w II edycji konkursu Akademicki Mistrz Innowacyjności. Jego praca pt. „Prototyp biomedycznego ramienia robotycznego sterowanego elektromiogramem” uznana została za najciekawszą spośród 36 projektów zgłoszonych do konkursu. Laureata konkursu Michała Mikulskiego z Zakładu Sterowania i Robotyki, Instytutu Automatyki Wydziału Automatyki, Elektroniki i Informatyki Politechniki Śląskiej nagrodzono za prototyp robota noszonego, który z sukcesem może służyć do rehabilitacji ruchowej osób z amputacjami wysokimi, zanikiem mięśni lub chorobami pokrewnymi. Obecnie na Politechnice Śląskiej laureat konkursu pracuje nad egzoszkieletem kończyn dolnych, czyli nietypowym robotem noszonym na nogach ułatwiającym poruszanie się osobom niepełnosprawnym, bez obciążania kręgosłupa, i co istotne z możliwością sterowania robotem przez użytkownika lub lekarza. Z konstrukcji mogą korzystać również osoby sprawne, bowiem egzoszkielec wzmacnia kończynę, które utraciły całą lub część swojej funkcjonalności.



Fot. 13. Mgr Michał Mikulski.

Konkurs Akademicki Mistrz Innowacyjności jest adresowany do absolwentów szkół wyższych, których prace magisterskie dotyczą zagadnień: ekoinnowacji, innowacji w sektorze usług, popytowego podejścia do tworzenia innowacji lub nowego podejścia do zamówień publicznych. Akademickim Mistrzem Innowacyjności może zostać autor pracy, która uzyskała ocenę minimum dobrą i obroniona została w terminie przewidzianym w regulaminie konkursu. Prace podlegają niezależnej ocenie dwóch członków kapituły. Kryteria uwzględniają powiązanie zakresu pracy z tematyką konkursu, innowacyjność i oryginalność przedmiotu pracy, a także praktyczne możliwości wdrożenia przedstawionego w pracy rozwiązania.

Profesorowie Mirosław Szreder i Andrzej Szutowicz zostali laureatami Nagrody Naukowej Miasta Gdańska im. Jana Heweliusza za rok 2011; nagrody, Pomorskie Noble, wręczono w końcu stycznia b.r. w Ratuszu Staromiejskim w Gdańsku. Są one przyznawane od 1987 roku reprezentantom gdańskiego środowiska naukowego za wybitne osiągnięcia naukowe o charakterze poznawczym. Prof. Mirosław Szreder z Katedry Statystyki Wydziału Zarządzania Uniwersytetu Gdańskiego otrzymał nagrodę w kategorii nauk humanistycznych. Uczony jest wybitnym ekonomistą specjalizującym

się w rozwoju i nowych zastosowaniach nauk ilościowych. Kierował międzynarodowymi projektami badawczymi z zakresu analiz sektora małych i średnich przedsiębiorstw oraz rynków pracy w okresie transformacji. Laureat jest doświadczonym dydaktykiem, pracował jako wykładowca (ang. *visiting lecturer*) statystyki i ekonometrii w uniwersytetach brytyjskich, University of Leicester i University of Edinburgh. Prof. Szreder pełni także ważne funkcje w polskim środowisku naukowym; jest m.in. sekretarzem naukowym Komitetu Statystyki i Ekonometrii PAN, redaktorem naczelnym kwartalnika naukowego „Przegląd Statystyczny”. W 2009 r. został odznaczony Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski przez Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej. W kategorii nauk ścisłych i przyrodniczych Nagrodę Naukową Miasta Gdańska otrzymał prof. Andrzej Szutowicz, specjalista w dziedzinie diagnostyki laboratoryjnej Katedry Biochemii Klinicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. W 2011 roku otrzymał także Nagrodę im. Tadeusza Browicza Polskiej Akademii Umiejętności za wybitne osiągnięcia w dziedzinie medycyny. Jest członkiem honorowym Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej.

Filtr akustyczny do tłumienia hałasu, wykonany przez Wojciecha Łapkę z Politechniki Poznańskiej zdobył tytuł „Wynalazku roku” w konkursie organizowanym przez Miasto Poznań. Konkurs przeznaczony był dla młodych wynalazców, naukowców i studentów. Do finału zakwalifikowano sześć projektów. Zwycięski projekt opiera się na koncepcji tzw. śruby Archimedesesa. Nagrodzony w konkursie projekt to filtr, który można umieścić w instalacjach kominowych, wentylacyjnych i klimatyzacyjnych. Rozwiązanie to, umieszczane wewnątrz instalacji, redukuje hałas wywoływany przez te urządzenia. Koncepcja jest prosta i tania w zastosowaniu. Wynalazca już zgłosił wniosek o uzyskanie patentu na swój projekt. Laureat otrzymał nagrodę pieniężną. Organizatorem konkursu „Wynalazek roku” jest Miasto Poznań. Projekt jest elementem programu edukacyjnego „Poznań know how workshops” i ma na celu wyróż-

nianie i promocję zdolnych twórców, ich unikatowych pomysłów i ambitnych przedsięwzięć biznesowych.

Srebrne medale na Światowej Olimpiadzie Fizycznej (WoPhO) dla Wojciecha Tarnowskiego i Adama Wyrzykowskiego, studentów pierwszego roku studiów matematyczno-przyrodniczych Uniwersytetu Jagiellońskiego. Olimpiada odbyła się na przełomie grudnia i stycznia w Mataram na indonezyjskiej wyspie Lombok. W fizycznych zmaganiach udział wzięło 109 uczestników z 15 krajów. Oprócz dwóch reprezentantów Polski w Olimpiadzie uczestniczyli studenci pochodzący z Chin, Turcji, Kazachstanu, Słowacji, Estonii, Hong Kongu, Singapuru, Węgier, Rosji, Bułgarii, Białorusi, Niemiec, Brazylii i Indonezji. Jury złożone z przedstawicieli środowisk naukowych różnych krajów wyłoniło 11 zdobywców złotego medalu, wśród których znaleźli się olimpijczycy z Chin, Estonii, Niemiec, Węgier, Rosji, Indonezji, Singapuru i Słowacji.

Srebrny medal otrzymało 12 uczestników pochodzących z Singapuru, Indonezji, Polski, Bułgarii, Kazachstanu, Białorusi, Bułgarii i Niemiec. Przyznano również 11 brązowych medali, z czego 7 olimpijczkom z Indonezji, a pozostałe uczniom z Rosji, Węgier, Hong Kongu i Turcji. Olimpiada miała wyłonić najlepszego z najlepszych, dlatego do udziału w niej zaproszono złotych i srebrnych medalistów Międzynarodowej Olimpiady Fizycznej (IPhO) i Azjatyckiej Olimpiady Fizycznej (APHO). Wzięli w niej również udział zawodnicy wyłonieni z tzw. Selection Round, które polegało na rozwiązaniu 10 zadań wymagających niestandardowych rozwiązań, długich rachunków lub obliczeń numerycznych. Wojciech Tarnowski został zaproszony do wzięcia udziału w Olimpiadzie jako medalista IPhO, natomiast Adam Wyrzykowski uzyskał najlepszy wynik w Selection Round.

W Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN im. Mercelego Nenckiego uruchomiona została środowiskowa **Pracownia Obrazowania Mózgu** w ramach Centrum Neurobiologii. Kierownikiem Pracowni, wybranym w wyniku konkursu, został **dr Stefan Gaździński**. Jest On absolwentem kierunku fizyki medycznej Uniwer-

sytetu Jagiellońskiego. Studiował również na Wydziale Psychologii UJ. Jego rozprawa doktorska dotyczyła badania dynamiki molekularnej wody za pomocą metod rezonansu magnetycznego. Dr Gaździński odbył staż podoktorski na Wydziale Radiologii Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Francisco, USA. Następnie pracował w Center for Imaging of Neurodegenerative Diseases w San Francisco, USA oraz na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego. W ostatnim dziesięcioleciu zajmował się obrazowaniem magnetycznego rezonansu w chorobach neurodegeneracyjnych. W nowopowstałej pracowni będą prowadzone badania z użyciem technik badawczych rezonansu magnetycznego, w tym: funkcjonalnego obrazowania mózgu, spektroskopii, rejestrowania przepływu krwi w mózgu oraz tensora dyfuzji. Techniki te pozwalają na prowadzenie badań w bardzo szerokim zakresie tematycznym, od psychologii poznawczej, poprzez choroby neurodegeneracyjne, po badania działania leków.

W 2007 r. powstała grupa będąca załącznikiem konsorcjum **Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii CePT**, które dziś tworzą: Warszawski Uniwersytet Medyczny (WUM), Uniwersytet Warszawski, Politechnika Warszawska oraz siedem instytutów PAN: Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Instytut Biochemii i Biofizyki, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Instytut Podstawowych Problemów Techniki, Instytut Wysokich Ciśnień, Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej. Koordynacją prac zajął się WUM, bezpośredni beneficjent unijnej dotacji. To największe przedsięwzięcie biomedyczne i biotechnologiczne w Europie Środkowo-Wschodniej było możliwe dzięki ustaleniu programów operacyjnych, w tym przypadku Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. Koszty kwalifikowane w wysokości 85% pokrywane są ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, natomiast 15% stanowi wkład krajowy, który będzie zapewniony ze środków budżetu państwa. W pierwszym etapie naukowcy wystąpili do Ministerstwa

Nauki i Szkolnictwa Wyższego, które pomogło projektowi CePT znaleźć się na liście priorytetowych programów inwestycyjnych w obszarze nauki. Potem wspólnie z ministerstwem zaczęli projekt przygotowywać. Przez półtora roku trwały prace koncepcyjne, potem zostało przeprowadzone studium wykonalności.

Największa inwestycja jest realizowana przez Warszawski Uniwersytet Medyczny. Od podstaw budowane jest tu Centrum Badań Przedklinicznych, oddzielny budynek z wyposażeniem technicznym i bardzo cenną aparaturą badawczą. Druga inwestycja jest realizowana w Instytucie Nenckiego PAN, a kolejne w Instytucie Wysokich Ciśnień i w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Określono 124 szczegółowe projekty planowane do realizacji we współpracy pomiędzy partnerami w różnych obszarach medycznych. Na kampusie Ochota powstał klaster biotechnologiczno-medyczny BTM Mazowsze, czyli konsorcjum rozmaitych organizacji, są partnerzy z CePT, przedstawiciele prywatnych inwestorów, małe i średnie przedsiębiorstwa, które działają w przemyśle farmaceutycznym w Polsce. Do tego klastra zapraszane będą także duże firmy farmaceutyczne. Atutem projektu CePT jest połączenie potencjału wybitnych naukowców z możliwościami sieci laboratoriów wyposażonych w specjalistyczną aparaturę najwyższej klasy, uwzględniającej zarówno laboratoria fizykochemiczne, biomolekularne i biotechnologiczne, laboratoria inżynierii biomedycznej i technologii biomateriałów, jednostki prowadzące badania przedkliniczne na zwierzęcych modelach chorób cywilizacyjnych, jak i specjalistyczną bazę do badań klinicznych.

W ramach prowadzonego przez Zakład Genetyki i Patomorfologii PUM **międzynarodowego projektu Eco4Life cyklicznie odbywają się bezpłatne warsztaty kierowane do naukowców, przedsiębiorców i administracji**. W styczniu b.r. w Zakładzie Genetyki i Patomorfologii odbyło się spotkanie poświęcone tematyce ochrony patentowej pt. „**Praktyczne aspekty ochrony patentowej dla wynalazków uzyskiwanych w wyniku prowadzonych prac badawczych**”. Warsztaty prowadził Rafał

Witek z Kancelarii Patentowej WTS z Wrocławia, od 2004 r. wpisany na listę europejskich rzeczników patentowych, specjalizujący się w ochronie i komercjalizacji wynalazków z dziedziny biotechnologii i farmacji; jeden z niewielu rzeczników patentowych w Polsce mający w swoim dorobku przeprowadzone z sukcesem postępowania przed urzędem europejskim i amerykańskim.

Naukowcy z Zakładu Genetyki i Patomorfologii PUM (pod kierownictwem prof. Jana Lubińskiego) są autorami unikatowego zestawu patentów, obejmujących testy DNA i preparaty chemoprewencyjne. Zestaw ten tworzy 15 przyznanych patentów (w tym 8 patentów zagranicznych oraz 7 polskich) oraz 17 zgłoszeń patentowych (12 zagranicznych, 5 polskich). 3 przyznane patenty zagraniczne dotyczą USA.

Ochrona własności intelektualnej za granicą jest zwykle kosztowna. Również w przypadku zespołu naukowców z Zakładu Genetyki i Patomorfologii PUM, władze uczelni stwierdziły, że jest to zbyt ryzykowne, a więc zaproponowano powołanie własnej spółki, która otrzyma licencję wyłączną na komercjalizację w świecie wyników badań. Uczelnia zagwarantowała sobie 20% zysku od przychodów. W ten sposób w 2005 r. powstała spółka spin-off przy PUM, Read-Gene SA. Naukowcy z Zakładu Genetyki i Patomorfologii PUM od wielu lat współpracują z Kancelarią Patentową WTS z Wrocławia, która od początku miała duże ambicje i razem z zespołem PUM uczyła się, jak uzyskać patent międzynarodowy. Według prof. Lubińskiego patentowa-

nie to zabezpieczenie własności intelektualnej i jednoznaczne udokumentowanie pierwszeństwa: zabezpiecza, że nikt nam nie zabroni korzystania z uzyskiwanych wyników w dalszych pracach. We współczesnym świecie patentowanie jest fundamentalne na drodze prowadzącej do komercjalizacji odkryć lub wyników badań. Informacje na temat planowanych w najbliższym czasie warsztatów można uzyskać na stronie internetowej projektu: www.eco4life.info.

Niedobór dopaminy jest oznaką ciężkich chorób układu nerwowego. Badania stężenia dopaminy, które w płynach fizjologicznych są zazwyczaj bardzo małe, są drogie i wymagają specjalistycznej aparatury, niedostępnej w gabinetach lekarskich. **Dzięki wynalazkowi z Instytutu Chemii Fizycznej PAN (ICHF PAN)** w Warszawie sytuacja ta może się zmienić. W Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie skonstruowano elektrody pokryte nanocząstkami węgla osadzonymi na drobinach polikrzemianowych. Elektrody z powodzeniem wykorzystano do badania stężeń dopaminy w roztworach w obecności kwasów moczowego i askorbinowego oraz paracetamolu, a są to substancje utrudniające analizę. Opracowana metoda detekcji dopaminy otwiera drogę do tanich i szybkich testów medycznych, np. w diagnostyce choroby Parkinsona. Zatem metoda miałaby istotne znaczenie medyczne. Na razie metoda ma naturalny próg detekcji; pozwala na ustalenie, że dopaminy w organizmie jest za mało, lecz nie można określić w jakim stopniu za mało. Twórcy elek-

trod mają nadzieję na dalsze zwiększenie czułości metody.

Nowe elektrody, pokryte nanocząstkami węgla osadzonymi na drobinach polikrzemianowych, pozwalają łatwo i tanio wykrywać dopaminę w roztworach. Elektrody opracowane w Instytucie Chemii Fizycznej PAN składają się z naprzemiennych warstw drobin polikrzemianowych i nanocząstek węgla. Polikrzemianowe drobiny mają rozmiary od 100 do 300 nanometrów (miliardowych części metra). Jako nie przewodzące, pełnią jedynie rolę szkieletu rozbudowującego powierzchnię elektrody. Polikrzemiany są gęsto pokryte nanocząstkami węgla (w rozmiarach od 8 do 18 nm), które tworzą właściwą, przewodzącą prąd powierzchnię roboczą. Wytwarzanie elektrod z nowymi pokryciami jest tanie. Elektrody pokryte nanocząstkami węglowymi osadzonymi na polikrzemianach powstały w ramach grantu „Kwantowe nanostruktury półprzewodnikowe do zastosowań w biologii i medycynie”. Grant, wartości ponad 73 mln złotych, jest finansowany w 85% z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013. Głównymi uczestnikami grantu są Instytut Fizyki PAN (koordynator), Instytut Chemii Fizycznej PAN i Instytut Wysokich Ciśnień PAN. Wyniki badań, poprzedzone zgłoszeniem patentowym, opublikowano w czasopiśmie „Biosensors and Bioelectronics”.

pod redakcją
Teresy Wesołowskiej

KWESTIA REGULACJI CYKLU KREBSA W ASPEKTCIE DYDAKTYCZNYM

Szanowny Panie Redaktorze,

Zdaję sobie sprawę z tego, że czasopismo „Postępy Biochemii” jest przeznaczone przede wszystkim żeby publikować artykuły przeglądowe o najnowszych osiągnięciach w tej dziedzinie. Tym nie mniej odważyłem się zwrócić do Pana z prośbą o opublikowanie tego listu z kilkoma uwagami krytycznymi dotyczącymi przedstawiania w podręcznikach bio-

chemii kluczowego zagadnienia, regulacji cyklu Krebsa, które bazuje na dość dawno uzyskanych danych. W gruncie rzeczy niełatwo znaleźć inną możliwość upublicznienia takiego rodzaju spostrzeżeń o zabarwieniu dydaktycznym, niż na łamach Postępów Biochemii.

Obecnie biochemia zajmuje ważne miejsce w programie szeregu kierunków studiów. Opanowanie podstaw

tego złożonego przedmiotu przez studentów odbywa się w znacznej mierze za pomocą podręczników biochemii, których dzisiaj na rynku wydawniczym nie brakuje. Mają one zazwyczaj świetną szatę graficzną oraz zawierają dużo informacji weryfikowanej i uzupełnianej w kolejnych wydaniach. Można domniemywać, że narastająca lawina wiedzy z zakresu genomiki, proteomiki, metabolomiki

i innych rozdziałów dziedziny stanowi niełatwe wyzwanie dla autorów podręczników. Jednak doświadczeni autorzy przy dobrym dostępie do baz informacji z reguły świetnie sobie radzą z jej nadmiarem. Ułatwieniem jest też zapewne to, że niektóre rdzeniowe zagadnienia biochemii, mianowicie szlaki metaboliczne, stanowią sobą dość ustabilizowaną od wielu lat wiedzę.

Nie ma potrzeby podkreślać, jak wyjątkowo ważną rolę wśród szlaków metabolicznych odgrywa cykl Krebsa, będący faktycznie ich integratorem. Ta kluczowa pozycja cyklu Krebsa wymaga oczywiście doskonałej jego regulacji. Jasne jest, że tylko wyselekcjonowane w toku ewolucji nieliczne enzymy tego cyklu potrafią pełnić oprócz katalitycznej też rolę regulacyjną. Które więc ogniwa enzymatyczne cyklu Krebsa są jego punktami kontrolnymi? W jaki sposób jest regulowana aktywność tych enzymów?

Student, a nawet początkujący nauczyciel akademicki, poszukując jednoznacznej odpowiedzi na te w zasadzie elementarne pytania, po zajrzeniu do podręczników biochemii może zostać nieco zdezorientowany. Jeden z enzymów, mianowicie dehydrogenaza izocytrynianowa (IDH) zależna od NAD, od lat 60. ubiegłego stulecia na podstawie badań Chen i Plaut [1] i innych słusznie jest uznawany za allosteryczny oraz ważny punkt kontrolny cyklu Krebsa. Informacje o głównych efektorach IDH są w podręcznikach [2-6] zazwyczaj bezbłędne (aktywatory: ADP i Ca, inhibitory: ATP i NADH). Funkcjonujący obok IDH wieloenzymowy kompleks dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej (OGDHC) również eksploatuje mechanizm regulacji allosterycznej, będąc bardzo istotnym czynnikiem kontroli cyklu Krebsa. Jednak jakoś tak się złożyło, że informacje o efektorach OGDHC w podręcznikach biochemii są niepełne i niedokładne [2-6]. Być może dlatego, że zasadnicze dane o regulacji OGDHC uzyskano dopiero na przełomie lat 80-90., gdy zaczęła narastać lawina prac z zakresu genomiki i proteomiki, odwracając nieco uwagę od klasycznej enzymologii. W każdym bądź razie w kwestii regulacji OGDHC w podręcznikach najczęściej się pisze, że hamują go jedynie

produkty reakcji, sukcyńlo-CoA i NADH [2,3,6]. Natomiast notorycznie pomijana jest pierwszoplanowa rola nukleotydów adenylanowych oraz jonów Ca^{2+} . Opublikowany w 2011 r. w Postęпах Biochemii artykuł przeglądowy na ten temat prezentuje zweryfikowaną przez wielu badaczy wiedzę o regulacji OGDHC [7]. Jest w nim trochę szczegółów ciekawych dla enzymologów. Ale w kontekście dydaktycznym dobrze by się stało, gdyby do podręczników biochemii oraz świadomości nauczycieli trafiła najbardziej podstawowa informacja o kontroli aktywności OGDHC człowieka i zwierząt. Mianowicie, że ADP i Pi są silnymi aktywatorami allosterycznymi OGDHC, wielokrotnie zwiększającymi jego powinowactwo do substratu. Podobne działanie wykazują jony Ca^{2+} w małych stężeniach. Ponadto inhibitorami są sukcyńlo-CoA oraz NADH, ale o tych produktach hamujących OGDHC na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego, wzmianki w podręcznikach zawsze są obecne [2-6]. Podobnie do regulacji IDH aktywność OGDHC jest bardzo skutecznie kontrolowana w pierwszej kolejności przez stopień ufosforylowania nukleotydów adenylanowych, czyli tzw. potencjał fosforylacyjny: $[ATP] / [ADP] [P_i]$. Tak więc, OGDHC powinien być traktowany jako jedno z kluczowych ogniw wpływu na bioenergetykę poprzez funkcjonowanie cyklu Krebsa. Nieco zaskakuje fakt, że dwa główne punkty kontrolne (IDH i OGDHC) w 10-etapowym cyklu Krebsa są ulokowane obok siebie i regulowane w podobny sposób. W tym tandemie enzymem limitującym przebieg cyklu Krebsa jest raczej OGDHC. Świadczą o tym wyniki badań Cooney *et al.* [8] oraz to, że stężenie 2-oksoglutaranu w tkankach zwierząt jest znacznie większe niż izocytrynianu [9], czyli przepływ tych substratów jest ograniczony aktywnością OGDHC.

W kwestii regulacyjnych możliwości innych enzymów cyklu Krebsa można powiedzieć, że są one nieduże. W przypadku organizmów wyższych dla żadnego innego enzymu cyklu Krebsa, oprócz IDH i OGDHC, nie ma przekonujących dowodów realizacji mechanizmu allosterycznego. Owszem, produkty reakcji szeregu enzymów cyklu mogą w jakiejś mie-

rze hamować ich aktywność, ale jest to inhibicja na poziomie centrów aktywnych, czyli izosteryczna, która ma ograniczoną efektywność. W większości podręczników [2-6] został wymieniony jako allosteryczny i ważny w kontroli cyklu Krebsa enzym - syntaza cytrynianowa. Rzeczywiście, u niektórych mikroorganizmów, mianowicie *E. coli*, tak jest [10]. Natomiast w przypadku zwierząt nie ma podstaw zaliczać syntazy cytrynianowej do grona enzymów allosterycznych oraz ważnych czynników regulacyjnych cyklu Krebsa. Już we wcześniejszych badaniach w latach 60. zostało stwierdzone, że wszystkie nukleotydy adenylanowe (ATP, ADP, AMP) wykazują jednokierunkowe działanie - hamujące, które realizuje się na poziomie centrów aktywnych i jest dość słabe [11]. Chociaż ATP jest nieco efektywniejszym inhibitorem niż ADP i AMP, ale wysoka wartość K_i przeszkadza uznać go za istotny regulator. Podobnie jest z cytrynianem, NADH oraz sukcyńlo-CoA [12], które zaś w przypadku syntazy cytrynianowej mikroorganizmów są skutecznymi regulatorami allosterycznymi [10]. Należy zaznaczyć, że w ostatnim polskim wydaniu popularnego amerykańskiego podręcznika biochemii rola syntazy cytrynianowej w regulacji cyklu Krebsa została przedstawiona właściwie: istotna u mikroorganizmów, lecz mało istotna u ssaków [13]. W innych podręcznikach nie jest to niestety rozróżniane.

Jak wiadomo, z funkcjonowaniem cyklu Krebsa ściśle jest powiązana oksydacyjna dekarboksylacja pirogronianu, dostarczająca acetylo-CoA. Katalizuje ten proces wieloenzymowy kompleks dehydrogenazy pirogronianowej. Warto podkreślić, że jego wielostronna kontrola jest opisana w podręcznikach szczegółowo i całkiem poprawnie. Zresztą, na temat regulacji dehydrogenazy pirogronianowej można znaleźć też artykuły przeglądowe w polskich periodykach [14, 15].

Chciałoby się mieć nadzieję, że moje spostrzeżenia zostaną zauważone przez autorów podręczników oraz nauczycieli akademickich i przyczynią się do bardziej dokładnego przedstawiania i wykładania podstaw regulacji cyklu Krebsa. Kilka lat temu podjąłem też próbę zwrócenia uwa-

gi za granicą na niedocenianą rolę OGDHC, publikując artykuł pod dość wymownym tytułem „Often ignored facts about the control of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex” [16]. Czas pokaże, czy te dwie skromne publikacje są w stanie cokolwiek zmienić w tej kwestii.

Z poważaniem,

Sławomir Strumiło, prof.

Zakład Cytobiochemii

Instytut Biologii Uniwersytetu w

Białymstoku,

ul. Świerkowa 20 B, 15-950 Białystok

e-mail: sstrum@uwb.edu.pl

Białystok, 16 czerwca 2011 roku

PIŚMIENNICTWO

1. Chen RF, Plaut GW (1963) Activation and inhibition of DPN-linked isocitrate dehydrogenase of heart by certain nucleotides. *Biochemistry* 2: 1023-1032
2. Nelson DL, Cox MM (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*, Edition by Freeman and Company, New York
3. Hames D, Hooper N (2010) *Krótkie wykłady Biochemia*, Wydawnictwo PWN, Warszawa
4. Bańkowski E (2009) *Biochemia*, Wydawnictwo Elsevier Urban & Partner, Wrocław
5. Harvey RA, Ferrier DF (2011) *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*, Edition by Kluwer, New York
6. Campbell MK, Farrell SO (2003) *Biochemistry*, Edition by Thomson Learning, New York
7. Tylicki A, Bunik V, Strumiło S (2011) Kompleks dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej i jego wieloplazmacyjna regulacja. *Postepy Biochem* 57: 304-313
8. Cooney GJ, Taegtmeyer H, Newsholm EA (1981) Tricarboxylic acid cycle flux and enzyme activities in the isolated working rat heart. *Biochem J* 200: 701-703
9. Veech RL, Cook GA, King MT (1980) Relationship of free cytoplasmic pyrophosphate to liver glucose content and total pyrophosphate to cytoplasmic phosphorylation potential. *FEBS Lett* 117: K65-K72
10. Donald LJ, Crane BR, Anderson DH, Duckworth HW (1991) The role of cysteine 206 in allosteric inhibition of *Escherichia coli* citrate synthase. *J Biol Chem* 266: 20709-20713
11. Shepherd D, Garland PB (1969) The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J* 114: 597-610
12. Smith CM, Williamson JR (1971) Inhibition of citrate synthase by succinyl-CoA and other metabolites. *FEBS Lett* 18: 35-38.
13. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2009) *Biochemia*, Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa
14. Wałajtyś-Rode EI (1982) Regulacja kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w tkankach zwierzęcych. *Postepy Biochem* 28: 279-300
15. Strumiło S (2005) Short-term regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Acta Biochim Polon* 52: 759-764
16. Strumiło S (2005) Often ignored facts about the control of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem Mol Biol Education* 33: 284-287

P.S.

Wypuklająca problem ciekawostka... Ukazało się 4. wydanie „Biochemistry” (2011) autorstwa D. Voet'a, redaktora czasopisma BAMBED, który w 2005 r. recenzował mój artykuł o OGDHC, zgadzając się z jego treścią. Tym nie mniej, w w/w podręczniku (s. 816) nadal brak informacji o najważniejszych efektorach OGDHC.

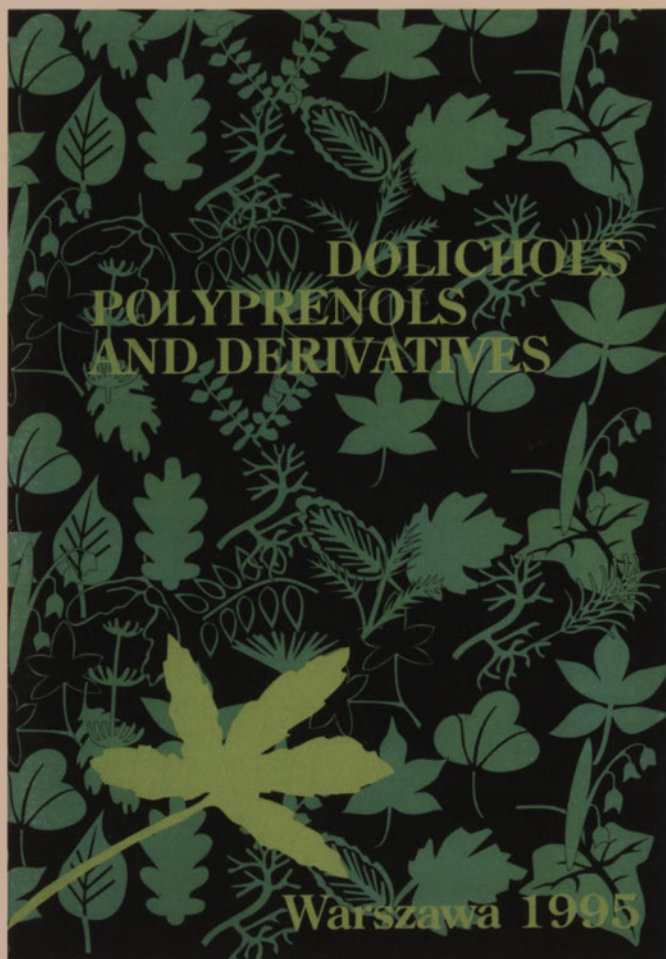
NIE BAĆ SIĘ RYNKU BIOCHEMIKALII W KOŃCU TROCHĘ SIĘ NA TYM ZNAMY KOLEKCJA POLIPRENOLI W INSTYTUCIE BIOCHEMII I BIOFIZYKI PAN PO PONAD 30 LATACH

Szanowny Panie Redaktorze

W latach 70. ubiegłego wieku powstało kilka naszych publikacji, w których nieodzowne dla publikowania nowe spojrzenie na problem funkcji biologicznej lipidów uzyskano dzięki opracowaniu nowych metod i materiałów. Dzięki wykorzystaniu tych elementów znacząca kwota wpływa na nasze subkonto w IBB każdego roku od odbiorców naszych unikalnych biochemikalii. Posiadane preparaty wywodzące się z naszych własnych prac warunkują postęp badań innych zbliżonych grup tematycznych i w ten sposób wytwarzają własną, niepodważalną dobrą pozycję także poprzez współautorstwo publikacji zespołów korzystających z naszych metod i materiałów nie tylko poprzez cytowania naszych prac.

Kilka lat temu w amerykańskim periodyku *Journal of Biological Chemistry* ukazała się publikacja (Bentinger et al. 283,14645, 2008), której współautorami są pracownicy Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Dzielimy wraz z zespołem sztokholmskim współautorstwo tej pracy, która zawiera dobrą wiadomość - możliwość korzystnego wzmaganie wytwarzania bardzo potrzebnego organizmowi człowieka koenzymu Q przy jednoczesnym zmniejszeniu powstawania cholesterolu.. Trzeba podkreślić, że dzielimy z grupą szwedzką zainteresowanie lipidami izoprenoidowymi, o których mowa w tytule publikacji. Po naszej stronie zainteresowanie tą grupą związków trwa już ponad 40 lat. Od około 30-u lat towarzyszy nam bliska współpraca z grupą profesora Dallnera z Karolinska i

Uniwersytetu w Sztokholmie. Szwedi są ukierunkowani na biologię medyczną. Po naszej stronie też jedna osoba z zespołu ma dyplom lekarza. To „skrzywienie” lekarskie wcale nie prowadziło do jednostronnego ukierunkowania w naszych działaniach w nauce. Przeciwnie, medycyna zawsze stosowała szerokość obserwacji aż do pogranicza ze sztuką. No i jesteśmy głęboko zakorzenieni w biologii porównawczej, która każe wybiegać poza organizmy modelowe i każe pamiętać, że różnorodność jest jedną z podstawowych cech świata żywego. Tu jest miejsce by przypomnieć także o promowaniu biochemii porównawczej przez Józefa Hellera, twórcę naszego Instytutu, też lekarza, zajmującego się biochemią owadów, co dało w IBB PAN początek oryginalnym badaniom nad biosyntezą białka, nad



składowymi kwasów nukleinowych, nad ubichinonem i rolą fosforanów. To było pod koniec lat 1950-ych. Nie stosowano wówczas oceny numerycznej; trzeba było oceniać wartość naukową bez niej. Ale czy to oznaczało, że subiektywnie, że błędnie? Atrakcyjność tytułu tej naszej publikacji i jej zawartość są tym, co obecnie nadaje jej stosunkowo wysoką ocenę, nie tylko w systemie punktowania opartym o wartość IF. A potem może dojdzie i dobra wartość SCI. Ale znam publikacje, o których się już nie pamięta mimo dobrych punktowych legitymacji. Spróbujmy patrzeć na tę publikację bez liczb, spróbujmy widzieć bez pomocy liczb znaczenie tej publikacji dla poznania nowych elementów determinujących patofizjologię człowieka oraz zobaczyć ją w procesie powstawania. Spróbujmy zobaczyć jak kształtowała się tematyka tych badań, bo zwykle żadna publikacja nie powstaje na pustyni.

Gdy przed 40-u laty rozpoczynaliśmy w IBB PAN w Pracowni Fosfolipidów nasze badania nad wymie-

nionymi w tytule izoprenoidami, do cholesterolu, ubichinonu i tokotrienoli było nam daleko. W drugiej połowie lat 1950-ych poszukiwaliśmy punktu zaczepienia dla badań nad biologiczną rolą lipidów. Tradycyjne tematyki dotyczące lipidów powstających z jednostek dwuwęglowych nie spełniały oczekiwań. Z jednej strony założenia prof. Hellera przewidywały dla nowopowstającej placówki tematykę lipidową, a z drugiej natrafiały na grunt dziewiczy, nie obciążony znajomością ówczesnej „lipidologii”.

Gdy w tygodniku Science ukazała się praca Robbinsa o lipidowych koenzymach zbudowanych z oligomerów izoprenowych stanowiło to oczekiwaną *novum* i ważną niszę, którą zdecydowaliśmy wykorzystać. Taka nisza oznacza w praktyce brak w katalogach specjalnych biochemikalii i specjalnych podejść metodycznych oraz brak pełniejszego rozpoznania nowego obszaru badań ale za to stwarza możliwość samodzielnego opanowania tego nowego, nieznanego obszaru. Trzeba wówczas stwarzać własne podejścia metodyczne i zaplecze materiałowe. Tak było w przypadku robbinsowskich liniowych polimerów jednostek pięciowęglowych o masie około 1000 daltonów. Rozwijane na potrzeby badań nad tradycyjnymi lipidami (kwasy tłuszczowe) metody chromatografii gazowej nie obejmowały tego zakresu mas molekularnych, a technika spektrometrii mas (np. w przyrządach LKB z lat 1960-ych) z trudem pozwalała widzieć masy powyżej 500 daltonów. Niezbędna dla poruszania się w nowym obszarze badań wysokosprawna chromatografia cieczowa notowała dopiero swe początki, a kowalencyjnie związane

fazy do takiej chromatografii, a także do chromatografii cienkowarstwowej, nie były powszechnie znane. Gdy zamierzaliśmy badać rolę lipidowych koenzymów izoprenoidowych, potrzebny do tego celu undekaprenol był izolowany z liści figusa rosnącego w Banku Rotunda w Warszawie (pp A i W. Jankowscy). Już wówczas widać było, że nie każdy egzemplarz *Ficus elastica* jest źródłem undekaprenolu (liście młodych pędów z Ogrodu Łazienkowskiego nie nadawały się do preparatyki). Nie wypadało nam prosić Autora publikacji z Anglii o kilka miligramów standardu do naszych prac nad wpływem faga lizogenego na biosyntezę O-antygeny u *Shigella flexnerii*, której hodowle prowadziła nam z wielkim oddaniem niezapomniana dr Ewa Janczura a patronował mój kierownik – profesor Tadeusz Korzybski (też lekarz). Izolacje i identyfikacje potrzebnego nam undekaprenolu przeprowadziliśmy z nowo przyjętym mgr Wiesławem Jankowskim i zaprzyjaźnionymi L.D. Bergelsonem i W.A. Wawerem z moskiewskiego Instytutu Związków Naturalnych.

Bogatsi o to doświadczenie pozyskiwaliśmy potem szereg innych poliprenoli z liści wielu gatunków roślin pochodzących z krajowych arboretów, a także z dalekich, egzotycznych fitoregionów Azji i Ameryki Południowej. Powstała w ten sposób na podstawie badań kilku tysięcy gatunków niepisana, oryginalna chemotaksonomia roślin oparta o naszą „prenologię”. Po naszych pierwszych publikacjach o roli koenzymów lipidowych (dolicholi i poliprenoli) doszło do zainicjowania komercjalizacji naszych lipidów izoprenoidowych. Najpierw dr W. Jankowski zapakował kilkadziesiąt 5-o miligramowych porcji jako próbki bezpłatne naszego unikalnego preparatu dolicholu-11, które pani Maria Knapik z Przedsiębiorstwa Odczynników Chemicznych Gliwice rozesała do wskazanych przez nas potencjalnych odbiorców. Odzew był znaczny; POCh określiło naszą akcję i jej wyniki jako wzorcowe. Potem ponad 20 naszych preparatów umieszczono w katalogach Calbiochem i Sigma, a od połowy lat 1980-ych produkcją undekaprenylofosforanu zainteresowano Dom Han-

dlowy Nauki PAN, który zatrudnił w celu prowadzenia produkcji i marketingu pracownika (absolwentkę Wydziału Chemii UW, która obecnie jest kierownikiem Zakładu Biochemii Lipidów w IBB PAN). Nie znam dokładnie dochodów jakie z naszej działalności uzyskiwał IBB i DHN. W tym czasie były próby bardziej racjonalnego uzasadniania ceny naszych preparatów dla pani Ewy Kańskiej – księgowej w IBB PAN. Okazało się to niemożliwe; kapitał materiałowy owszem, dał się ustalić, ale wartość inwencji i nasze działania oszczędnościowe były nie do sprecyzowania. Zostaliśmy do chwili obecnej przy cenach „wziętych z sufitu” zasugerowanych przez od lat pracującą z nami panią Józefinę Hertel: zawsze powyżej 300 USD za 5 miligramów.

Od początku naszej naukowo-komercyjnej działalności towarzyszyła nam nazwa „Kolekcja poliprenoli”. Już w latach 80. ubiegłego stulecia użyliśmy jej w pierwszym naszym katalogu wydanym w 400 egzemplarzach. Po 10-u latach następny nasz katalog obejmujący ponad sto pozycji dolicholi, poliprenoli i ich pochodnych miał 1500 egzemplarzy. Tak to dokumentowaliśmy, nie tylko w publikacjach naukowych, poszerzanie naszej wiedzy o poliprenolach, ale stawaliśmy się także ośrodkiem referencyjnym dla tej grupy związków. Na okładkach widniały albo *Sorbus suecica* albo *Potentilla aurea*, nasze najciekawsze gatunki roślin bogate w poliprenole o szczególnie długim łańcuchu. Ponieważ w tamtych czasach zaistniały nasze urzędowe kontakty z Wydziałem Nauk Biologicznych PAN sympatyczne panie urzędniczki ekspediujące pocztę z Prezydium Akademii rozsyłały nasze katalogi po kilka sztuk dziennie przez cały rok i nasz Instytut zaoszczędził w ten sposób kilka tysięcy złotych. Tę życzliwość z ich strony przyjmowaliśmy jako prawdziwą aprobatę społeczną.

Przy innych okazjach słyszało się, uczestnicząc w różnych gremiach, że w wypadku gdy placówka naukowa uzyskuje korzyści finansowe z komercjalizacji swych badań powinno się obniżyć jej finansowanie o kwotę uzyskiwaną na przykład ze sprzedaży opracowanych preparatów. Na

szczęście dyrektor naszego Instytutu prof. W. Zagórski nie był tego zdania i za zachętą z jego strony oraz aprobatą naszej współpracy z szwedzką firmą Larodan mogliśmy podtrzymać działalność naszej „Kolekcji” w IBB PAN. Ta działalność mogła dawać bezpośrednie finansowe korzyści Instytutowi oraz możliwość współpracy z znaczącymi zagranicznymi partnerami zainteresowanymi preparatami „Kolekcji Poliprenoli” jak to miało miejsce w wypadku publikacji o epoksydach poliizoprenoidów. „Kolekcja” nie dała nam znaczącej satysfakcji i korzyści z patentowania dwu własnych wyników badań. Poza jednym przypadkiem przy naszych zgłoszeniach patentowych nie zetknęliśmy się niestety z radą i pomocą kompetentnego fachowca. Osoby i organizacje przewidziane do pełnienia w Polsce takiej funkcji nie umieją tej luki wypełniać. Są to sprawy, których musieliśmy nauczyć się sami. Ale i bez tego możemy mieć satysfakcję z próby samodzielnego opanowania niszy w nauce i wypełnienia treścią popularnych haseł „innowacja” czy „inicjatywa”.

Wchodzenie na mniej restrykcyjny rynek biochemikaliów ograniczany zastrzeżeniem „tylko do użytku laboratoryjnego” okazało się stosunkowo łatwe i zachęcające. Warto przypomnieć mało znany fakt, że uniwersytecka lwowska pracownia Profesora Parnasa nie kryła swej działalności marketingowej w zakresie nukleotydów adeninowych w latach 1930-ych rozwijanej dzięki priorytetowi jaki Parnas z Korzybskim zdobyli w badaniach nad tymi związkami i glikolizą.

Co dalej? Oczywiście działalność podobna do prowadzonej w naszej „Kolekcji Poliprenoli” nie

będzie mogła zastąpić bardziej ambitnych zamierzeń, wchodzenia na ważne rynki gospodarcze, w tym farmakomedycyny, ani zastąpić w nauce poważnych badań podstawowych. Ostatnie lata przyniosły w naszym Zakładzie Biochemii Lipidów, kierowanym przez prof. Ewę Świeżewską nowe możliwości kierunkowania inicjatywy „Kolekcji” dzięki nowym tematycznym izoprenoidowym, rozwijanym w Zakładzie, biologii molekularnej, poznawaniu alternatywnego szlaku biosyntezy izoprenoidów oraz badań nad nienaturalnymi, kationowymi izoprenoidami. Te nowe obszary też zawierają nisze (bo nisze są wszędzie) i stara nazwa „Kolekcji Poliprenoli”, jej doświadczenia i organizacja mogą okazać się użyteczne i zachęcające.

Z wyrazami szacunku

Profesor Tadeusz Chojnacki
Instytut Biochemii i Biofizyki
PAN w Warszawie

e-mail: tc@ibb.waw.pl lub tjch@gazeta.pl

Warszawa, 5 października 2011 roku

DOLICHOLS POLYPRENOLS and DERIVATIVES



WARSZAWA FEBRUARY 1984

Katarzyna Marciniak[✉]

Jacek Kęsy

Andrzej Tretyn

Jan Kopcewicz

Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

[✉]Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; tel.: (56) 611 45 90, e-mail: kasia_swiniarska@o2.pl

Artykuł otrzymano 14 lipca 2011 r.

Artykuł zaakceptowano 18 sierpnia 2011 r.

Słowa kluczowe: fitohormony, gibereliny, struktura GA, biosynteza GA, katabolizm GA

Wykaz skrótów: CDP-ME – 4-difosfocytydylo-2-metylerytrol; CDP-MEP – 2-fosforan 4-difosfocytydylo-2-metylerytrolu; CPP (ang. *ent-copalyl pyrophosphate*) – pirofosforan *ent*-kopalilu; DMAPP (ang. *dimethylallyl diphosphate*) – pirofosforan dimetyloallilu; DXP (ang. *1-deoxyxylulose 5-phosphate*) – 5-fosforan 1-deoksyksylulozy; FPP (ang. *farnesyl pyrophosphate*) – pirofosforan farnezyli; GA (ang. *gibberellins*) – gibereliny; GA20ox (ang. *gibberellin 20-oxidases*) – 20-oksydazy giberelinowe; GA3ox (ang. *gibberellin 3-oxidases*) – 3-oksydazy giberelinowe; GA2ox (ang. *gibberellin 2-oxidases*) – 2-oksydazy giberelinowe; GGPP (ang. *geranylgeranyl pyrophosphate*) – pirofosforan geranylogeranyli; G3P (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate*) – aldehyd 3-fosfoglicerynowy; GPP (ang. *geranyl pyrophosphate*) – pirofosforan geranyli; HMBPP (ang. *hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate*) – 4-pirofosforan hydroksymetylbutenyli; IPP (ang. *isopentenyl pyrophosphate*) – pirofosforan izopentenyli; ME-cPP (ang. *ME 2,4-cyclodiphosphate*) – 2,4-cyklodifosforan metylerytrolu; MEP (ang. *2-methylerythritol 4-phosphate*) – 4-fosforan 2-metylerytrolu; MVA (ang. *mevalonic acid*) – kwas mewalonowy

Podziękowanie: Praca powstała w trakcie realizacji projektów badawczych MNiSW NN303811240 i NN303333436.

STRESZCZENIE

Gibereliny (GA), jako jedne z podstawowych fitohormonów, kontrolują tak ważne procesy wzrostu i rozwoju roślin jak kiełkowanie nasion, wydłużanie łodyg i indukcję kwitnienia. Pomimo zidentyfikowania ponad stu trzydziestu różnych GA, zaledwie kilka wykazuje aktywność biologiczną, natomiast pozostałe są ich prekursorami lub produktami katabolizmu. W ciągu ostatnich kilkunastu lat, dzięki użyciu biochemicznych i genetycznych technik badawczych poznano większość genów kodujących białka związane z biosyntezą i dezaktywacją GA, co pozwoliło na lepsze zrozumienie funkcjonowania tych hormonów u roślin. Większość enzymów zaangażowanych w metabolizm GA wykazuje wielofunkcyjność, dlatego mniejsza ich liczba, niż zakładano na początku, potrzebna jest do tworzenia takich struktur GA, które biorą czynny udział w kontroli wielu procesów fizjologicznych. Głównym celem niniejszej pracy jest podsumowanie obecnego stanu wiedzy na temat biosyntezy i dezaktywacji GA, w tym przedstawienie szczegółowej charakterystyki genów i enzymów zaangażowanych w te procesy.

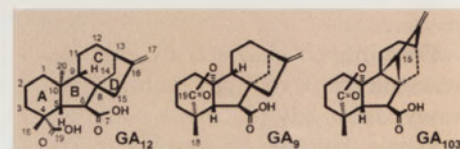
WPROWADZENIE

Spośród siedmiu klas fitohormonów, GA zajmują kluczową pozycję w regulacji wzrostu i rozwoju roślin. W cyklu życiowym każdej rośliny cały ciąg procesów, poczynając od kiełkowania nasion i wzrostu wydłużeniowego hypokotyli oraz międzywęźli, poprzez rozrost liści i indukcję kwitnienia, a kończąc na rozwoju kwiatów i dojrzewaniu owoców, regulowany jest przez GA. Zgodnie z definicją hormonu, cząsteczki GA są naturalnymi substancjami organicznymi charakteryzującymi się aktywnością w bardzo małych stężeniach rzędu 10⁻⁶ mol/l, powszechnością występowania oraz zdolnością do przemieszczania w roślinie [1-3]. Początki badań nad strukturą, biosyntezą i dezaktywacją GA oraz odbiorem i przekazywaniem sygnału giberelinowego miały miejsce już w połowie ubiegłego stulecia, jednak dopiero znaczny rozwój technik stosowanych w biochemii, genetyce i biologii molekularnej, przyczynił się do wnikliwego opisu funkcjonowania tych fitohormonów. Punktem wyjścia do podjęcia badań na poziomie molekularnym było poznanie poszczególnych genów i kodowanych przez nie enzymów zaangażowanych w szlaki biosyntezy i dezaktywacji GA zarówno u roślin, grzybów, jak i bakterii. W ostatnich latach w piśmiennictwie światowym opublikowano kilka prac przeglądowych podsumowujących osiągnięcia w tej dziedzinie [4-9]. Do chwili obecnej zagadnienia te nie zostały jednak szczegółowo omówione w polskich czasopismach naukowych, dlatego w niniejszej pracy opisano metabolizm GA u roślin zarówno na poziomie biochemicznym, jak i molekularnym, kładąc szczególny nacisk na charakterystykę poszczególnych genów i enzymów.

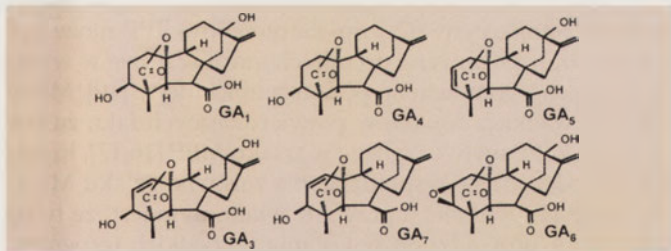
STRUKTURA GA

Wszystkie GA oznaczone są numerami („giberelina A numer”), które zostały im nadane w porządku chronologicznym w zależności od czasu identyfikacji (http://www.plant-hormones.info/gibberellin_nomenclature.htm). W chwili obecnej znanych jest 136 w pełni scharakteryzowanych cząsteczek (GA₁-GA₁₃₆). 128 z nich zostało zidentyfikowanych u różnych gatunków roślin naczyniowych, natomiast pozostałych osiem u bakterii i grzybów (<http://www.plant-hormones.info/ga1info.htm>).

GA to tetracykliczne, diterpenoidowe kwasy karboksylowe, których struktura bazuje na szkielecie węglowym *ent*-giberelanu. Wyróżniamy GA o rdzeniu zbudowanym z dziewiętnastu (C₁₉-GA) i dwudziestu (C₂₀-GA) atomów węgla (Ryc. 1). C₂₀-GA posiadają przy czwartym atomie wę-



Ryc. 1. Struktura giberelin o szkielecie 20- (GA₁₂) i 19-węglowym (GA₃ i GA₁₀₃). Przy GA₁₂ cyframi od 1 do 20 oznaczono poszczególne atomy węgla, natomiast literami od A do D oznaczono poszczególne pierścienie w cząsteczce GA. Szczegóły w tekście.

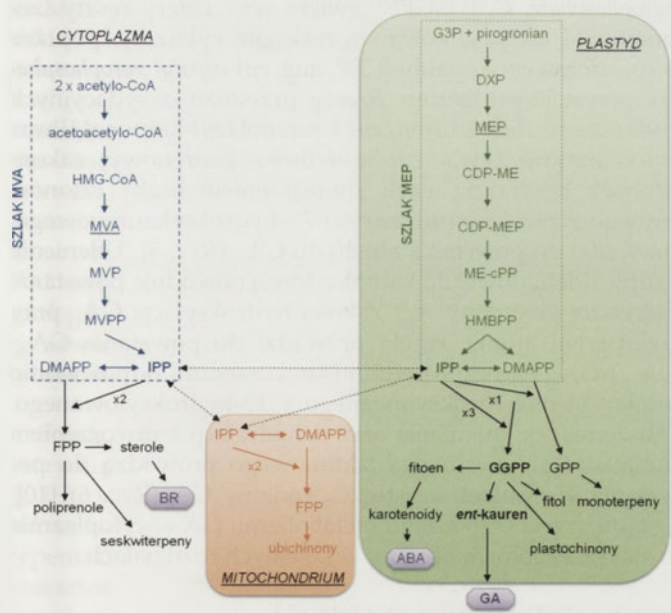


Rycina 2. Wzory strukturalne bioaktywnych GA. Szczegóły w tekście.

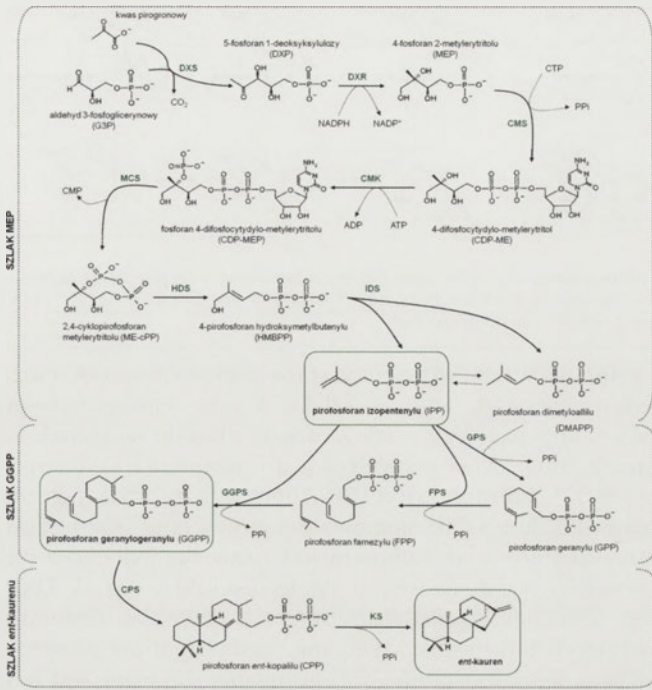
gła grupę karboksylową, natomiast w przypadku C₁₉-GA pomiędzy czwartym i dziesiątym atomem węgla zawsze powstaje wiązanie laktonowe, a czasami pomiędzy dziesiątym i piętnastym atomem węgla tworzy się również dodatkowy pierścień cyklopropanowy. Zarówno pozycja, jak i stereochemia wszystkich wymienionych podstawników jest niezwykle istotna ponieważ wpływa na aktywność biologiczną poszczególnych cząsteczek hormonu [10].

Pomimo dużej liczby cząsteczek GA, tylko kilka, GA₁, GA₃, GA₄ i GA₇, wykazuje aktywność biologiczną i bierze czynny udział w regulacji procesów fizjologicznych (Ryc. 2). Pozostałe występują w tkankach jako ich prekursorzy lub dezaktywowane metabolity. Aktywne cząsteczki C₁₉-GA charakteryzują się tym, że posiadają grupę 3β-hydroksylową przy trzecim atomie węgla, grupę karboksylową przy szóstym atomie węgla oraz wspomniany wcześniej lakton pomiędzy czwartym i dziesiątym atomem węgla. Grupa 3β-hydroksylowa może być w niektórych przypadkach przesunięta pomiędzy drugi i trzeci atom węgla tworząc podwójne wiązanie, tak jak ma to miejsce w cząsteczkach GA₅ i GA₆. W związku z tym wymienione GA mogą również funkcjonować jako bioaktywne cząsteczki [7,10].

Do niedawna przyjmowano, że dominującą gibereliną u roślin jest GA₁. Zostało to potwierdzone m. in. u kukurydzy (*Zea mays*), grochu (*Pisum sativum*) i u 84 innych gatunków.



Rycina 3. Szlaki syntezy izoprenoidów i ich rozmieszczenie w komórce roślinnej. GA – gibereliny, BR – brasinosteroidy, ABA – kwas abscysynowy. Szczegóły, w tym pozostałe nazwy związków, w tekście. Na podstawie [15], zmodyfikowane.



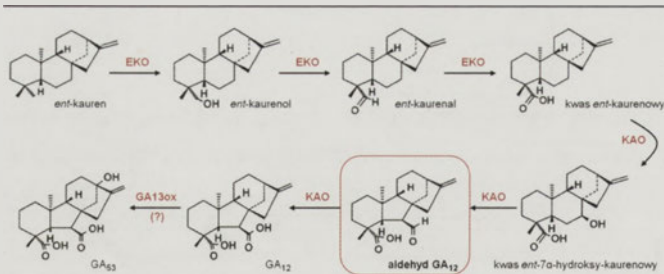
Rycina 4. Pierwszy etap biosyntezy GA w plastydach prowadzący do powstania ent-kaurenu. Szczegóły w tekście. Pełne nazwy enzymów przedstawiono w tabeli 1. Na podstawie [10], zmodyfikowane.

Obecnie wiadomo, że u modelowej rośliny dnia długiego, rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*), oraz wielu roślin z rodziny dyniowatych (*Cucurbitaceae*) istotną rolę odgrywa również GA₄. Różnica w budowie pomiędzy tymi dwiema GA polega na obecności (GA₄) lub braku (GA₁) grupy hydroksylowej przy trzynastym atomie węgla dołączanej przy udziale domniemanej 13-oksydazy giberelinowej (GA13ox), której identyfikacja umożliwiłaby wyjaśnienie potencjalnej różnicy w ich funkcjonowaniu [10]. Zidentyfikowanie u ryżu rozpuszczalnego receptora giberelin *GID1* (ang. *gibberellin insensitive dwarf 1*) [11] oraz jego homologów u rzodkiewnika [12] uzmysłowilo wielu badaczom, że różnice występujące pomiędzy w/w aktywnymi GA mogą wynikać z ich odmiennego powinowactwa do receptora, jak i zdolności do tworzenia kompleksu pomiędzy GA, *GID1* i białkami *DELLA*, będącymi głównymi represorami w szlaku przekazywania sygnału giberelinowego [10,13]. Inna bioaktywna giberelina A₃, zwana kwasem giberelowym, została zidentyfikowana u 45 gatunków roślin, ale uważana jest za główną GA występującą u grzybów (m. in. u *Gibberella fujikuroi*), skąd jest zresztą pozyskiwana w celach komercyjnych [6].

BIOSYNTETA GA U ROŚLIN

Ze względu na wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie enzymów katalizujących kolejne reakcje, szlak biosyntezy GA możemy podzielić na 3 etapy: biosynteza ent-kaurenu w plastydach (Ryc. 4), powstanie aldehydu GA₁₂ w siateczce śródplazmatycznej (ER) (Ryc. 5) oraz synteza C₁₉-GA i C₂₀-GA w cytosolu (Ryc. 6) [14], które szczegółowo opisano dalej.

Przez długi czas uważano, że pirofosforan izopentenu (IPP, ang. *isopentenyl pyrophosphate*), jeden ze związków

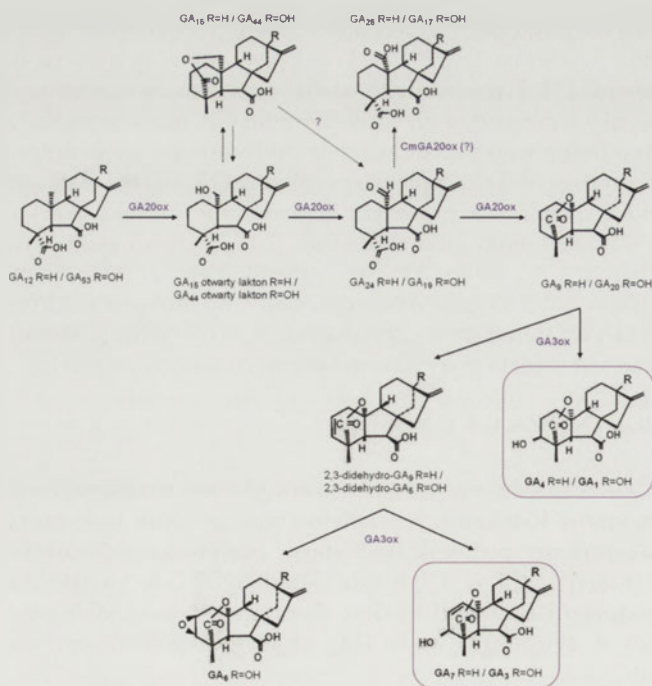


Rycina 5. Drugi etap biosyntezy GA w ER prowadzący do powstania aldehydu GA_{12} . Szczegóły w tekście. Pełne nazwy enzymów przedstawiono w tabeli 1. Na podstawie [10], zmodyfikowane.

występujących na wczesnych etapach biosyntezy GA, może powstawać wyłącznie w szlaku kwasu mewalonowego (MVA, ang. *mevalonic acid*). Z czasem okazało się jednak, że istnieje inna droga prowadząca do powstania aktywnych cząsteczek hormonu (Ryc. 3). Alternatywny szlak posiada kilka określeń: szlak niemewalonianowy (ang. *non-mevalonate pathway*), szlak Rohmera (od nazwiska jednego z odkrywców), szlak fosforanu deoksyksylulozy (szlak DXP, ang. *deoxyxylulose phosphate pathway*), czy szlak fosforanu metyletrytolu (szlak MEP, ang. *methylerythritol phosphate pathway*), jednak ostatnie sformułowanie używane jest najczęściej [15]. Podczas gdy większość organizmów posiada albo szlak MVA (grzyby i zwierzęta), albo szlak MEP (większość bakterii właściwych i glonów), to rośliny i ich bezpośredni przodkowie *Charophyceae* (ramieniowe, glony należące do gromady zielenic), posiadają obydwa. Szlaki, o których mowa występują w różnych przedziałach komórkowych, przez co powstający IPP ma różne przeznaczenie. U roślin szlak MVA jest zlokalizowany w cytoplazmie, a powstający IPP jest przekształcany w seskwiterpeny (C_{15}) lub triterpeny (C_{30} , np. sterole). Z kolei szlak MEP jest zlokalizowany w plastydach, a powstający IPP przekształca się na

stępnie w monoterpeny (C_{10}), diterpeny (C_{20} , np. gibereliny, fitol) lub tetraterpeny (C_{40} , np. karotenoidy). IPP może być również transportowany do mitochondriów gdzie w wyniku dalszych jego przemian powstają ubiquinony [10]. Mimo istnienia ważkich dowodów potwierdzających fakt, że GA powstają z IPP wytworzonego w szlaku MEP [16,17], to jednak nie odrzuca się współdziałania zarówno szlaku MVA, jak i MEP [18]. Z kolei u grzybów wiadomym jest, że tylko szlak MVA prowadzi do powstania wszystkich terpenów, włącznie z GA [9].

Szlak MEP rozpoczyna się od połączenia jednostki dwuwęglowej (CH_3CO-), powstającej w wyniku dekarboksylacji pirogronianu, z jednostką trzywęglową, aldehydem 3-fosfoglicerynowym (G3P, ang. *glyceraldehyde 3-phosphate*), dając pięciowęglowy związek 5-fosforan 1-deoksyksylulozy (DXP, ang. *1-deoxyxylulose 5-phosphate*) (Ryc. 4). DXP ulega redukcji i wewnętrznej rearanzacji w wyniku czego powstaje rozgałęziony 4-fosforan 2-metylerytritolu (MEP, ang. *2-methylerythritol 4-phosphate*), od którego bierze się nazwa całego szlaku. W trzech kolejnych etapach, przez 4-difosfocytydylo-2-metylerytritol (CDP-ME) i 2-fosforan 4-difosfocytydylo-2-metylerytritolu (CDP-MEP), MEP przekształcany jest w 2,4-cyklodifosforan metyletrytolu (ME-cPP, ang. *ME 2,4-cyclodiphosphate*). Pierścien występujący w ME-cPP ulega otwarciu w wyniku czego powstaje 4-pirofosforan hydroksymetylobutenylu (HMBPP, ang. *hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate*). Ostatecznie, HMBPP może być przekształcony w pirofosforan izopentenyłu (IPP) lub jego izomer, pirofosforan dimetyloallilu (DMAPP, ang. *dimethylallyl diphosphate*). Te dwa ostatnie związki mogą kondensować ze sobą, tworząc szereg połączeń o różnej liczbie jednostek pięciowęglowych. W wyniku połączenia jednej cząsteczki DMAPP z jedną cząsteczką IPP powstaje pirofosforan geranylu (GPP, ang. *geranyl pyrophosphate*, C_{10}), po przyłączeniu kolejnej cząsteczki IPP, pirofosforan farnezyli (FPP, ang. *farnesyl pyrophosphate*, C_{15}), a po przyłączeniu następnej cząsteczki IPP, pirofosforan geranylogeranylu (GGPP, ang. *geranylgeranyl pyrophosphate*, C_{20}). GGPP zawiera więc cztery reszty izoprenowe i ulegając kolejnym reakcjom cyklizacji, poprzez pirofosforan ent-kopalilu (CPP, ang. *ent-copalyl pyrophosphate*), powstaje ent-kauren. Szereg przemian oksydacyjnych ent-kaurenu (ent-kauren/ent-kaurenol/ent-kaurenal/kwas ent-kaurenowy/kwas ent-7α-hydroksykaurenowy) zakończonych kontrakcją, czyli zmniejszeniem liczby członów jednego z pierścieni kwasu ent-7α-hydroksykaurenowego, prowadzi do powstania aldehydu GA_{12} (Ryc. 5). Utlenienie grupy aldehydowej do karboksylowej powoduje powstanie pierwszej gibereliny A_{12} . Z kolei hydroksylacja GA_{12} przy trzynastym atomie węgla prowadzi do powstania GA_{53} . GA_{12} i GA_{53} są bezpośrednimi prekursorami odpowiednio szlaku 13-niehydroksylowanego i 13-hydroksylowanego. Dalsze reakcje utleniania oraz dehydratacji z utworzeniem dodatkowego pierścienia laktonowego prowadzą do powstania wszystkich cząsteczek rodziny GA (Ryc. 6) [10]. Ostatni, trzeci etap szlaku metabolizmu GA w cytoplazmie został szczegółowo opisany w kolejnych rozdziałach.



Rycina 6. Trzeci etap biosyntezy GA w cytosolu prowadzący do powstania aktywnych cząsteczek hormonu. Szczegóły w tekście. Pełne nazwy enzymów przedstawiono w tabeli 1. Na podstawie [10], zmodyfikowane.

GENY I ENZYMY BIOSYNTETY GA

Do chwili obecnej poznano większość genów i kodowanych przez nie białek zaangażowanych w syntezę GA

Tabela 1. Skróty i pełne nazwy enzymów związanych z biosyntezą GA.

Skrót	Pełna nazwa enzymu	
	polska	angielska
DXS	syntaza 5-fosforanu 1-deoksyksylulozy	1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase
DXR	reduktoizomeraza 5-fosforanu 1-deoksyksylulozy	1-deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase
CMS	syntaza 4-difosfocytydylo-metylerytritolu	4-diphosphocytidyl-methylerythritol synthase
CMK	kinaza 4-difosfocytydylo-metylerytritolu	4-diphosphocytidyl-methylerythritol kinase
MCS	syntaza 2,4-cyklopirofosforanu metylerytritolu	methylerythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase
HDS	syntaza 4-pirofosforanu hydroksymetylbutenylu	hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate synthase
IDS/DDS	syntaza pirofosforanu izopentenylu/dimetyloallilu	isopentenyl/dimethylallyl diphosphate synthase
GPS	syntaza pirofosforanu geranylu	geranyl diphosphate synthase
FPS	syntaza pirofosforanu farnezyłu	farnesyl diphosphate synthase
GGPS	syntaza pirofosforanu geranylogeranylu	geranylgeranyl diphosphate synthase
CPS	syntaza pirofosforanu <i>ent</i> -kopalilu	<i>ent</i> -copalyl diphosphate synthase
KS	syntaza <i>ent</i> -kaurenu	<i>ent</i> -kaurene synthase
EKO	19-oksydaza <i>ent</i> -kaurenu	<i>ent</i> -kaurene 19-oxidase
KAO	oksydaza kwasu <i>ent</i> -kaurenowego	<i>ent</i> -kaurenoic acid oxidase
GA13ox (?)	13-oksydaza giberelinowa	gibberellin 13-oxidase
GA20ox	20-oksydaza giberelinowa	gibberellin 20-oxidase
GA3ox	3-oksydaza giberelinowa	gibberellin 3-oxidase

u różnych gatunków roślin. Znaczna część enzymów wykazuje wielofunkcyjność, dlatego mniejsza ich liczba, niż zakładano na początku, potrzebna jest do tworzenia takich struktur GA, które biorą czynny udział w kontroli wielu procesów fizjologicznych. Ze względu na skomplikowane nazewnictwo enzymów, szczególnie tych biorących udział na wczesnych etapach syntezy GA, ich skróty i pełne nazwy przedstawiono w tabeli 1, a katalizowane przez nie reakcje na rycinie 4, 5 i 6.

SZLAK FOSFORANU METYLERYTRITOLU (SZLAK MEP)

Wszystkie geny oraz kodowane przez nie enzymy szlaku MEP po raz pierwszy zidentyfikowano u bakterii *Escherichia coli* [15]. W chwili obecnej ich ortologi w przypadku genów i homologów w przypadku białek znane są również u wielu organizmów eukariotycznych [19], w tym głównie u rzodkiewnika (baza danych AIR, ang. *Arabidopsis Information Resources*; <http://www.Arabidopsis.org>). Roślinne enzymy, o których mowa, kodowane są przez geny jądrowe i posiadają N-końcową, kierującą je do plastydów sekwencję, która wskazuje na docelowe miejsce ich funkcjonowania. Pod względem struktury są bardzo zbliżone do enzymów prokariotycznych, za wyjątkiem enzymu HDS (GCPE), który zawiera dużą domenę o nieznanym celu, specyficzną tylko dla roślin [20].

Szlak MEP prowadzi do wytworzenia IPP, a enzymem, który limituje powstanie tego związku jest syntaza DXP (DXS), kodowana u rzodkiewnika przez gen *CLA1* (ang. *chloroplasts altered 1*). Mutanty *cla1* charakteryzują się fenotypem albinotycznym, co spowodowane jest bardzo niską zawartością cząsteczek chlorofilu i karotenoidów. Pomimo wymienionych objawów siewki rzodkiewnika z mutacją *cla1* przeżywają ponieważ w ich genomie zidentyfikowano dodatkowo dwa inne homologów *CLA1* – *DXS2* i *DXS3*, których białkowe produkty w pewnym stopniu rekompensują

utracony gen. Rośliny z częściowym albinizmem mają ciekawie urozmaicony wygląd i często są uprawiane jako rośliny ozdobne. Inne enzymy szlaku MEP, np. DXR, CMS czy HDS kodowane są u rzodkiewnika przez pojedyncze geny, stąd mutanty *dxr*, *cms* i *hds* są w zupełności albinotyczne i nie mają szans przeżycia. Działanie enzymu DXR jest całkowicie hamowane przez pochodzącą z bakterii *Streptomyces fosmidomycynę*, przez co antybiotyk ten działa jak herbicyd [15,21].

Enzymy DXS i DXR zostały zidentyfikowane u wielu gatunków roślin, odpowiednio u 16 i 20, podczas gdy pozostałe enzymy szlaku MEP zaledwie u kilku gatunków. Pełne sekwencje reszt aminokwasowych enzymów HDS i HDR znane są jedynie u dwóch gatunków roślin, odpowiednio u tytoniu (*Nicotiana benthamiana*) i ryżu (*Oryza sativa Japonica*) oraz u tytoniu i rzodkiewnika. W przypadku białka CMS pełna sekwencja znana jest u rzodkiewnika, miłorzębu (*Ginkgo biloba*) i ryżu (*O. sativa Japonica* i *Indica*), w przypadku CMK u rzodkiewnika, pomidora (*Lycopersicon esculentum*), mięty (*Mentha x piperita*) i ryżu (*O. sativa Japonica*), natomiast w przypadku MCS u rzodkiewnika, miłorzębu, ryżu (*O. sativa Japonica* i *Indica*) oraz cisu (*Taxus x media*) [19].

SZLAK GGPP

Kolejne enzymy uczestniczące na etapie przekształcania IPP w GGPP, syntaza GPP (GPS), syntaza FPP (FPS) i syntaza GGPP (GGPS), zostały scharakteryzowane u bakterii, drożdży, owadów, ssaków i roślin. U rzodkiewnika zidentyfikowano pięć aktywnych izoenzymów GGPS (GGPS1-4, GGPS6) kodowanych przez małą rodzinę jądrowych genów. Istnieje także dodatkowy enzym GGR, który początkowo zaliczono do syntaz GGPP, jednak wnikliwa analiza zachowanych w ewolucji domen ujawniła znaczące różnice, które nie pozwoliły przypisać GGR do tej rodziny białek. Z uwagi na fakt, iż IPP może być syntetyzowany w różnych

przedziałach komórkowych, wymienione enzymy zlokalizowano m. in. w chloroplastach (GGPS1, GGPS3) gdzie występują najliczniej, w wakuoli (GGPS2) i ER (GGPS4) oraz w mitochondriach (GGPS6). Należy zaznaczyć, że reakcje zachodzące na wczesnych etapach metabolizmu GA przeprowadzają jedynie te enzymy, które posiadają sekwencję kierującą je do plastydów. W odróżnieniu od GGPS, syntazy FPP najliczniej występują w ER i cytosolu. U rzodkiewnika potwierdzono obecność dwóch aktywnych izoform syntaz FPP - FPS1 i FPS2, które wykazują względem siebie bardzo wysokie podobieństwo sekwencji aminokwasowych (90,6%). Z kolei syntazy GPP występują najliczniej w cytosolu lub plastydach. Przyjmuje się, że istnieją dwie izoformy GPS, które posiadają lub nie sygnał lokalizacji plastydowej (PLS, ang. *plastid localization signal*), a związane jest to ze sposobem syntezy tych białek na rybosomach. W przypadku translacji od pierwszej reszty metioniny powstaje izoforma zawierająca PLS, natomiast rozpoczęcie translacji od drugiej reszty metioniny powoduje powstanie izoformy transportowanej do cytosolu. Porównanie trzech rodzajów opisanych powyżej syntaz rzodkiewnika przy użyciu programu BlastP wykazało stosunkowo niskie podobieństwo ich sekwencji aminokwasowych. Syntazy GPP wykazują zaledwie 24,4% identyczności sekwencji aminokwasowych w stosunku do syntaz FPP i 28,7% w stosunku do syntaz GGPP [10].

SZLAK BIOSYNTETY ENT-KAURENU

Cyklizacja liniowego GGPP będącego wspólnym prekursorem wszystkich diterpenoidów do tetracyklicznego węglowodoru *ent*-kaurenu zachodzi z udziałem dwóch enzymów CPS i KS należących do klasy syntaz terpenowych (TPS, ang. *terpene synthases*). U rzodkiewnika enzym *AtCPS1* kodowany jest przez pojedynczy gen *GA1*. Mutant *ga1* wykazuje silnie karłowaty fenotyp jednak zawiera śladowe ilości GA, co sugeruje, że w genomie tej rośliny może istnieć dodatkowy, niezidentyfikowany do tej pory homolog tego genu [10]. Z kolei w genomie ryżu zidentyfikowano trzy geny *CPS* - *OsCPS1*, *OsCPS2* (*OsCyc2*) i *OsCPS4* (*OsCyc1*) oraz 1 pseudogen - *OsCPS3*. Spośród wszystkich enzymów kodowanych przez w/w geny tylko *OsCPS1* uczestniczy w szlaku biosyntezy GA, natomiast *OsCPS2* i *OsCPS4* zaangażowane są w szlak biosyntezy fitoaleksyn, niskocząsteczkowych związków, syntetyzowanych i akumulowanych w roślinach narażonych na atak patogena [22]. Analiza sekwencji reszt aminokwasowych białka *AtCPS1* wykazała najwyższe, 41% podobieństwo do białka *OsCPS1* i niższe w stosunku do *OsCPS2* i *OsCPS4* (35%-37%) [10].

U rzodkiewnika zarówno *AtCPS1*, jak i *AtKS1* posiadają N-końcową sekwencję aminokwasową kierującą je do stromy plastydów. Enzym *AtKS1* kodowany jest przez pojedynczy gen *GA2*, którego utrata całkowicie hamuje syntezę GA [23]. U ryżu zidentyfikowano 9 homologów genów *KS* (*OsKS1-9*) w tym 1 pseudogen (*OsKS9*), z czego w szlak biosyntezy GA zaangażowany jest prawdopodobnie tylko jeden, *OsKS1*. Białko *OsKS1* wykazuje 43% identyczności sekwencji aminokwasowych w stosunku do *AtKS1*, natomiast pozostałe białka ryżu w przedziale 37-41% [24]. U innych gatunków roślin, m. in. u stewii (*Stevia rebaudiana*) zidentyfikowano dwa geny *KS* [10], natomiast u grzybów, m. in. *G.*

fujikuroi i *Phaeosphaeria* stwierdzono obecność enzymu, który wykazuje aktywność zarówno CPS, jak i KS [4].

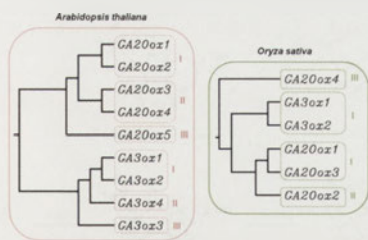
SZLAK BIOSYNTETY GA₁₂

Utlenianie *ent*-kaurenu do GA₁₂ katalizowane jest przez zlokalizowane na terenie ER enzymy należące do klasy monooksygenaz cytochromu P450 (P450, ang. *cytochrome P450 monooxygenases*). Za przeprowadzenie pierwszych trzech reakcji od *ent*-kaurenu do kwasu *ent*-kaurenowego odpowiedzialny jest enzym EKO (CYP701A wg nomenklatury P450, <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>) [25,26], a następane trzy reakcje od kwasu *ent*-kaurenowego do GA₁₂ zachodzą z udziałem enzymu KAO (CYP88A). U rzodkiewnika zidentyfikowano jeden gen *EKO* (*GA3*) kodujący białko *AtKAO1* oraz dwa geny *KAO* kodujące białka *AtKAO1* i *AtKAO2*. Wyniki doświadczeń z użyciem białka zielonej fluorescencji (GFP, ang. *green fluorescent protein*) wykazały, że białko KAO zlokalizowane jest na terenie ER, natomiast białko EKO występuje po zewnętrznej stronie błony plastydu. Potwierdza to fakt, że ostatnio wymieniony enzym bierze udział w pierwotnym przekształcaniu *ent*-kaurenu przemieszczającego się z plastydów do ER [23]. Homologi enzymów EKO (*OsKO1-5*) i KAO (*OsKAO*) zidentyfikowano również w genomie ryżu. Porównując sekwencję aminokwasową białka *AtKAO1* wykazano najwyższe podobieństwo względem *OsKO1-5* (~53%), a niższe w stosunku do *OsKO4* (47%) i *OsKO5* (46%). Z kolei białko *OsKAO* wykazuje około 51% podobieństwo do białek *AtKAO1* i *AtKAO2*. Analiza filogenetyczna wykazała, że białka KAO występujące u roślin jednoliściennych wykazują wyższe podobieństwo (76-77%) względem samych siebie niż względem tych samych białek występujących u roślin dwuliściennych (51-54%) [24].

Homologi w/w enzymów zidentyfikowano również u grzybów (np. u *G. fujikuroi*), ale wykazują one bardzo małe podobieństwo (~10%) sekwencji aminokwasowych w porównaniu do enzymów roślinnych i prawdopodobnie nie są z nimi powiązane ewolucyjnie. Pochodzący z grzybów enzym EKO (CYP503) katalizuje taką samą reakcję jak jego roślinny homolog, natomiast enzym KAO (CYP68A) wśród wielu rodzajów aktywności posiada również aktywność 3β-hydrolazy, w wyniku czego przekształca kwas *ent*-kaurenowy w GA₁₄ (3β-hydroksy-GA₁₂) [6].

SZLAK BIOSYNTETY C₁₉-GA

Reakcje zachodzące na późnych etapach biosyntezy GA katalizowane są przez rozpuszczalne dioksygenazy zależne od kwasu 2-oksoglutarynowego (2ODD, ang. *2-oxoglutarate-dependent dioxygenases*). Wśród nich wyróżniamy 20-oksydazy giberelinowe (GA20ox) oraz 3-oksydazy giberelinowe (GA3ox). Wymienione enzymy kodowane są przez duże rodziny genów wykazujących zróżnicowaną czasowo i przestrzennie aktywność transkrypcyjną. U rzodkiewnika zidentyfikowano pięć genów *GA20ox* (*AtGA20ox1-5*) i cztery geny *GA3ox* (*AtGA3ox1-4*), natomiast u ryżu cztery geny *GA20ox* (*OsGA20ox1-4*) oraz dwa geny *GA3ox* (*OsGA3ox1/2*) [10]. Białka kodowane przez wymienione geny odszukano w bazie danych NCBI, a następnie ich sekwencje aminokwasowe porównano przy użyciu programu ClustalW.



Rycina 7. Dendrogramy uzyskane po porównaniu sekwencji reszt aminokwasowych białek z rodziny dioksygenaz zależnych od kwasu 2-oksoglutarynowego u rzodkiewnika i ryżu przy użyciu programu ClustalW.

Otrzymane wyniki przedstawiono w formie dendrogramów (Ryc. 7). Z analiz filogenetycznych wynika, że u rzodkiewnika można wyróżnić trzy klasy zarówno GA20ox, jak i GA3ox, natomiast u ryżu trzy klasy GA20ox i jedną GA3ox. Pozostałe informacje dotyczące zarówno genów, jak i białek u tych dwóch gatunków roślin przedstawiono w tabeli 2.

W związku z tym, że utrata jednego genu może być rekompensowana w określonym stopniu przez białkowe produkty innych genów z tej samej rodziny, roślinne mutanty charakteryzują się fenotypami półkarłowatymi. Każdy z genów kodujących dioksygenazy może być regulowany przez

Tabela 2. Charakterystyka kluczowych genów i kodowanych przez nie białek związanych z biosyntezą GA u rzodkiewnika i ryżu. Sekwencje nukleotydowe genów rzodkiewnika zostały zidentyfikowane w trakcie projektu AGI (ang. *Arabidopsis Genome Initiative*), natomiast sekwencje nukleotydowe genów ryżu zostały zidentyfikowane w trakcie projektu RAP (ang. *Rice Annotation Project*, <http://rapdb.lab.nig.ac.jp/>). Domeny poszczególnych białek wyznaczono przy użyciu programu BlastP; G – gatunek, N – nazwa, aa – reszty aminokwasowe.

G	N	Gen	AGI/RAP	Domeny białkowe (położenie, aa)	aa
Arabidopsis thaliana	20-oksydazy giberelinowe GA20ox	AtGA20ox1 [GA5]	At4g25420	- domena PLN03176 charakterystyczna dla nadrodziny 3-hydroksylaz flawonowych (31-139) - domena 2OG-FeII_Oxy charakterystyczna dla nadrodziny oksygenaz zależnych od dwuwartościowego żelaza i kwasu 2-oksoglutarynowego (223-322) - multidomena PLN02276 charakterystyczna dla 20-oksydaz giberelinowych (24-373)	377
		AtGA20ox2	At5g51810	- domena PLN03176 (46-137) - domena 2OG-FeII_Oxy (221-319) - multidomena PLN02276 (23-377)	378
		AtGA20ox3	At5g07200	- domena PLN03176 (41-137) - domena 2OG-FeII_Oxy (222-321) - multidomena PLN02276 (17-380)	380
		AtGA20ox4	At1g60980	- domena PLN03176 (40-136) - domena 2OG-FeII_Oxy (223-322) - multidomena PLN02276 (16-376)	376
		AtGA20ox5	At1g44090	- domena PLN03176 (34-128) - domena 2OG-FeII_Oxy (229-324) - multidomena PLN02276 (24-383)	385
	3-oksydazy giberelinowe	AtGA3ox1 [GA4]	At1g15550	- domena PLN03176 charakterystyczna dla nadrodziny 3-hydroksylaz flawonowych (69-127) - domena 2OG-FeII_Oxy charakterystyczna dla nadrodziny oksygenaz zależnych od dwuwartościowego żelaza i kwasu 2-oksoglutarynowego (107-340) - multidomena PLN02254 charakterystyczna dla 3β-dioksygenaz GA (24-383)	358
		AtGA3ox2	At1g80340	- domena PLN03176 (50-120) - domena 2OG-FeII_Oxy (149-333) - multidomena PLN02254 (1-347)	347
		AtGA3ox3	At4g21690	- domena PLN03176 (27-102) - domena 2OG-FeII_Oxy (97-335) - multidomena PLN02254 (1-349)	349
		AtGA3ox4	At1g80330	- domena PLN03176 (13-104) - domena 2OG-FeII_Oxy (149-338) - multidomena PLN02254 (1-354)	355
	Oryza sativa	20-oksydazy giberelinowe	OsGA20ox1	Os03g0856700	- domena PLN03176 charakterystyczna dla nadrodziny 3-hydroksylaz flawonowych (18-120) - domena 2OG-FeII_Oxy charakterystyczna dla nadrodziny oksygenaz zależnych od dwuwartościowego żelaza i kwasu 2-oksoglutarynowego (210-309) - multidomena PLN02276 charakterystyczna dla 20-oksydaz giberelinowych (13-367)
OsGA20ox2 [SD1]			Os01g0883800	- domena 2OG-FeII_Oxy (225-324) - multidomena PLN02276 (33-372)	389
OsGA20ox3			Os07g0169700	- domena PLN03176 (11-115) - domena 2OG-FeII_Oxy (200-304) - multidomena PLN02276 (1-362)	367
GA3ox		OsGA20ox4	Os05g0421900	- domena ATT_I charakterystyczna dla nadrodziny aminotferaz asparaginianu typu I zależnych od fosforanu pirydoksalu (152-222) - domena 2OG-FeII_Oxy (1-32) - multidomena PLN02276 (1-82)	331
		OsGA3ox1	Os05g0178100	- domena 2OG-FeII_Oxy (159-358) - multidomena PLN02254 (32-380)	384
		OsGA3ox2 [D18]	Os01g0177400	- domena PLN03176 (63-111) - domena 2OG-FeII_Oxy (206-300) - multidomena PLN02254 (4-348)	370

inne czynniki wewnętrzne (m. in. hormony) i środowisko (m. in. światło, temperatura, stres), jak i być zaangażowany w odmienne procesy fizjologiczne [9,27].

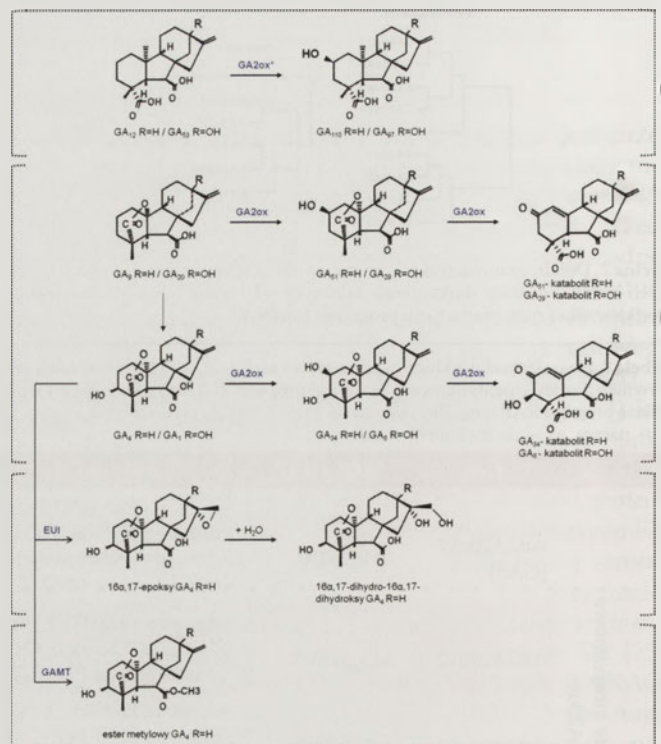
W wyniku kolejnych reakcji utleniania, GA20ox przekształcając GA₁₂ (R=H) i GA₅₃ (R=OH) do cząsteczek z grupą hydroksylową (odpowiednio GA₁₅ i GA₄₄), aldehydową (GA₂₄ i GA₁₉), a następnie do C₁₉-GA z 4,10-laktonem (GA₉ i GA₂₀) (Ryc. 6). Istotne jest, aby cząsteczki pośrednie tj. GA₁₅ i GA₄₄ zawierały wolną grupę hydroksylową (formy otwartych laktonów) ponieważ tylko wtedy mogą wejść w dalszy cykl przemian. W przeciwnym układzie, czyli tam gdzie dochodzi do wytworzenia δ-laktonu, GA20ox nie mogą dalej katalizować reakcji utleniania. W organach wegetatywnych poza nasionami stwierdzono obecność enzymu zdolnego do przekształcenia δ-laktonu w grupę aldehydową [28]. W związku z tym w sytuacji, gdy GA20ox wykazywałyby niską aktywność biologiczną, mógłby to być istotny mechanizm regulacji zawartości C₁₉-GA w tkankach roślinnych. Istnieje również możliwość przekształcania grupy aldehydowej w grupę karboksylową w GA₂₄ i GA₁₉, a produktami tych reakcji są odpowiednio GA₂₅ i GA₁₇. Gen kodujący enzym GA20ox, który katalizuje opisaną powyżej reakcję po raz pierwszy zidentyfikowano w bielmie i dojrzewających zarodkach dyni (*Cucurbita maxima*), natomiast nie wykryto go u żadnego innego gatunku roślin. Do chwili obecnej nie został wyjaśniony jednak chemiczny mechanizm utraty C-20 w GA₂₅ i GA₁₇. Dane te mogą stanowić istotny dowód na to, że lakton występujący w GA₉ i GA₂₀ utworzony zostaje w wyniku przekształcenia grupy karboksylowej konkretnie przy 19 atomie węgla [10].

Za bezpośrednio wytworzenie biologicznie aktywnych GA odpowiadają enzymy określane jako GA3ox. Występująca u rzodkiewnika i wykazująca wysoką specyficzność tkankową, główna oksydaza, GA3ox1 odpowiada za wytworzenie GA₄ (R=H) lub GA₁ (R=OH) w wyniku 3β-hydroksylacji odpowiednio GA₉ lub GA₂₀. Ponadto u innych gatunków roślin stwierdzono również występowanie GA3ox, które zdolne są do utleniania drugiego i trzeciego atomu węgla w wyniku czego powstaje pomiędzy nimi podwójne wiązanie. Tego typu wiązania występują w 2,3-didehydro-GA₉ (R=H) i 2,3-didehydro-GA₅ (R=OH). Kolejne oksydacje ostatnio wymienionych GA, początkowo przy C-1, a następnie przy C-3, prowadzą do powstania odpowiednio GA₇ i GA₃. Podczas gdy większość GA3ox wykazuje wysoką specyficzność w stosunku do C₁₉-GA, to u niektórych gatunków roślin, np. u dyni, stwierdzono występowanie enzymów, które utleniają C₂₀-GA [8,29].

DEZAKTYWACJA GA

Przekształcanie fizjologicznie czynnych cząsteczek GA w formy nieaktywne jest istotnym procesem pozwalającym regulować zawartość hormonu w tkankach roślinnych. Wyodróżniamy trzy główne drogi dezaktywacji GA: hydroksylację, epoksydację i metylację (Ryc. 8).

Najlepiej scharakteryzowanym szlakiem tworzenia katabolitów jest utlenianie (2β-hydroksylacja) drugiego atomu węgla w cząsteczkach GA, katalizowane przez 2-oksydazy giberelinowe (GA2ox) (Ryc. 8I i II). Taki mechanizm dezak-



Rycina 8. Sposoby dezaktywacji GA. (I) i (II) 2β-hydroksylacja. Jako GA2ox oznaczono oksydazy klasy I i II, natomiast jako GA2ox* oznaczono oksydazy klasy III; (III) epoksydacja; (IV) metylacja. Szczegóły w tekście. Pełne nazwy enzymów przedstawiono w tabeli 3. Na podstawie [9,10], zmodyfikowane.

tywacji funkcjonuje w przypadku bioaktywnych GA₁ i GA₄ oraz ich bezpośrednich prekursorów GA₉ i GA₂₀, natomiast nie funkcjonuje w przypadku GA₃, GA₇, GA₅ i GA₆, czego powodem jest obecność w cząsteczkach podwójnych wiązań pomiędzy pierwszym i drugim (GA₃ i GA₇) lub drugim i trzecim (GA₅ i GA₆) atomem węgla. W związku z powyższym ostatnie z wymienionych GA wykazują przez dłuższy czas aktywność biologiczną niż na przykład GA₁ i GA₄ [10]. Z opisanych powodów wynikają także ich odmienne zaangażowania w poszczególne procesy fizjologiczne. U życicy (*Lolium temulentum*) GA₅ i GA₆ wykazują większą bioaktywność w procesie kwitnienia, podczas gdy GA₁ i GA₄ w procesie wydłużania pędu [30]. Wyniki początkowych badań doprowadziły do identyfikacji GA2ox, które jako substrat wykorzystują C₁₉-GA (Ryc. 8II) [31], natomiast w 2003 roku odkryto dodatkowo GA2ox, które przekształcają w katabolity C₂₀-GA (Ryc. 8I) [32]. Do chwili obecnej nie poznano jednak znaczenia dezaktywacji jeszcze nie funkcjonalnych cząsteczek hormonu.

Wyniki badań na recesywnym mutancie *eui* (ang. *elongated uppermost internode*) u ryżu doprowadziły do odkrycia alternatywnego sposobu dezaktywacji GA (Ryc. 8III). Okazało się, że enzym EUI, odpowiedzialny za epoksydację podwójnego wiązania przy 16 i 17 atomie węgla w cząsteczkach GA nieprzekształconych przez enzym GA13ox (np. GA₄, GA₉ i GA₁₂), przyspiesza tworzenie katabolitów. Reakcja na poziomie biochemicznym została przedstawiona następująco: GA₄ przy udziale enzymu EUI zostaje przekształcona w 16α,17-epoksy-GA₄, a następnie w obecności cząsteczek wody w 16α,17-dihydro-16α,17-dihydroxy-GA₄. Taki mechanizm unieczynnienia cząsteczek GA może

Tabela 3. Enzymy uczestniczące w procesach dezaktywacji GA.

Skrót	Pełna nazwa enzymu	
	polska	angielska
GA2ox	2-oksydaza giberelinowa	gibberellin 2-oxidase
GA16,17ox / EUI	16,17-oksydaza giberelinowa	gibberellin 16,17-oxidase / elongated uppermost internode
GAMT	metylotransferaza giberelinowa	gibberellin methyltransferases

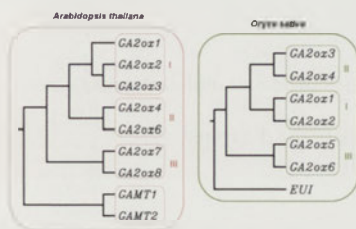
być powszechny dla różnych roślin ze względu na swoją prostotę oraz tłumaczy zagadkowo wysokie stężenie ostatnio wymienionego związku u wielu gatunków roślin [33].

Innymi enzymami występującymi u rzodkiewnika, których funkcjonowanie może być ściśle związane z tworzeniem katabolitów GA, są metylotransferazy giberelinowe GAMT1 i GAMT2 (ang. *gibberellin methyltransferases 1/2*), które wykorzystując S-adenozyno-L-metioninę (SAM, ang. *S-adenosine-L-methionine*) jako donor grupy metylowej, katalizują reakcje metylacji grupy karboksylowej zlokalizowanej przy szóstym atomie węgla (C-6) tworząc w ten sposób estry metylowe GA (MeGA, ang. *metyl esters of gibberellin*) (Ryc. 8IV) [34]. Mimo faktu, iż reakcje metylacji powszechnie występują u eukariontów, ten sposób obniżania stężenia aktywnych GA nie został uznany za powszechny i wymaga dalszych dodatkowych badań.

GENY I ENZYMY KATABOLIZMU GA

Odkrycia ostatnich lat dotyczące nowych sposobów zmniejszania zawartości cząsteczek hormonu w tkankach roślinnych ujawniły złożoność omawianych procesów. W chwili obecnej znane są trzy podstawowe grupy enzymów przeprowadzających reakcje metabolicznej dezaktywacji GA. Pełne nazwy tych enzymów i ich skróty załączono w tabeli 3.

Tak jak GA20ox i GA3ox, GA2ox zaliczane są do rodziny dioksygenaz zależnych od kwasu 2-oksoglutarynowego (2ODD). Wszystkie GA2ox, jak również metylotransferazy i epoksydazy występujące u rzodkiewnika i/lub ryżu odszukano w bazie danych NCBI, a następnie ich sekwencje aminokwasowe porównano w programie ClustalW. Otrzymane wyniki przedstawiono w formie dendrogramów (Ryc. 9). Pozostałe informacje dotyczące zarówno genów, jak i białek u tych dwóch gatunków roślin przedstawiono w tabeli 4.



Rycina 9. Dendrogramy uzyskane po porównaniu sekwencji aminokwasowych białek z rodziny dioksygenaz zależnych od kwasu 2-oksoglutarynowego (2ODD), metylotransferaz giberelinowych (GAMT) oraz monooksygenaz cytochromu P450 (P450) u rzodkiewnika i ryżu przy użyciu programu ClustalW.

Bazując na pokrewieństwie filogenetycznym, GA2ox podzielono na trzy klasy. Do klasy pierwszej i drugiej zakwalifikowano oksydazy, które odpowiedzialne są za 2 β -hydroksylację cząsteczek hormonu, lub jak stwierdzono w przypadku liścieni i rozwijających się nasion grochu, za tworzenie grupy ketonowej przy drugim atomie węgla w cząsteczkach GA. Należy zaznaczyć, że tworzenie grupy ketonowej ma miejsce tylko i wyłącznie wtedy, gdy stężenie enzymu jest bardzo wysokie. Niemniej jednak analiza funkcyjna wykazała, że wszystkie GA2ox klasy pierwszej i drugiej wykazują powinowactwo do C₁₉-GA (GA₁, GA₄, GA₉, GA₂₀) i przyjęto się określać je jako C₁₉-GA2ox [10]. U rzodkiewnika omawiane dwie klasy enzymów kodowane są przez sześć genów (*AtGA2ox1-AtGA2ox6*) chociaż jeden z nich (*AtGA2ox5*) zawiera dużą wstawkę DNA i prawdopodobnie nie ulega ekspresji [35]. Z kolei w genomie ryżu zidentyfikowano cztery geny *OsGA2ox1-OsGA2ox4* kodujące białka o tych samych nazwach [24]. Do trzeciej klasy zaliczono te GA2ox, które jako substrat wykorzystują C₂₀-GA (GA₁₂, GA₅₃) i określa się je jako C₂₀-GA2ox. U rzodkiewnika kodowane są one przez dwa geny *AtGA2ox7* oraz *AtGA2ox8*. Białka GA2ox7 i GA2ox8 wykazują niski procent podobieństwa (zaledwie 16-23%) w porównaniu do pozostałych GA2ox [32]. U ryżu GA2ox zaliczane do trzeciej klasy kodowane są również przez dwa geny *OsGA2ox5* i *OsGA2ox6* [9].

Zbudowany z 577 reszt aminokwasowych enzym EUI, określan również jako CYP714D1, zaliczany jest do klasy monooksygenaz cytochromu P450. Wyniki pierwotnych badań komórek epidermy cebuli z użyciem GFP pokazały, że białka EUI zlokalizowane są w cytoplazmie, a kolejne analizy potwierdziły również ich obecność na powierzchni błon ER. Transgeniczne siewki ryżu z nadekspresją genu *EUI* charakteryzują się skrajną karłowatością i nie są zdolne do wytwarzania nasion. Aplikacja roztworu GA₁ promuje szybki wzrost niskich roślin, natomiast podanie GA₄ i GA₉ nie wpływa na ten proces. Jest to spowodowane tym, że ostatnio wymienione GA należą do szlaku 13-hydroksylowanego, a takie cząsteczki hormonu są wykorzystywane jako substraty w reakcjach katalizowanych przez EUI. Z kolei brak aktywnego enzymu EUI w komórkach ryżu skutkuje akumulacją aktywnych biologicznie GA na bardzo wysokim poziomie. Oba przedstawione powyżej przykłady potwierdzają dezaktywującą funkcję enzymu EUI [33,36].

Zidentyfikowane po raz pierwszy u rzodkiewnika enzymy GAMT1 i GAMT2 charakteryzują się zmienną aktywnością biologiczną w odniesieniu do różnych GA (Tab. 5). Wykazano, że GAMT1 z najwyższą efektywnością metyluje GA₉ i GA₂₀, natomiast GAMT2 giberelinę A₄. Ponadto enzym GAMT1 może dezaktywować GA, które nie zawierają γ -laktonu (GA₁₉ i GA₁₂), natomiast GAMT2 nie wykazuje takich zdolności. Białko GAMT1 o m. cz. 41,5 kD zbudowane jest z 376 reszt aminokwasowych, natomiast GAMT2 o m. cz. 43,3 kD składa się z 387 reszt aminokwasowych. Białka te wykazują 58% identyczności [34], a wśród innych białek rzodkiewnika najbardziej podobne, zarówno do GAMT1 i GAMT2, jest białko IAMT1 (34%), które metylując auksyny wytwarza ich estry (MeIAA, ang. *metyl indole-3-acetic acid*) [37]. W celu sprawdzenia dezaktywującej funkcji omawia-

Tabela 4. Charakterystyka kluczowych genów i kodowanych przez nie białek związanych z dezaktywacją GA u rzodkiewnika i ryżu. Sekwencje nukleotydowe genów rzodkiewnika zostały zidentyfikowane w trakcie projektu AGL, natomiast sekwencje nukleotydowe genów ryżu zostały zidentyfikowane w trakcie projektu RAP. Domeny poszczególnych białek wyznaczono przy użyciu programu BlastP; G – gatunek, N – nazwa, KL – klasa, aa – reszty aminokwasowe.

G	N	KL	Gen	AGI/RAP	Domeny białkowe (położenie, aa)	aa
Arabidopsis thaliana	2-oksydazy giberelinowe GA20ox	I	AtGA2ox1	At1g78440	- domena PLN03176 charakterystyczna dla nadrodziny 3-hydroksylaz flawonowych (18-72) - domena 2OG-FeII_Oxy charakterystyczna dla nadrodziny oksigenaz zależnych od dwuwartościowego żelaza i kwasu 2-oksoglutowego (166-273) - multidomena PLN02156 charakterystyczna dla 2β-dioksygenaz giberelinowych (17-329)	329
			AtGA2ox2	At1g30040	- domena PLN03176 (28-87) - domena 2OG-FeII_Oxy (180-283) - multidomena PLN02156 (1-340)	341
			AtGA2ox3	At2g34555	- domena PLN03176 (27-76) - domena 2OG-FeII_Oxy (176-278) - multidomena PLN02156 (1-335)	335
			AtGA2ox4	At1g47990	- domena PLN03176 (14-71) - domena 2OG-FeII_Oxy (157-269) - domena PcbC charakterystyczna dla syntaz izopenicylinowych i pokrewnych dioksygenaz (13-309)	321
		II	AtGA2ox6	At1g02400	- domena PLN03176 (20-83) - domena 2OG-FeII_Oxy (176-280) - multidomena PLN02750 charakterystyczna dla oksydoreduktaz i oksigenaz 2OG-FeII (15-311)	329
			AtGA2ox7	At1g50960	- domena PLN03176 (39-116) - domena 2OG-FeII_Oxy (196-291) - multidomena PLN02365 charakterystyczna dla dioksygenaz zależnych od kwasu 2-oksoglutowego (40-315)	336
		III	AtGA2ox8	At4g21200	- domena PLN03176 (41-105) - domena 2OG-FeII_Oxy (191-290) - multidomena PLN02403 charakterystyczna dla oksydaz aminocyklopropanokarbonylowych (40-333)	338
			GAMT	GAMT1	At4g26420	- domena charakterystyczna dla metylotransferaz (43-375)
		GAMT2		At5g56300	- domena charakterystyczna dla metylotransferaz (51-386)	387
		Oryza sativa	2-oksydazy giberelinowe	I	OsGA2ox3	Os01g0757200
OsGA2ox4	Os05g0514600				- domena 2OG-FeII_Oxy (116-177) - multidomena PLN02156 (1-112, 124-235)	242
II	OsGA2ox1			Os05g0158600	- domena 2OG-FeII_Oxy (237-321) - multidomena PLN02156 (61-368)	382
	OsGA2ox2			Os01g0332300	- domena 2OG-FeII_Oxy (187-306) - multidomena PLN02156 (37-352)	370
III	OsGA2ox5			Os07g0103500	- domena PLN03176 (41-102) - domena 2OG-FeII_Oxy (193-290) - multidomena PLN02984 charakterystyczna dla oksydoreduktaz i rodziny oksigenaz 2OG-Fe(II) (7-339)	341
	OsGA2ox6			Os04g0522500	- domena PLN03176 (49-121) - domena 2OG-FeII_Oxy (213-308) - multidomena PLN02984(29-351)	358
EUI	EUI / CYP714D1			Os05g0482400	- domena p450 charakterystyczna dla nadrodziny monoksygenaz cytochromu p450 (110-532) - multidomena PLN02290 charakterystyczna dla trans-hydroksylaz cytokininowych (27-554)	577

nych białek u rzodkiewnika posłużono się zarówno mutantami, jak i roślinami, które wykazywały nadekspresję genów *GAMT1* i *GAMT2* pod silnym promotorem. W porównaniu do roślin typu dzikiego, 4-tygodniowe transgeniczne rośliny ze zwiększoną ilością transkryptów genu *GAMT1*

charakteryzowały się wyraźnie niższymi, ciemnozielonymi rozetami liściowymi. Włącznie do 3 miesiąca rosły one bardzo wolno i rozwijały się w karłowato-krzacaste rośliny. W tym czasie niektóre z nich w ogóle nie wytworzyły kwiatów, chociaż rośliny typu dzikiego zaczynają kwitnąć

Tabela 5. Aktywność biologiczna enzymów GAMT1 i GAMT2 u rzodkiewnika względem wybranych cząsteczek GA. Kolorem czerwonym zaznaczono GA posiadające przy trzynastym atomie węgla grupę hydroksylową, natomiast niebieskim GA nie posiadające grupy OH. Szczegóły w tekście. Na podstawie [34].

Substrat	Względna aktywność (%)	
	GAMT1	GAMT2
GA ₁	25	30
GA ₃	80	45
GA ₄	69	100
GA ₉	100	60
GA ₁₂	9	0
GA ₁₉	19	0
GA ₂₀	95	15
GA ₂₄	46	80
GA ₅₁	32	16

już od 6 tygodnia, a tam gdzie powstały kwiaty, były one małe i często sterylne. Potraktowanie roślin roztworem GA₄ przywracało po pewnym czasie pokrój rośliny typu dzikiego, natomiast aplikacja roztworu Me-GA₄ nie dawała takich efektów. Podobne rezultaty otrzymano w przypadku tytoniu (*Nicotiana tabacum*) i petunii (*Petunia hybrida*). Z kolei transgeniczne siewki rzodkiewnika z nadekspresją genu *GAMT2* wzrastające na pożywce MS (ang. *Murashige and Skoog*) nie wykazywały karłowatego fenotypu we wczesnych etapach rozwoju i nie różniły się od roślin typu dzikiego. W momencie przeniesienia 3-tygodniowych roślin do ziemi, rośliny transgeniczne zaczęły wykazywać inny wzorzec rozwoju, który charakteryzował się spowolnionym wzrostem, większą liczbą odgałęzień, co dawało pokrój krzaczastej rośliny półkarłowatej. Niektóre z nich wykazywały obniżoną płodność, jednak zdecydowana większość posiadała normalnie wykształcone nasiona. Różnica pomiędzy fenotypami roślin z linii z nadekspresją genu *GAMT1* i *GAMT2* nie zacierala się również podczas uprawy roślin w różnych warunkach świetlnych. Z kolei podwójne mutanty *gamt1 gamt2* wykazywały ponad przeciętnie wysoką zawartość aktywnych GA i były bardziej odporne na działanie inhibitorów biosyntezy hormonu w porównaniu z roślinami typu dzikiego [34].

W celu określenia roli enzymów *GAMT1* i *GAMT2* ustalono profil ekspresji genów, które je kodują. Wykrywalny poziom aktywności transkrypcyjnej obu genów zaobserwowano w kielkujących i dojrzewających nasionach, natomiast szczególnie wysoki w końcowej fazie rozwoju łuszczynek rzodkiewnika. Z tym rozkładem transkryptów w/w genów pokrywa się również obecność kodowanych przez nie białek, co potwierdzono przy użyciu przeciwciał poliklonalnych [9,34].

PODSUMOWANIE

Gibereliny stanowią bardzo liczną i wciąż powiększającą się grupę związków hormonalnych o skomplikowanej strukturze chemicznej. Synteza GA zachodzi w dojrzewających nasionach i owocach, w pęcikach kwiatów, w młodych liściach, wierzchołkach wzrostu pędów i w korzeniach [38-40]. Pierwsze etapy biosyntezy są wspólne dla wszyst-

kich terpenoidów. Dalsze reakcje utleniania grupy aldehydowej do karboksylowej, oksydacyjnej dekarboksylacji, hydroksylacji pierścienia, odwodorowania z utworzeniem podwójnego wiązania oraz dehydratacji z utworzeniem dodatkowego pierścienia laktonowego prowadzą do powstania wszystkich członków rodziny GA. Gibereliny o najwyższym stopniu utlenienia mają nieznaczną aktywność biologiczną, a końcowe produkty oksydacyjnych przekształceń utlenionych GA są jej całkowicie pozbawione i uważa się je za produkty metabolicznej dezaktywacji tych hormonów [3].

Wyniki badań na poziomie molekularnym doprowadziły do identyfikacji większości genów związanych ze szlakiem biosyntezy i degradacji GA u bakterii, organizmów plechowych oraz roślin nasiennych. W chwili obecnej jednym z wyzwania jest potwierdzenie obecności domniemanej GA13ox, która przekształca GA₁₂ w jej analog GA₅₃ poprzez dołączenie grupy wodorotlenowej do trzynastego atomu węgla w cząsteczce GA. Opisana reakcja jest kluczowym momentem, od którego powstają dwa niezależne szlaki metaboliczne, odpowiednio 13-niehydroksylowany i 13-hydroksylowany. Zastanawiająca jest również obecność tylko w organach wegetatywnych enzymu odkrytego przez Ward'a i współpracowników w 1997 roku zdolnego do przekształcania δ-laktonu giberelin A₁₅/A₄₄ w grupę aldehydową giberelin A₂₄/A₁₉ [28]. Konieczne są dalsze badania w celu dokładnego określenia znaczenia tego procesu. Według danych literaturowych istnieje również możliwość przekształcania grupy aldehydowej GA₂₄/GA₁₉ w grupę karboksylową, a produktami tych reakcji są odpowiednio GA₂₅ i GA₁₇. Co ciekawe, gen kodujący enzym GA20ox, który przeprowadza opisaną reakcję, zidentyfikowano u dyni, ale nie odkryto u żadnego innego gatunku roślin. Tak więc mimo wielu lat badań nad szlakiem biosyntezy GA istnieją jeszcze zagadnienia niewyjaśnione.

Zdecydowana większość poznanych genów związanych z biosyntezą GA należy do dużych rodzin, których synteza regulowana jest przez różne czynniki wewnętrzne (m. in. hormony) i zewnętrzne (m. in. światło, temperatura, stres) [41]. Taka sytuacja umożliwia czasowo-przestrzenne zróżnicowanie zawartości kodowanych przez nie białek w poszczególnych organach i tkankach na różnych etapach rozwoju rośliny. Ponadto wiele z enzymów, należących głównie do trzech klas: syntaz terpenowych, monoooksygenaz cytochromu P450 oraz oksygenaz zależnych od kwasu 2-oksoglutarynowego, może pełnić różnorodne funkcje.

Zawartość biologicznie aktywnych GA zależy zarówno od tempa biosyntezy, jak i od przekształcania ich w formy nieaktywne. Odkrycie dwóch nowych sposobów regulacji zawartości GA w tkankach roślinnych, epoksydacji u ryżu i metylacji u rzodkiewnika, zrodziło wiele pytań, w tym o powszechność występowania tych reakcji. Interesujące jest również odkrycie Schomburg'a i współpracowników w 2003 roku dotyczące identyfikacji trzeciej, zupełnie nowej klasy GA2ox, które jako substrat wykorzystują C₂₀-GA [32]. Sens i cel unieczynnienia jeszcze nie funkcjonalnych cząsteczek hormonu nie jest znany, natomiast odkrycie to z pewnością zmienia sposób postrzegania mechanizmów dezaktywacji GA i podkreśla złożoność tych procesów.

Mimo znacznego postępu wiedzy odnośnie metabolizmu GA, zrozumienie mechanizmów funkcjonowania hormonu u organizmów eukariotycznych wymaga także znajomości sposobów regulacji metabolizmu GA, jak i sposobu odbierania i przekazywania sygnału giberelinowego [42].

PIŚMIENNICTWO

- Fleet CM, Sun T (2005) A DELLAce balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol* 8: 77-85
- Hartweck LM (2008) Gibberellin signaling. *Planta* 229: 1-13
- Kopcewicz J, Lewak S (2002) Fiziologia roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN
- Bomke C, Tudzynski B (2009) Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochem* 70: 1876-1893
- Hedden P, Phillips AL (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* 5: 523-530
- Kawaide H (2006) Biochemical and molecular analyses of gibberellin biosynthesis in fungi. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 583-590
- MacMillan J (2002) Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi and bacteria. *J Plant Growth Regul* 20: 387-442
- Sun TP (2008) Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in *Arabidopsis*. In the *Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0103, <http://www.aspb.org/publications/Arabidopsis/>
- Yamaguchi S (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* 59: 225-251
- Davies PJ (2004) Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Dordrecht Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, str. 63-94
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing YI, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M (2005) Gibberellin Insensitive Dwarf1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437: 693-698
- Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S, Kobayashi M, Maeda T, Matsuoka M, Yamaguchi I (2006) Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J* 46: 880-889
- Achard P, Genschik P (2008) Releasing the brakes of plant growth: how GA shutdown DELLA proteins. *J Exp Bot* 60: 1085-1092
- Olszewski N, Sun TP, Gubler F (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14: 61-80
- Rodriguez-Concepcion M, Boronat A (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* 130: 1079-1089
- Okada K, Kawaide H, Kuzuyama T, Seto H, Curtis IS, Kamiya Y (2002) Antisense and chemical suppression of the nonmevalonate pathway affects *ent*-kaurene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Planta* 215: 339-344
- Sponsel VM (2002) The deoxyxylulose phosphate pathway for the biosynthesis of plastidic isoprenoids: early days in our understanding of the early stages of gibberellin biosynthesis. *J Plant Growth Regul* 20: 332-345
- Kasahara H, Hanada A, Kuzuyama T, Takagi M, Kamiya Y, Yamaguchi S (2002) Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277: 45188-45194
- Ganjewala D, Kumar S, Luthra R (2008) An account of cloned genes of methyl-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Curr Issues Mol Biol* 11: 35-45
- Querol J, Campos N, Imperial S, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M (2002) Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* GCPE protein involved in plastid isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett* 514: 343-346
- Cordoba E, Salmi M, Leo P (2009) Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *J Exp Bot* 60: 2933-2943
- Hayashi Y, Toyomasu T, Hirose Y, Onodera Y, Mitsuhashi W, Yamane H, Sassa T, Dairi T (2008) Comparison of the enzymatic properties of *ent*-copalyl diphosphate synthases in the biosynthesis of phytoalexins and gibberellins in rice. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 523-530
- Helliwell CA, Sullivan JA, Mould RM, Gray JC, Peacock WJ, Dennis ES (2001) A plastid envelope location of *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Plant J* 28: 201-208
- Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal GK, Taketa S, Abe K, Miyao A, Hirochika H, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol* 134: 1642-1653
- Nelson DR, Schuler MA, Paquette SM, Werck-Reichhart D, Bak S (2004) Comparative genomics of rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiol* 135: 756-772
- Morrone D, Chen X, Coates RM, Peters RJ (2010) Characterization of the kaurene oxidase CYP701A3, a multifunctional cytochrome P450 from gibberellin biosynthesis. *Biochem J* 431: 337-344
- Miao H, Jiang B, Chen S, Zhang S, Chen F, Fang W, Teng N, Guan Z (2010) Isolation of a gibberellin 20-oxidase cDNA from and characterization of its expression in chrysanthemum. *Plant Breeding* 129: 707-714
- Ward JL, Jackson G, Beale MH, Gaskin P, Hedden P, Mander LN, Phillips AL, Seto H, Talon M, Willis CL, Wilson TM, Zeevaart JAD (1997) Stereochemistry of oxidation of gibberellin 20-alcohols, GA₁₅ and GA₄₄ to 20-aldehydes by gibberellin 20-oxidases. *Chem Commun* 13-14
- Yamaguchi S (2006) Gibberellin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Phytochem Rev* 5: 39-47
- King RW, Mander LN, Asp T, MacMillan CP, Blundell CA, Evans LT (2008) Selective deactivation of gibberellins below the shoot apex is critical to flowering but not to stem elongation of *Lolium*. *Mol Plant* 1: 295-307
- Thomas SG, Phillips AL, Hedden P (1999) Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4698-4703
- Schomburg FM, Bizzell CM, Lee DJ, Zeevaart JAD, Amasino RM (2003) Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell* 15: 151-163
- Zhu Y, Nomura T, Xu Y, Zhang Y, Peng Y, Mao B, Hanada A, Zhou H, Wang R, Li P, Zhu X, Mander LN, Kamiya Y, Yamaguchi S, He Z (2006) Elongated uppermost internode encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell* 18: 442-456
- Varbanova M, Yamaguchi S, Yang Y, McKelvey K, Hanada A, Borochov R, Yu F, Jikumaru Y, Ross J, Cortes D, Ma CJ, Noel JP, Mander L, Shulaev V, Kamiya Y, Rodermeil S, Weiss D, Pichersky E (2007) Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* 19: 32-45
- Rieu I, Eriksson S, Powers SJ, Gong F, Griffiths J, Woolley L, Benlloch R, Nilsson O, Thomas SG, Hedden P, Phillips AL (2008) Genetic analysis reveals that C₁₉-GA₂-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 2420-2436
- Zhang Y, Zhu Y, Peng Y, Yan D, Li Q, Wang J, Wang L, He Z (2008) Gibberellin homeostasis and plant height control by EUI and a role for gibberellin in root gravity responses in rice. *Cell Res* 18: 412-421
- Qin G, Gu H, Zhao Y, Ma Z, Shi G, Yang Y, Pichersky E, Chen H, Lui M, Chen Z, Qu LJ (2005) Regulation of auxin homeostasis and plant development by an indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 2693-2704
- Kowalczyk S, Jakubowska A (2000) Gibereliny - percepcja i transdukcja sygnału. *Post Biol Kom* 27: 397-423

39. Mutasa-Gottgens E, Hedden P (2009) Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *J Exp Bot* 60: 1979-1989
40. Wilmowicz E, Frankowski K, Glazińska P, Sidłowska M, Marciniak K, Kopcewicz J (2011) Rola giberelin w regulacji kwitnienia roślin. *Kosmos* 60: 129-140

41. Zhao XY, Yu XH, Liu XM, Lin CT (2007) Light regulation of gibberellins metabolism in seedling development. *J Integr Plant Biol* 49: 21-27
42. Marciniak K, Turowski T, Wilmowicz E, Frankowski K, Kęsy J, Kopcewicz J (2010) Ligazy ubikwitynowo-białkowe w szlakach sygnałowych auksyn, jasmonianów i giberelin. *Post Biol Kom* 2: 409-432

Gibberellins – structure, biosynthesis and deactivation in plants

Katarzyna Marciniak[✉], Jacek Kęsy, Andrzej Tretyn, Jan Kopcewicz

Chair of Plant Physiology and Biotechnology, Nicolaus Copernicus University, 9 Gagarina St., 87-100 Toruń, Poland

[✉]e-mail: kasia_swiniarska@o2.pl

Key words: phytohormones, gibberellins, GAs structure, GAs biosynthesis, GAs deactivation

ABSTRACT

Gibberellins (GA), as one of the most important phytohormones, control different aspect of plant growth and development such as seed germination, stem elongation and floral induction. Although identified more than a hundred and thirty GA, only a small number of them are biological active. Many non-bioactive GA are present in plant tissues as precursors or deactivated metabolites. Biochemical and genetic approaches have led to the recognition most of the genes that encode GA biosynthesis and deactivation enzymes, and conducted investigation has helped us to better understand GA functions in plants. Many enzymes involved in GA metabolism are multifunctional and therefore fewer enzymes than might be expected are required to create the various gibberellins structures. In this review, we summarized current knowledge on the GA biosynthesis and deactivation pathways in plants and showed precise characteristic of genes and encoding protein which are involved in gibberellins metabolism.



GBM

POLISH-GERMAN BIOCHEMICAL SOCIETIES JOINT MEETING

BIOCHEMISTRY FOR HEALTH AND ENVIRONMENT

POZNAŃ, POLAND, 11-14 SEPTEMBER 2012

<http://rcin.org.pl>

Emilia Wilmowicz[✉]

Kamil Frankowski

Magdalena Sidłowska

Agata Kućko

Jacek Kęsy

Adam Gąsiorowski

Paulina Glazińska

Jan Kopcewicz

Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

[✉]Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; tel.: (56) 611 44 46, faks: (56) 611 47 72, e-mail: emwil@umk.pl

Artykuł otrzymano 15 września 2011 r.
Artykuł zaakceptowano 31 października 2011 r.

Słowa kluczowe: jasmoniany, biosynteza, mikro-RNA

Wykaz skrótów: AOC – cyklaza tlenu allenowego; AOS – syntaza tlenu allenowego; JA – kwas jasmonowy; JA-Ile – koniugat kwasu jasmonowego z aminokwasem izoleucyną; LOX – lipoksygenaza; MeJA – ester metylowy kwasu jasmonowego; miRNA – małe regulatorowe RNA; OPR3 – reduktaza kwasu 12-oksofitodienowego

Podziękowania: Praca finansowana z Programu Wieloletniego MRiRW nr 149/2011 i grantu MNiSW nr N303321637.

STRESZCZENIE

Jasmoniany są hormonami roślinnymi zaangażowanymi w kontrolę wielu procesów wzrostu i rozwoju. Uczestniczą również w reakcjach obronnych roślin. Dokonany na przełomie kilku ostatnich lat postęp w badaniach nad biosyntezą oraz przekazywaniem sygnału jasmonianowego przyczynił się do zrozumienia mechanizmów regulujących zawartość tych hormonów w komórce. Utrzymanie odpowiedniego poziomu jasmonianów, warunkującego właściwą reakcję rośliny na zmieniające się warunki, możliwe jest dzięki dużej liczbie genów kodujących enzymy uczestniczące w biosyntezie tych hormonów i wielopoziomowej kontroli ich syntezy.

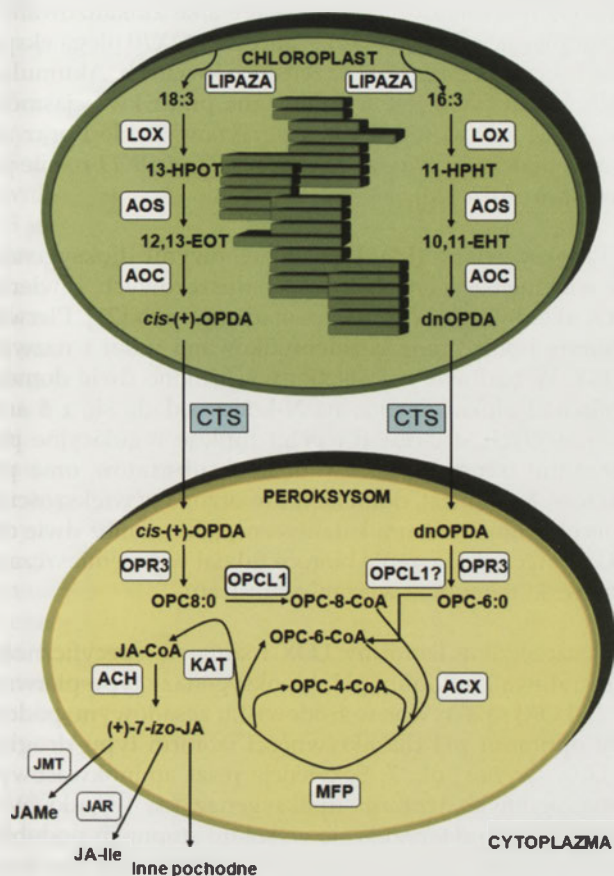
WPROWADZENIE

Jasmoniany są hormonami roślinnymi biorącymi udział w regulacji wielu procesów fizjologicznych, m. in. kiełkowania nasion, wzrostu korzenia, tworzenia organów zapasowych, kwitnienia, dojrzewania owoców oraz starzenia się liści [1]. Wpływają one także na ekspresję genów uczestniczących w reakcjach obronnych roślin, wywołanych biotycznymi i abiotycznymi czynnikami stresowymi. Zawartość tych fitohormonów w tkankach mieści się w granicach od 10 ng do nawet 3 µg na gram świeżej masy rośliny. Ich synteza jest zwykle bezpośrednio stymulowana niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi, np. uszkodzeniem mechanicznym, patogenami czy stresem osmotycznym. Proces biosyntezy jasmonianów najlepiej poznano w szlaku przekazywania sygnału zranienia, w dużej mierze dzięki mutantom oraz roślinom transgenicznym [1-4]. Wpływ na poziom jasmonianów mają także inne fitohormony, m. in. auksyny, etylen i salicylany [5-7]. Odkrycie receptora jasmonianów, białka COI1, sprawiło, że większość badań prowadzonych na przestrzeni kilku ostatnich lat dotyczy poznania molekularnych mechanizmów funkcjonowania tych fitohormonów. Szczegółowe omówienie tego zagadnienia zostało przedstawione przez Frankowskiego i in. [8]. Niniejsza praca stanowi podsumowanie aktualnych danych dotyczących regulacji biosyntezy jasmonianów, ze szczególnym uwzględnieniem badań prowadzonych na *Arabidopsis thaliana* i *Lycopersicon esculentum*.

BIOSYNTENZA JASMONIANÓW

Jasmoniany są pochodnymi wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Prekursorem jasmonianów jest kwas α-linolenowy (18:3) (LA), uwalniany z błon chloroplastowych przez lipazy (DAD1, DGL, PLA₂) [9]. Wyniki badań prowadzonych u rzodkiewnika pospolitego i pomidora wykazały, iż może on również powstać z kwasu 7Z, 10Z, 13Z-heksadekatrienowego (16:3) [10]. W następnym etapie obydwa związki prekursorowe ulegają dioksygenacji odpowiednio do kwasu 13(S)-hydroperoksy-9,12,15-oktadekatrienowego (13-HPOT) i kwasu 11(S)-hydroperoksy-heksadekatrienowego (11-HPHT) przy udziale 13-lipoksygenazy (13-LOX), enzymu kluczowego dla regulacji biosyntezy jasmonianów (Ryc. 1). Z 13-HPOT w obecności syntazy tlenu allenowego (AOS) powstaje niestabilny kwas 12,13(S)-epoksy-oktadekatrienowy (12,13(S)-EOT), który w środowisku wodnym spontanicznie hydrolizuje do α- i γ-ketoli. Natomiast, w reakcji enzymatycznej, katalizowanej przez cyklazę tlenu allenowego (AOC) 12,13(S)-EOT ulega cyklizacji do kwasu 12-oksofitodienowego (12-oxo-PDA, OPDA) [4]. Na tym etapie biosyntezy tworzony jest wyłącznie enancjomer *cis*-(9S,13S)-OPDA. Jednocześnie 11-HPHT może być przekształcony przez AOS do kwasu (11S)-10,11-epoksy-oktadekatrienowego (10,11-EHT), z którego w obecności AOC powstaje dinor-okso-fitodienowy (7S,11S)-dnOPDA.

Powstanie OPDA i dnOPDA jest ostatnim etapem biosyntezy jasmonianów zachodzącym w chloroplastach. Jednakże, dokładny mechanizm uwalniania obydwu związków z plastydów nie został do tej pory poznany. Nie zidentyfikowano również specyficznego transportera pośredniczącego w ich przemieszcza-



Rycina 1. Szlak biosyntezy jasmonianów. Szczegółowy opis w tekście (wg [8] zmodyfikowane).

niu do peroksysomów. W przypadku OPDA znaczącą rolę w tym procesie przypisuje się COMATOSE (CTS), określanemu również jako PXA1 lub PED3 [11]. CTS zawiera kasetę ABC (ang. *ATP-binding cassette*) i katalizuje zależne od ATP pobieranie substratów oraz ich β -oksydację w peroksysomach [12]. Natomiast, w niezależnym od CTS imporcie dnOPDA do peroksysomów, istotną rolę odgrywa prawdopodobnie różnica pH pomiędzy peroksysomami a cytoplazmą, co umożliwia bierny transport tego związku i jego zatrzymanie w peroksysomach (tzw. „pułapka anionów”).

W kolejnym etapie dochodzi do redukcji podwójnego wiązania w pierścieniu cyklopentenowym (9S,13S)-OPDA oraz (7S,11S)-dnOPDA przy udziale reduktazy OPDA (OPR3), i powstania odpowiednio kwasu 3-okso-2-(2'(Z)-pentenyl)-cyklopentano-1-oktanowego (OPC-8:0) i kwasu heksanowego (OPC-6:0) [13]. Następnie, ligaza OPC-8:CoA 1 (OPCL1) katalizuje przyłączenie CoA do reszty acetylowej OPC-8:0 i prawdopodobnie OPC-6:0.

Końcowy produkt w postaci izomeru kwasu (+)-7-izo-jasmonowego powstaje wskutek dwu- (dla OPC-6:0) lub trój etapowej (dla OPC-8:0) β -oksydacji, katalizowanej przez oksydazę acetylo-Co-A (ACX, ang. *acyl-CoA oxidase*), wielofunkcyjne białka (MFP, ang. *enoyl-CoA hydratase and β -hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase activities*) oraz tiolazę 3-keoacylo-CoA (KAT) [4]. Po przetransportowaniu do cytoplazmy może ulec on dalszym przemianom metabolicznym,

jak np. tworzyć fizjologicznie aktywne lub nieaktywne pochodne z aminokwasami, cukrami, a w reakcji katalizowanej przez metylotransferazę zostać przekształcony w ester metyloxy kwasu (+)-7-izo-jasmonowego [14].

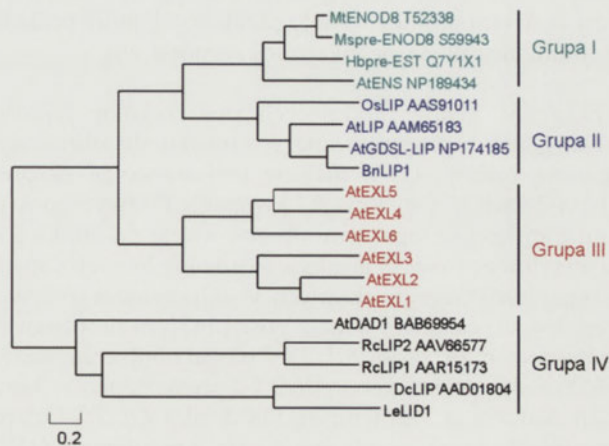
CHARAKTERYSTYKA I REGULACJA AKTYWNOŚCI ENZYMÓW ZAANGAŻOWANYCH W BIOSYNTĘZĘ JASMONIANÓW

LIPAZY

Ze względu na występowanie w lipazach charakterystycznych zachowanych w ewolucji sekwencji reszt aminokwasowych dzielimy je na dwie rodziny. Pierwsza z nich, nazywana zwykle „klasyczną”, posiada unikalną sekwencję GxSxG, natomiast druga sekwencję GDSL. Centrum katalityczne lipaz rodziny pierwszej stanowi triada reszt aminokwasowych (Ser-His-Asp/Glu), podczas gdy w centrum aktywnym enzymów z rodziny GDSL obecna jest sekwencja SDH.

Na podstawie analiz filogenetycznych, lipazy roślinne podzielono na 4 grupy (Ryc. 2). Białka grup I-III zawierają motyw GDSL charakterystyczny dla rodziny GDSL, natomiast białka grupy IV przypisano do lipaz rodziny GxSxG. Ekspresja genów kodujących białka grupy I zachodzi głównie w węzłach i korzeniach. Natomiast, białka grupy II obecne są w różnych tkankach i organach. Geny kodujące białka grupy III (głównie białka EXL) ulegają ekspresji w otoczce pyłku.

Dotychczas „klasyczne” lipazy sklonowano u papai, bobu, ryżu, pomidora i rącznika pospolitego. Mniej poznane są lipazy należące do rodziny GDSL. Niektóre z nich wyizolowano i scharakteryzowano jedynie u nielicznych gatunków roślin, jak np. rzodkiewnika pospolitego i słonecznika. Badania prowadzone na rzepaku wskazują, że u tego gatunku mogą występować lipazy zarówno z motywem GDSL, jak i GxSxG [15]. Poziom ekspresji genów kodujących lipazy jest różny w różnych organach i może być regulowany zarówno przez czynniki wewnętrzne, jak i zewnętrzne. U rącznika pospolitego, lipaza RcOBL1 (RcLIP1) występuje w ciałach oleistych endospermu, a gen kodujący to białko ule-



Rycina 2. Analiza filogenetyczna roślinnych lipoksygenaz (wg [24] zmodyfikowane).

ga ekspresji jedynie w dojrzałych nasionach bezpośrednio przed kiełkowaniem. Z kolei, u goździka obecność transkrypty genu *DcLIP* stwierdzono w liściach, podczas gdy u pomidora *LeLIP1* ulega ekspresji w kiełkujących nasionach, a poziom jego transkrypty jest zaledwie wykrywalny w liściach.

Wyniki badań przeprowadzonych na męskosterylnym mutancie *A. thaliana dad1* (ang. *defective in anther dehiscence1*) wykazały, że białko DAD1 jest fosfolipazą A1, a ekspresja *DAD1* zachodzi w komórkach epidermy liścia. Białko DAD1 uczestniczy w biosyntezie jasmonianów, która ma miejsce w późniejszych etapach odpowiedzi obronnej roślin na zranienie [9]. Sekwencje reszt aminokwasowych DAD1 z *A. thaliana* oraz niektórych lipaz grzybowych charakteryzują się znacznym podobieństwem, szczególnie w obrębie centrum katalitycznego. W genomie *A. thaliana* znajduje się 12 genów kodujących białka o sekwencjach homologicznych z DAD1. Ze względu na podobieństwo ich części N-końcowych oraz regionów katalitycznych wyróżniono 3 klasy białek DAD-like. N-koniec w białkach klasy I odpowiada za ich transport do chloroplastu, natomiast białka klasy II i III są transportowane odpowiednio do cytosolu i mitochondriów. Z kolei, białko DONGLE (DGL), homolog DAD1, jest zaangażowane w biosyntezę jasmonianów w pierwszej godzinie po zranieniu [9,16]. W indukowanej urazem mechanicznym biosyntezie jasmonianów uczestniczy również fosfolipaza D (PLD, ang. *phospholipase D*) i fosfolipaza A (PLA) PLA-1 γ 1 [9]. W hydrolizie lipidów i uwalnianiu kwasu α -linolenowego u *A. thaliana* uczestniczą cztery formy PLD. W odpowiedzi na zadziałanie czynnika stresowego następuje synteza PLD α , β , γ 1 oraz PLD γ 2. Lipazę uczestniczącą w wywołanej zranieniem biosyntezie jasmonianów zidentyfikowano również w plastydach *Nicotiana attenuata*, GLA1 [17].

LIPOKSYGENAZY

Lipoksygenazy roślinne są kodowane przez geny należące do dwóch rodzin: Lox1 i Lox2. W skład pierwszej z nich wchodzi większość dotychczas poznanych genów, kodujących białka o wysokim stopniu podobieństwa sekwencji reszt aminokwasowych (ok. 75%). Dodatkowo, peptydy te nie zawierają sekwencji sygnałowej kierującej je do chloroplastów. Natomiast, rodzinę Lox2 tworzą geny kodujące enzymy o niskim stopniu homologii (ok. 35%), które posiadają wspomnianą sekwencję lokalizacji komórkowej.

Ekspresja genów kodujących poszczególne izoformy lipoksygenaz jest specyficzna w stosunku do określonych organów rośliny. U *A. thaliana* wykazano, że ekspresja *AtLOX-2* zachodzi w liściach i kwiatach. Podwyższony poziom transkrypty tego genu obserwowano po aplikacji estru metylowego kwasu jasmonowego oraz lotnych substancji organicznych wytwarzanych w odpowiedzi rośliny na stres [18]. Co ciekawe, wraz z postępującym procesem starzenia poziom ekspresji *AtLOX-2* ulegał obniżeniu. Aktywność transkrypcyjną genu *AtLOX-3* stwierdzono w korzeniach. Natomiast, zarówno *AtLOX-3*, jak i *AtLOX-4* ulegają ekspresji w rozwijających się liściach, a poziom ich mRNA wzrasta pod wpływem egzogennych jasmonianów [19].

U kukurydzy zidentyfikowano dwa geny 13-LOX (*ZmLOX10* i *ZmLOX11*), kodujące białka zlokalizowane w chloroplastach [20]. Jak wykazano, *ZmLOX10* ulega ekspresji w liściach, a *ZmLOX11* w żeńskich kwiatach. Akumulacja mRNA *ZmLOX10* jest stymulowana przez kwas jasmonowy, kwas salicylowy, kwas abscysynowy, chłód oraz zranienie, podczas gdy poziom ekspresji *ZmLOX11* rośnie pod wpływem ABA [20].

Lipoksygenazy (LOX) są niehemowymi dioksygenazami wielonienasyconych kwasów tłuszczowych zawierających układ wiązań (1Z, 4Z) pentadienowych [21]. Pierwszą roślinną lipoksygenazę zidentyfikowano u soi i nazwano LOX1. W budowie tego białka wyróżniono dwie domeny. Domena I zlokalizowana na N-końcu składa się z 8 antyrównoległych struktur β i pełni funkcje regulacyjne przy wiązaniu, transporcie i uwalnianiu substratów oraz produktów. Natomiast, domena II utworzona w większości z α helis obejmuje centrum katalityczne, jak również dwie charakterystyczne kieszenie biorące udział w przemieszczaniu cząsteczki tlenu oraz wiązaniu substratu.

Poszczególne izoformy LOX różnią się specyficznością substratową i optimum pH. Lipoksygenazy typu pierwszej (1-LOX) są aktywne w środowisku zasadowym, podczas gdy optimum pH dla aktywności izoform typu drugiego (2-LOX) wynosi ok. 7. Sekwencje reszt aminokwasowych poszczególnych izoform lipoksygenaz (za wyjątkiem N-końców) charakteryzują się wysokim stopniem podobieństwa. Roślinne LOX są monomerycznymi białkami o masach cząsteczkowych 95–100 kDa. W części N-końcowej białka, o masie 25–30 kDa, występuje struktura β -beczki przypominająca budowę domenę C2 innych białek [22]. Centrum katalityczne LOX zawiera związany niehemowo atom żelaza. W wiązaniu metalu biorą udział trzy zachowane w ewolucji reszty His (499, 504, 690), zlokalizowana na karboksylowym końcu reszta Ile oraz atom tlenu cząsteczki wody. Szóstym potencjalnym ligandem biorącym udział w wiązaniu metalu jest atom tlenu pochodzący z Asp.

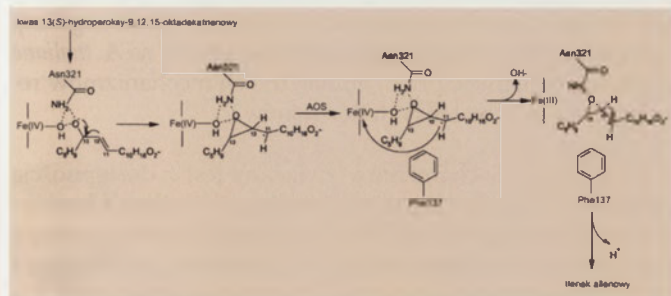
Ze względu na miejsce przyłączenia cząsteczki tlenu do substratu lipoksygenazy podzielono na dwie grupy. Pierwsza grupa, aktywna w cytosolu (9-LOX), katalizuje reakcje powstawania 9(S)-wodoronadtlenków kwasów tłuszczowych, podczas gdy grupa druga, aktywna w plastydach (13-LOX), bierze udział w tworzeniu 13(S)-wodoronadtlenków kwasów tłuszczowych [23]. U soi i ziemniaka zidentyfikowano także LOX, które wykazują podwójną aktywność, katalizują powstanie zarówno 9- jak i 13-wodoronadtlenków kwasów tłuszczowych. W biosyntezie kwasu jasmonowego kluczową rolę pełni 13-LOX, która dla aktywności katalitycznej wymaga obecności dwuwartościowych kationów (głównie Ca²⁺), dzięki czemu wiąże się z błoną chloroplastów [21]. U *A. thaliana* istnieją cztery formy 13-LOX: At-LOX 2, 3, 4 oraz 6 [24]. Wykazano, że zlokalizowana w błonach tylakoidów AtLOX2 odpowiada za wytwarzanie około 75% kwasu jasmonowego w uszkodzonych liściach. Co ciekawe, enzym ten odgrywa też kluczową rolę w powstawaniu nowego typu oksylipin (ang. *arabidopside*) zidentyfikowanych u *A. thaliana*, stworzonych przez rośliny w od-

powiedzi na czynniki stresowe i zaangażowanych w reakcje obronne [25].

SYNTAZY TLENKÓW ALLENOWYCH

Pierwszą syntazę tlenku allenowego zaangażowaną w biosyntezę jasmonianów sklonowano w nasion lnu. Geny AOS zidentyfikowano również u gwajuli srebrzystej, rzodkiewnika pospolitego, pomidora i jęczmienia. Ekspresja AOS jest zróżnicowana organowo, wysoka w kwiatach pomidora, mniejsza w łodygach i korzeniach, natomiast nie zachodzi w owocach i liściach. Badania prowadzone na *A. thaliana* wskazują również na istnienie zależności pomiędzy poziomem ekspresji AOS, a stadium rozwojowym poszczególnych tkanek. Gen ten ulega ekspresji we wczesnych etapach rozwoju słupka oraz jest zaangażowany w dojrzewanie ziaren pyłku. Wykazano, że podczas morfogenezy kwiatów ekspresja AOS jest skorelowana z poziomem endogennych jasmonianów oraz zapotrzebowaniem na te hormony w kształtujących się pylnikach. U *A. thaliana* zranienie stymuluje ekspresję AOS zarówno w miejscu zadziałania czynnika stresowego, jak i systemicznie. Natomiast, podanie egzogennej OPDA lub JA podnosi poziom transkryptu AOS tylko lokalnie. Mutanty AOS są męsko-sterylne, nie akumulują kwasu jasmonowego bezpośrednio po zranieniu oraz charakteryzują się obniżoną ekspresją genów, których aktywność jest indukowana przez JA.

AOS należą do podrodziny cytochromów P-450 (Cyt-450) nazywanej CYP74. W odróżnieniu od Cyt-450, enzymy z podrodziny CYP74 nie wymagają kofaktorów w postaci tlenu cząsteczkowego i NAD(P)H, a jako źródło równowagi redukcyjnej i zarazem donorów tlenu wykorzystują wodortlenki kwasów tłuszczowych. AOS wykazują różną specyficzność względem 9(S)- oraz 13(S)-wodoronadtlenków kwasów tłuszczowych [26]. Podczas, gdy większość cytochromów P-450 działa jako monooksygenazy, enzymy z podrodziny CYP74 przekształcają wodoronadtlenki kwasów tłuszczowych w różniące się strukturalnie produkty; 13-AOS katalizują powstanie kwasu 12,13(S)-epoksy-oktadekatrienowego (12,13(S)-EOT) i kwasu (11S)-10,11-epoksy-oktadekatrienowego (10,11-EHT), syntazy eteru dwuwinyłu (DES) przekształcają wodoronadtlenki kwasów tłuszczowych do eterów dwuwinylowych, a liazy wodoronadtlenkowe (HPL) produkują nietrwałe hemiacetale, które są następnie rozkładane do aldehydów i ω -kwasów tłuszczowych [27]. Wyniki prowadzonych badań wskazują, że punktowa mutacja może zmienić AOS w liazę wodoronadtlenkową [28].



Rycina 3. Schemat przebiegu reakcji katalizowanej przez syntazę tlenku allenowego. Szczegółowy opis w tekście (wg [7] zmodyfikowane).

13-AOS są syntetyzowane w cytosolu [4], a następnie transportowane do plastydów. Wyjątek stanowi AOS gwajuli srebrzystej, która na N-końcu nie zawiera 58-amino-kwasowej sekwencji tranzytowej, charakterystycznej dla 13-AOS kierowanych do chloroplastów. AOS łączą się z plastydami za pomocą dużych niepolarnych fragmentów znajdujących się na powierzchni enzymu [29].

AOS z lnu jest monomerem o masie 58,2 kDa [28]. C-ko-niec białka jest homologiczny do większości cytochromów P-450, zawierających hem wiążący cysteinę. Syntazy tlenków allenowych gwajuli oraz rzodkiewnika są strukturalnie podobne do klasycznych cytochromów P-450, grupa hemo-wa znajduje się między dwoma α -helisami, helisą I i helisą L o strukturze zachowanej w ewolucji. Ligandem związanego hemowo żelaza jest zlokalizowana w pętli pomiędzy helisami K' oraz L reszta cysteiny. W pętli tej znajduje się również sekwencja, składająca się z dziewięciu reszt amino-kwasowych, charakterystyczna dla enzymów CYP74, która sprawia, że wiązanie żelazo-siarka jest znacznie dłuższe u CYP74, niż u pozostałych cytochromów P-450. Wpływa to na właściwości redukcyjne związanego hemowo żelaza oraz specyficzność przeprowadzanej reakcji i powstającego produktu [28]. Enzymy z podrodziny CYP74 nie posiadają w helisie I zachowanego w ewolucji motywu (A/G)GxxT) odpowiadającego za wiązanie tlenu. W helisie I klasycznych cytochromów P-450 znajduje się umieszczona nad związanym hemowo żelazem reszta glicyny. Tymczasem w AOS gwajuli srebrzystej (N276) i rzodkiewnika (N321), podobnie jak w innych enzymach z podrodziny CYP74, miejsce to zajmuje reszta asparaginy (Asn321) (Ryc. 3). Grupa karboksamidowa łańcucha bocznego Asn321 jest istotna z katalicznego powodu, ponieważ wspomaga homolityczny rozpad wiązania między dwoma atomami tlenu w nad-tlenkowych substratach. Rodnik alkoksylowy (RO \cdot) dołącza do substratu między C11 a C12 tworząc epitenek pomiędzy węglem C12 a C13, C11 pozostaje z niesparowanym elektronem (C \cdot). Stabilność rodnika oraz karbokationu przy węglu C11 jest ważna dla funkcji katalitycznych AOS. Lee i in. [28] stawiają hipotezę, że pierścień aromatyczny fenyloalaniny w pozycji 137 (Phe137) może być istotny dla stabilności rodnika i dlatego odgrywa kluczową rolę dla specyficzności powstającego produktu w reakcjach katalizowanych przez CYP74. Reszta fenyloalaniny 137 występuje w sekwencjach wszystkich znanych AOS.

CYKLAZY TLENKÓW ALLENOWYCH

Gen kodujący cyklazę tlenku allenowego został po raz pierwszy wyizolowany z nasion kukurydzy, a kilka lat później AOC sklonowano u pomidora, rzodkiewnika pospolitego i jęczmienia. U pomidora i jęczmienia cyklaza tlenku allenowego kodowana jest przez pojedynczy gen, natomiast u rzodkiewnika pospolitego przez małą czteroelementową rodzinę (AOC1-4). Ekspresja AOC w roślinach tych zachodzi w wiązkach naczyniowych i jest stymulowana kwasem jasmonowym oraz systeminą (zbudowany z 18 reszt aminokwasowych peptyd, uwalniany z prosysteminy, uczestniczy w reakcjach obronnych roślin na stres) [30]. Dużą ilość AOC, której towarzyszy wysoki poziom endogennego JA i OPDA stwierdzono w szczegól-

nych częściach kwiatu pomidora. U *A. thaliana* ekspresja genów *AOC1-AOC4* jest indukowana zranieniem, a transkrypty badanych genów są obecne zarówno w bezpośrednim miejscu mechanicznego uszkodzenia, jak i innych częściach rośliny. Najwyższy poziom ekspresji wykazuje *AOC2*.

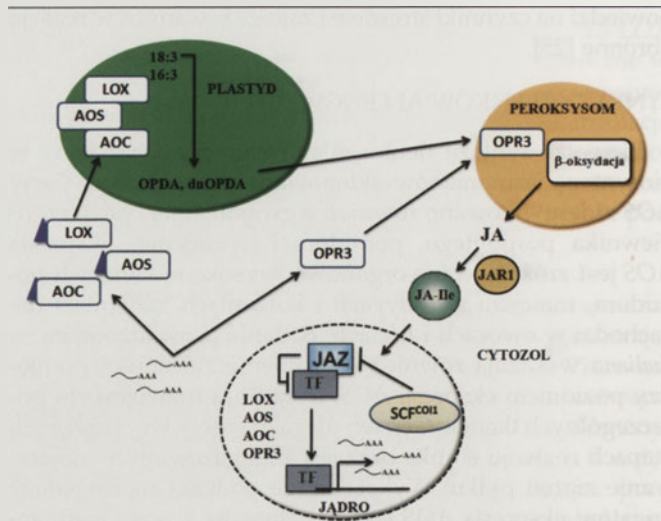
AOC należą do rodziny lipokalin. Enzymy te są syntetyzowane w cytosolu, a następnie dzięki zlokalizowanemu na N-końcu peptydowi sygnałowemu kierowane są do plastydów [31]. Biorąc pod uwagę fakt, że w wodnych roztworach cyklizacja tlenków allenowych następuje spontanicznie, AOC nie pełni funkcji katalizatora obniżającego energię aktywacji tej reakcji, a raczej przypomina działaniem białka opiekuńcze. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że to raczej czynniki białkowe narzucają ograniczenia dotyczące stereoizomeryczności substratów, a zachodząca pod wpływem AOC cyklizacja przeciwdziała spontanicznej reakcji [31]. Wiązanie substratu nie wymaga indukcji [32], proces ten podobnie jak prawidłowe ułożenie przestrzenne substratu (12,13(S)-EOT) ułatwiają hydrofobowe czynniki białkowe oraz nieliczne reakcje jonowe, obejmujące silnie związane cząsteczki wody i reszty glutaminy 23 (Glu23), która jest kluczowa dla aktywności AOC2 u *A. thaliana* [26]. Po przyłączeniu do AOC, tlen epoksydowy niestabilnego kwasu 12,13-EOT zostaje koordynacyjnie związany z cząsteczką wody. Delokalizacja podwójnego wiązania znajdującego się między C15 a C16 przy udziale reszty Glu23 pomaga w otwieraniu epitenku, a powstający anion tlenkowy jest stabilizowany przez wiązanie cząsteczki wody. Istotna dla stereospecyficzności reakcji cyklizacji, ostatniego etapu powstawania (9S,13S)-OPDA, jest izomeryzacja *trans-cis* wokół wiązania między C11 a C10 wymuszona przez hydrofobową część kieszeni wiążącej [26].

REDUKTAZA KWASU 12-OKSOFITODIENOWEGO

Reduktaza kwasu 12-oksofitodienowego (OPR3) należy do niewielkiej rodziny enzymów, które są zależne od mononukleotydu flawinowego (FMN) i katalizują, zachodzącą w peroksysomach, redukcję podwójnego wiązania znajdującego się między C10 a C11 w (9S,13S)-OPDA oraz (7S,11S)-dnOPDA [11,33]. Pierwszą OPR oczyszczono z zawiesiny kultur komórkowych *Corydalis sempervirens*. Kolejne zidentyfikowano u *A. thaliana*, *L. esculentum* oraz *Oryza sativa*.

Spośród trzech izoform OPR występujących u *A. thaliana* (OPR1-3), OPR3 wydaje się odgrywać kluczową rolę w redukcji (9S, 13S)-OPDA. Jak wykazano, mutanty *A. thaliana* z niefunkcyjnym genem *AtOPR3* są męsko-sterylne, co sugeruje, że aktywne białka OPR1 oraz OPR2 nie są w stanie zastąpić OPR3. Mimo, że OPR1 i OPR2 nie wpływają bezpośrednio na biosyntezę kwasu jasmonowego, to jednak usuwają (9R, 13R)-OPDA, który jest produktem spontanicznej cyklizacji kwasu 12,13-epoksytrienowego (prekursora OPDA), przez co zwiększają wydajność biosyntezy OPDA.

OPR3 z *L. esculentum* jest monomerycznym białkiem o masie cząsteczkowej 44,6 kDa. Enzym ten ma strukturę α/β -beczułki, w której 8 równoległych II rzędowych struktur β jest otoczonych przez 8 α -helis (β/α)₈ [33]. Taka budowa jest również charakterystyczna dla białka OPR1 oraz innych enzymów należących do rodziny flawoprotein OYE (Old



Rycina 4. Regulacja biosyntezy jasmonianów (wg [11]).

Yellow Enzyme). Niekowalencyjnie związany z enzymem FMN jest stabilizowany przez wiązania wodorowe i oddziaływania hydrofobowe. Helisa αA jest zlokalizowana w pętli L4 blisko centrum aktywnego enzymu i uczestniczy w polaryzacji grup karbonylowych substratu. Natomiast, dla regulacji aktywności enzymatycznej OPR3 istotna wydaje się być pętla L6. Ma ona kształt umożliwiający oddziaływanie z drugim protomerem, co blokuje wiązanie substratu.

Analiza krystalograficzna OPR u *L. esculentum* umożliwiła wyjaśnienie mechanizmu redukcji substratu, którego istotnym elementem jest NAD(P)H [33-35]. W pierwszej kolejności tlen pochodzący z grupy karbonylowej w pierścieniu cyklopentenowym łączy się wiązaniami wodorowymi z dwiema resztami His (His187 i His190 OPR1 u pomidora, His186 i His189 OPR1 u *A. thaliana*), co prowadzi do polaryzacji podwójnego wiązania α/β i aktywacji substratu. C _{β} jest akceptorem wodoru pochodzącego ze zredukowanego FMN, natomiast C _{α} ulega protonacji przy udziale reszty Tyr (Tyr192 u pomidora i Tyr191 u *A. thaliana*). Po redukcji pierścienia cyklopentenowego do cyklopentanowego, NAD(P)H redukuje FMN, który może być wykorzystany w kolejnym cyklu reakcji.

REGULACJA BIOSYNTETY JASMONIANÓW

Zmiany poziomu endogennych jasmonianów wywołane działaniem czynników wewnętrznych, jak i środowiskowych, wynikają ze złożonej regulacji na poziomie ekspresji genów kodujących enzymy ich biosyntezy oraz regulacji potranslacyjnej. Wyniki badań prowadzonych na *A. thaliana* wskazują na istnienie przynajmniej trzech mechanizmów regulujących biosyntezę tych hormonów.

Pierwszy z mechanizmów związany jest z dostępnością substratów [14]. Transgeniczne rośliny *A. thaliana* z konstytutywną nadekspresją AOS nie wykazują podwyższonego poziomu kwasu jasmonowego, ale zawierają go więcej niż rośliny typu dzikiego narażone na stres mechaniczny. Co więcej, w pełni rozwinięte liście *A. thaliana* mimo znacznej zawartości LOX, AOS, AOC charakteryzują się również sto-

sunkowo niskim poziomem OPDA i kwasu jasmonowego. Przejściowy wzrost poziomu jasmonianów następuje dopiero w odpowiedzi na zadziałanie bodźców zewnętrznych, np. zranienie, i ma miejsce jeszcze przed akumulacją transkryptów genów zaangażowanych w ich biosyntezę. Mechanizm regulacyjny związany z dostępnością substratów nie funkcjonuje jednak we wszystkich organach, np. rozwijających się kwiatach pomidora. Nadekspresja AOC w tej części rośliny prowadzi zazwyczaj do wzmożonej biosyntezy jasmonianów.

Kolejnym mechanizmem regulującym poziom jasmonianów jest pozytywne sprzężenie zwrotne funkcjonujące w szlaku przekazywania sygnału tych hormonów (Ryc. 4) [8]. Mechanizm ten odgrywa istotną rolę w tkankach znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie zadziałania czynnika stresowego, gdzie dochodzi do gwałtownego wzrostu zawartości kwasu jasmonowego [25]. Podniesienie poziomu jasmonianów aktywuje kompleks ligazy ubikwityny SCF^{CO1}, która wyznacza białka JAZ (represory transkrypcji) do degradacji w proteasomie 26S i prowadzi do uwolnienia z heterodimeru JAZ-MYC2 czynników transkrypcyjnych MYC2, które z kolei zwiększają aktywność transkrypcyjną genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę kwasu jasmonowego [19] (Ryc. 5).

U *A. thaliana* regulacja biosyntezy kwasu jasmonowego zachodzi także zgodnie z mechanizmem ujemnego sprzężenia zwrotnego. Przy niskim poziomie kwasu jasmonowego, czynnik transkrypcyjny AtMYC2 aktywuje ekspresję genu JAZ3 [36], którego produkt (JAZ3) wskutek oddziaływania z AtMYC2 hamuje zwrotnie aktywność transkrypcyjną JAZ3. Istnienie takiego mechanizmu pozwala na utrzymanie właściwego poziomu hormonu, który umożliwia wywołanie odpowiedniej reakcji fizjologicznej. Badania ostatnich lat wykazały, że kwas jasmonowy wzmacnia produkcję większości represorowych białek JAZ, co może wskazywać na udział innych niż MYC2 czynników transkrypcyjnych lub dowodzić istnienia innego mechanizmu regulacyjnego [8].

Znaczącym w regulacji biosyntezy kwasu jasmonowego jest zapewnienie odpowiedniego poziomu zarówno białka transportującego OPDA do peroksysomów (COMATOSE), jak i funkcjonalnego enzymu przekształcającego ten substrat w kwas jasmonowy (OPR3). Wykazano, że aktywne białko OPR3 funkcjonuje w postaci monomeru, a utworzenie ho-

modimeru prowadzi do zahamowania aktywności tego enzymu. U *L. esculentum* kluczową rolę w regulacji aktywności OPR3 odgrywa zlokalizowana w pętli L6 reszta Glu291, która bezpośrednio blokuje centrum aktywne. U mutantów, u których resztę Glu291 zastąpiono resztą Lys, OPR3 nie jest zdolna do homodimeryzacji. Regulacja aktywności OPR przez homodimeryzację jest charakterystyczna wyłącznie dla izoformy OPR3 [33]. Stwierdzono również, że w warunkach *in vitro* do stabilizacji procesu dimeryzacji niezbędne są jony siarczanowe, które ulokowane w pobliżu reszty Tyr364, imitują fosforylację tego aminokwasu zachodzącą w warunkach *in vivo*. Zatem, możliwe jest, że w warunkach *in vivo* procesy fosforylacji i defosforylacji reszty Tyr364 stanowią istotny element stabilizujący dimeryzację białka, a przez to regulujący jego aktywność [4,33].

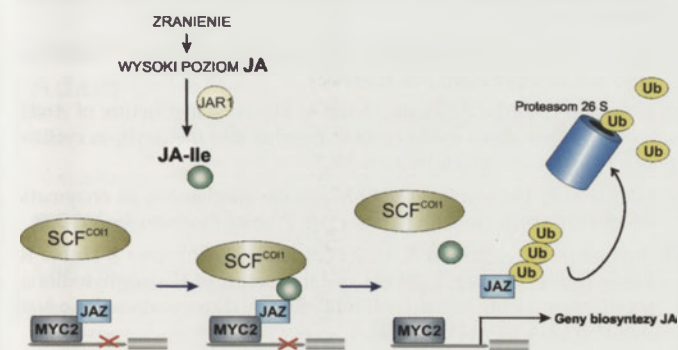
Istotna w regulacji poziomu jasmonianów jest także zróżnicowana czasowo i przestrzennie ekspresja genów kodujących poszczególne enzymy zaangażowane w biosyntezę tych hormonów. W korzeniach siewek *A. thaliana* ekspresja poszczególnych AOC1-4 zachodzi tylko w ściśle określonych stadiach rozwojowych [14]. Do podobnych wniosków doszli również autorzy prac, w których badano ekspresję AOS w różnych organach roślin *A. thaliana* i *N. tabacum*.

Biosynteza jasmonianów jest także zależna od wpływu innych hormonów, m. in. auksyn. Na podstawie badań prowadzonych u *A. thaliana* stwierdzono, że egzogeny IAA obniża poziom transkryptów genów *LOX*, *AOS*, *AOC* i *OPR3* [6]. W proces ten zaangażowane są również cząsteczki miRNA - głównie miR167 i miR319. Elementami docelowymi dla miR167 są transkrypty genów *ARF6* i *ARF8*, których produkty regulują m. in. wydłużanie łodygi kwiatowej i nitki pręcikowej, pęknięcie pylników, dojrzewanie słupków oraz otwieranie pąków kwiatowych [37]. Jak wykazano u *A. thaliana*, nadekspresja miR167 powoduje degradację transkryptów *ARF6* i *ARF8*, co prowadzi do zatrzymania rozwoju kwiatu. Niektóre cechy takiego fenotypu są konsekwencją obniżonej produkcji kwasu jasmonowego. W kwiatach podwójnych mutantów *arf6arf8* poziom kwasu jasmonowego znajduje się poniżej progu detekcji, co wskazuje, że *ARF6* i *8* są zaangażowane w proces syntezy tego hormonu. Na podstawie analizy promotorów genów *LOX2*, *AOS* i *OPR3* stwierdzono w nich obecność motywu AuxRE (ang. AUXIN RESPONSIVE ELEMENT) o sekwencji TGTCTC wiążącego czynniki transkrypcyjne ARF. Dodatkowo, w regulację ekspresji genu *LOX2* jest zaangażowany miR319, który kontroluje poziom transkryptu *TCP4* [38]. Produkt tego genu, białko *TCP4*, oddziałuje z odcinkiem promotorowym *LOX2* (GGACCA), jednak dokładny mechanizm tej regulacji nie został do końca poznany.

W regulację biosyntezy kwasu jasmonowego wpisują się również oddziaływania innych fitohormonów, jak etylen czy kwas salicylowy. Szczegółowe mechanizmy tych oddziaływań zostały opisane zarówno w polskich [39], jak i zagranicznych pracach przeglądowych [40].

PODSUMOWANIE

Jasmoniany, jako pochodne lipidowe, nie mają skomplikowanej budowy chemicznej, jednakże szlak ich biosynte-



Rycina 5. Model regulacji ekspresji genów indukowanych przez jasmoniany (wg [1] zmodyfikowane).

zy, obejmujący trzy przedziały komórkowe, jest złożony. Pierwszy etap powstawania jasmonianów zachodzi w chloroplastach, gdzie dzięki aktywności 13-LOX, AOS i AOC dochodzi do oksydacji kwasu 18:3 lub 16:3 i powstania odpowiednio OPDA lub dnOPDA. Obydwa związki będące bezpośrednimi prekursorami kwasu jasmonowego zostają przetransportowane do peroksysomów i przy udziale OPR3, ACX, MFP oraz KAT zostają najpierw zredukowane, a następnie podlegają β -oksydacji zakończonej powstaniem kwasu (+)-7-izo-jasmonowego. Ekspresja poszczególnych genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę jasmonianów jest organowo specyficzna, a ich produkty cechują się zróżnicowanymi właściwościami biochemicznymi, np. OPR3 mogąc tworzyć homodimer prowadzi do zahamowania swojej aktywności. Istotne znaczenie dla stabilności enzymów biorących udział w biosyntezie jasmonianów mają również procesy fosforylacji i defosforylacji białek. Dodatkowo w regulację biosyntezy jasmonianów wpisuje się funkcjonujący w szlaku przekazywania sygnału mechanizm pozytywnego sprzężenia zwrotnego. Tak złożony mechanizm regulacyjny wynika z udziału jasmonianów w kontroli wielu różnorodnych procesów fizjologicznych.

PIŚMIENNICTWO

- Avanci NC, Luche DD, Goldman GH, Goldman MHS (2010) Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genet Mol Res* 9: 484-505
- Wasternack C (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals Botany* 100: 681-697
- Browse J (2009) The power of mutants for investigating jasmonate biosynthesis and signaling. *Phytochem* 70: 1539-1546
- Schaller A, Stintzi A (2009) Enzymes in jasmonate biosynthesis – structure, function, regulation. *Phytochem* 70: 1532-1538
- Abe H, Ohnishi J, Narusaka M, Seo S, Narusaka Y, Tsuda S, Kobayashi M (2008) Function of jasmonate in response and tolerance of *Arabidopsis* to thrip feeding. *Plant Cell Physiol* 49: 68-80
- Reverberi M, Fanelli C, Zalic S, Briganti S, Picardo M, Ricelli A, Fabbri AA (2005) Relationship among lipoperoxides, jasmonates and indole-3-acetic acid formation in potato tuber after wounding. *Free Radic Res* 39: 637-47
- Koornneef A, Pieterse CMJ (2008) Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol* 146: 839-844
- Frankowski K, Świeżawska B, Wilmowicz E, Kęsy J, Kopcewicz J (2009) Szlak sygnałowy kwasu jasmonowego – nowe informacje. *Post Biochem* 55: 337-341
- Ellinger D, Stingl N, Kubigsteltig II, Bals T, Juenger M, Pollmann S, Berger S, Schuenemann D, Mueller MJ (2010) DONGLE and DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1 lipases are not essential for wound- and pathogen-induced jasmonate biosynthesis: redundant lipases contribute to jasmonate formation. *Plant Physiol* 153: 114-127
- Gfeller A, Dubugnon L, Liechti R, Farmer EE (2010) Jasmonate biochemical pathway. *Sci Signal* 3: cm3
- Acosta IF, Farmer EE (2010) Jasmonates: in the *Arabidopsis* book 8: e0129, doi/10.1199/tab.0129
- Theodoulou FL, Job K, Slocombe SP, Footitt S, Holdsworth M, Baker A, Larson TR, Graham IA (2005) Jasmonoic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiol* 137: 835-840
- Taki N, Sasaki-Sekimoto Y, Obayashi T, Kikuta A, Kobayashi K, Ainai T, Yagi K, Sakurai N, Suzuki H, Masuda T, Takamiya K, Shibata D, Kobayashi Y, Ohta H (2005) 12-Oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139: 1268-1283
- Delker C, Stenzel I, Hause B, Miersch O, Feussner I, Wasternack C (2006) Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* – enzymes, products, regulation. *Plant Biol* 8: 297-306
- Ling H, Zuo K, Zhao J, Qin J, Qiu C, Sun X, Tang K (2006) Isolation and characterization of a homologous to lipase gene from *Brassica napus*. *Russ J Plant Physiol* 53: 366-372
- Hyun Y, Choi S, Hwang HJ, Yu J, Nam SJ, Ko J, Park JY, Seo YS, Kim EY, Ryu SB, Kim WT, Lee YH, Kang H, Lee I (2008) Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis. *Dev Cell* 14: 183-192
- Kallenbach M, Alagna F, Baldwin IT, Bonaventure G (2010) *Nicotiana attenuata* SIPK, WIPK, NPR1 and fatty acid-amino acid conjugates participate in the induction of JA biosynthesis by affecting early enzymatic steps in the pathway. *Plant Physiol* 152: 96-106
- Kishimoto K, Matsui K, Ozawa R, Takabayashi J (2005) Volatile C6-aldehydes and Allo-ocimene activate defense genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 46: 1093-1102
- Chung HS, Koo AJK, Gao X, Jayanty S, Thines B, Jones AD, Howe GA (2008) Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol* 146: 952-964
- Nemchenko A, Kunze S, Feussner I, Kolomiets M (2006) Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. *J Exp Bot* 57: 3767-3779
- Schneider C, Pratt DA, Porter NA, Brash AR (2007) Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem Biol* 14: 473-488
- Corbin JA, Evans JH, Landgraf KE, Falke JJ (2007) Mechanism of specific membrane targeting by C2 domains: localized pools of target lipids enhance Ca²⁺ affinity. *Biochem* 46: 4322-4336
- Liavonchanka A, Feussner I (2006) Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *J Plant Physiol* 163: 348-357
- Bannenber G, Martínez M, Hamberg M, Castresana C (2009) Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids* 44: 85-95
- Glauser G, Grata E, Dubugnon L, Rudaz S, Farmer EE, Wolfender JL (2008) Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *J Biol Chem* 283: 16400-16407
- Schaller F, Zerbe F, Reinbothe S, Reinbothe C, Hofmann E, Pollmann S (2008) The allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana* – localization and cyclization. *FEBS J* 275: 2428-2441
- Stumpe M, Feussner I (2006) Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochem Rev* 5: 347-357
- Lee D-S, Nioche P, Hamberg M, Raman CS (2008) Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes. *Nature* 455: 363-368
- Farmaki T, Sanmartín M, Jiménez P, Paneque M, Sanz C, Vancanneyt G, León J, Sánchez-Serrano JJ (2007) Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. *J Exp Bot* 58: 555-568
- Schillmiller AL, Howe GA (2005) Systemic signaling in the wound response. *Cur Opin Plant Biol* 8: 369-377
- Hofmann E, Zerbe P, Schaller F (2006) The crystal structure of *Arabidopsis thaliana* allene oxide cyclase: insights into the oxylipin cyclization reaction. *Plant Cell* 18: 3201-3217
- Hofmann E, Pollmann S (2008) Molecular mechanism of enzymatic allene oxide cyclization in plants. *Plant Physiol Biochem* 46: 302-308
- Breithaupt C, Kurzbauer R, Lilie H, Schaller A, Stressner J, Huber R, Macheroux P, Clausen T (2006) Crystal structure of 12-oxophytodienoate reductase 3 from tomato: self-inhibition by dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14337-14342
- Fox BG, Malone TE, Johnson KA, Madson SE, Aceti M, Bingman CA, Blommel PG, Buchan B, Burns B, Cao J, Cornilescu C, Doreleijers J, Ellefson J, Frederick R, Geetha H, Hruba D, Jeon WB, Kimball T, Kunert

- J, Markley JL, Newman C, Olson A, Peterson FC, Phillips GN, Primm J, Ramirez B, Rosenberg NS, Runnels M, Seder K, Shaw J, Smith DW, Sreenath H, Song J, Sussman MR, Thao S, Troestler D, Tyler E, Tyler R, Ulrich E, Vinarov D, Vojtik F, Volkman BF, Wesenberg G, Wrobel RL, Zhang J, Zhao Q, Zolnai Z (2005) X-ray structure of *Arabidopsis* Atlg77680, 12-oxophytodienoate reductase isoform 1. *Proteins* 61: 206-208
35. Malone TE, Madson SE, Wrobel RL, Jeon WB, Rosenberg NS, Johnson KA, Bingman CA, Smith DW, Phillips GN, Markley JL, Fox BG (2005) X-ray structure of *Arabidopsis* At2g06050, 12-oxophytodienoate reductase isoform 3. *Proteins* 58: 243-245
36. Chini A, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, Garcia-Casado G, López-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signaling. *Nature* 448: 666-671
37. Nagpal P, Ellis Ch M, Weber H, Ploense SE, Barkawi LS, Guilfoyle TJ, Hagen G, Alonso JM, Cohen JD, Farmer EE, Ecker JR, Reed JW (2005) Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* 132: 4107-4118
38. Schommer C, Palatnik JF, Aggarwal P, Chételat A, Cubas P, Farmer EE, Nath U, Weigel D (2008) Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biol* 6:e230
39. Król P, Kępczyńska E (2008) Rola jasmonianów w indukowanej systemicznej odporności roślin przeciwko patogenom. *Biotechnol* 80: 122-135
40. Koornneef A, Pieterse CMJ (2008) Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol* 146: 839-844

Jasmonate biosynthesis – the latest discoveries

Emilia Wilmowicz[✉], Kamil Frankowski, Magdalena Sidłowska, Agata Kućko, Jacek Kęsy, Adam Gąsiorowski, Paulina Glazińska, Jan Kopcewicz

Chair of Plant Physiology and Biotechnology, Nicolaus Copernicus University, 9 Gagarina St., 87-100 Toruń, Poland

[✉]e-mail:emwil@umk.pl

Key words: jasmonate, biosynthesis, microRNA

ABSTRACT

Jasmonates are plant hormones involved in many growth and development processes. They also participate in plant defense responses. Current progress in the study on biosynthesis and signaling of jasmonates has contributed to the understanding of the mechanisms regulating concentration of these hormones in the cell. Sustaining a proper level of jasmonates allow the plant to respond appropriately to changing conditions. It is possible due to the large number of enzymes and genes involved in biosynthesis of these hormones as well as multilevel control of their expression.

Karolina Dębska

Renata Bogatek

Agnieszka Gniazdowska✉

Katedra Fizjologii Roślin, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Warszawa

✉Katedra Fizjologii Roślin, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; tel.: (22) 593 25 20, e-mail: agnieszka_gniazdowska@sggw.pl

Artykuł otrzymano 26 stycznia 2011 r.
Artykuł zaakceptowano 31 maja 2011 r.

Słowa kluczowe: karbonylacja białek, kiełkowanie nasion, reaktywne formy azotu, reaktywne formy tlenu

Wykaz skrótów: APX – peroksydaza askorbinianowa; CAT – katalaza; GR – reduktaza glutationowa; GSNO – nitrozoglutation; GSNOR – reduktaza S-nitrozoglutationu; GSSG – forma utleniona glutationu; RCS – reaktywne pochodne karbonylowe; RFA – reaktywne formy azotu; RFT – reaktywne formy tlenu; SOD – dysmutaza nadadtlenkowa

Podziękowania: Badania karbonylacji białek nasion jabłoni podczas usuwania spoczynku i kiełkowania zostały zapoczątkowane i następnie kontynuowane w ramach projektów badawczych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego NN303 090534 oraz NN 303 5522 39.

STRESZCZENIE

Reaktywne formy tlenu (RFT) pojawiają się w komórkach organizmów roślinnych, w prawie wszystkich organellach komórkowych jako cząsteczki sygnałowe, oraz w odpowiedzi na działanie różnego rodzaju stresów. Rośliny wykorzystują RFT jako wtórne przekazniki informacji w regulacji wielu procesów fizjologicznych, takich jak np. dojrzewanie owoców, starzenie liści czy kiełkowanie nasion. Analiza efektów pojawienia się stresu oksydacyjnego coraz częściej obejmuje modyfikacje strukturalne białek wywołane przez RFT. Należy do nich m.in. modyfikacja reszt aminokwasowych przez tworzenie grup karbonylowych. Prowadzi ona do zmiany aktywności białka lub pełni rolę znacznika kierującego białko na drogę proteolizy. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie najnowszych danych dotyczących karbonylacji białek w organizmach roślinnych. Dyskutujemy także współdziałanie RFT i reaktywnych form azotu (RFA) w procesie utleniania białek w komórkach roślinnych.

WPROWADZENIE - REAKTYWNE FORMY TLENU, ROLA FIZJOLOGICZNA I REGULACJA ICH STĘŻENIA W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

Do reaktywnych form tlenu (RFT) zalicza się wzbudzone cząsteczki tlenu: (i) tlen singletowy (1O_2), który ma dwa sparowane elektrony na jednym orbitalu lub po elektronie na każdym z dwóch orbitali, (ii) nadtlenek wodoru (H_2O_2), będący produktem dysmutacji spontanicznej anionorodnika nadadtlenkowego (O_2^-) w warunkach kwaśnego pH lub dysmutacji tej cząsteczki katalizowanej przez dysmutazę nadadtlenkową (SOD) oraz (iii) wolne rodniki tlenowe. Do wolnych rodników tlenowych zaliczane są między innymi: wspomniany wcześniej O_2^- ; powstający wskutek jednoelektronowej redukcji O_2 lub w wyniku reakcji katalizowanej przez oksydazę NADPH [1] oraz rodnik hydroksylowy (OH) będący produktem reakcji O_2^- z H_2O_2 (reakcja Haber-Weiss, która w warunkach fizjologicznych zachodzi bardzo wolno) lub reakcji Fentona, w której uczestniczą niezwiązane przez białko jony metali. Wśród wolnych rodników wyróżniamy ponadto rodniki organiczne np.: alkoksylowe (RO), nadtlenkowe (ROO), acyloksylowe (RCOO) powstające w reakcjach wolnych rodników tlenowych ze związkami organicznymi obecnymi w komórce.

RFT są wytwarzane na terenie komórki roślinnej w cytoplazmie, chloroplastach, mitochondriach, peroksyzomach i ścianie komórkowej. Jednym z głównych źródeł RFT są łańcuchy transportu elektronów. Podczas transportu elektronów w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów, RFT w postaci O_2^- mogą być wytwarzane w (i) kompleksie I i uwalniane do matriks, (ii) kompleksie III, z którego są uwalniane do matriks oraz przestrzeni międzybłonowej [2-4]. Produkcja RFT może również następować w trakcie transportu zwrotnego elektronów z kompleksu II na kompleks I [2]. Powstający wówczas O_2^- może być transportowany przez błonę mitochondrialną poprzez zależne od napięcia kanały anionowe (VDAC, ang. *voltage-dependent anion channel*) lub ulega enzymatycznemu przekształceniu do H_2O_2 (przy udziale SOD, peroksydazy askorbinianowej (APX), peroksyredoksyny). H_2O_2 jest następnie transportowany przez akwaporyny do cytoplazmy [3].

W chloroplastach, RFT są generowane podczas transportu elektronów z fotoukładu I na O_2 oraz w wyniku transportu elektronów z ferredoksyny na O_2 w reakcji Mehlera [4,5]. W fotoukładzie II, w warunkach nadmiernej redukcji fotosyntetycznych przenośników, po wzbudzeniu stanu trypletowego chlorofilu generowany jest 1O_2 [4-6]. W chloroplastach, podobnie jak w mitochondriach O_2^- ulega przekształceniu do H_2O_2 przy udziale SOD, a następnie detoksykacji do H_2O w obecności askorbinianu [5]. W roślinach C3, gdy spada dostępność dwutlenku węgla (CO_2), karboksylaza/oksygenaza rybulozo1,5-bisfosforanu (Rubisco) katalizuje reakcję oksygenacji rybulozo1,5-bisfosforanu, w następstwie czego uruchamiane jest fotooddychanie. Współdziałanie chloroplastów i peroksyzomów w tym cyklu metabolicznym prowadzi do powstawania H_2O_2 w

peroksysomach dzięki aktywności oksydazy glikolanowej [5,7]. Peroksysomy roślinne są zatem głównymi organellami odpowiedzialnymi za wewnątrzkomórkową produkcję H_2O_2 . W starzejących się liściach peroksysomy przekształcają się w glioksysomy. Wykazano, że w organellach tych dochodzi do wzrostu aktywności oksydazy ksantynowej i oksydazy moczanowej. Produktem aktywności oksydazy ksantynowej jest $O_2^{\cdot-}$, natomiast produktem aktywności oksydazy moczanowej jest H_2O_2 . W starzejących się liściach indukowane są też inne procesy prowadzące do wzrostu stężenia RFT. W błonie peroksysomów występuje krótki łańcuch transportu elektronów złożony z flawoproteiny, reduktazy NADPH oraz cytochromu, który odpowiada za wytwarzanie $O_2^{\cdot-}$ [7]. Znaczne ilości RFT powstają w peroksysomach także w procesie β -oksydacji kwasów tłuszczowych, w enzymatycznej reakcji z udziałem oksydaz flawinowych oraz w procesie dysproporcjonowania $O_2^{\cdot-}$ [7,8].

Obecna w błonie cytoplazmatycznej oksydaza NADPH również uczestniczy w redukcji O_2 do $O_2^{\cdot-}$, który zostaje przekształcony do OH przez peroksydazy ściany komórkowej [1,9]. Powstający OH uczestniczy np. w rozluźnianiu ściany komórkowej w wyniku, czego możliwe jest wydłużanie komórek [9]. Prawdopodobnie „ciągnięcie” łańcuchów polisacharydowych tworzących ścianę komórkową następuje w pobliżu miejsca syntezy RFT [10]. Takie rozluźnienie struktury ściany komórkowej obserwuje się np. w trakcie wydłużania osi zarodkowej w czasie kiełkowania nasion [10,11].

W warunkach zbyt wysokiego stężenia RFT, komórka znajduje się w stanie stresu oksydacyjnego. W celu przeciwdziałania niekontrolowanemu wzrostowi stężenia RFT, w komórce aktywowany jest system antyoksydacyjny. Głównymi elementami enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego są: SOD usuwająca $O_2^{\cdot-}$, katalaza (CAT) i peroksydazy (Prx) przekształcające H_2O_2 do H_2O i O_2 [6]. Oprócz wyżej wymienionych enzymów istotne znaczenie mają również: reduktaza glutationowa (GR), reduktaza monodehydroaskorbinianowa (MDAR), reduktaza dehydroaskorbinianowa (DHAR), peroksydaza askorbinianowa (APX), reduktaza tioredoksyny (TrxR). Natomiast do niskocząsteczkowych nieenzymatycznych antyoksydantów zaliczamy: glutation (GSH), askorbinian (AsA) (przeciwutleniacze hydrofilowe), melatoninę (przeciwutleniacz o właściwościach hydrofilnych i hydrofobowych), tokoferole, karotenoidy (przeciwutleniacze hydrofobowe), tioredoksyny [12,13].

Działanie RFT nie ogranicza się tylko do odpowiedzi komórki na stres biotyczny lub abiotyczny [14,15]. Uczestniczą one w przekazywaniu sygnałów [16] oraz biorą udział w regulacji przebiegu szeregu procesów fizjologicznych, takich jak: ustępowanie spoczynku [17] oraz kiełkowanie nasion [18,19], starzenie liści [20,21], starzenie owoców [22], wydłużanie komórek [10,11,18], rozwój włókników [9] oraz ruchy aparatów szparkowych [23]. Z badań przeprowadzonych na nasionach różnych roślin wynika, że odpowiednie stężenie RFT jest potrzebne zarówno do ustąpienia spoczynku jak i kiełkowania [18,24,25]. Znaczenie RFT w biologii nasion zostało szczegółowo opisane w pracach przeglądowych w języku polskim [25,26].

Reaktywne cząsteczki, będące ubocznym produktem metabolizmu tlenowego reagują ze znajdującymi się w komórce: białkami, lipidami, cukrami oraz kwasami nukleinowymi. W dalszej części pracy skupiono się przede wszystkim na reakcjach RFT z białkami.

Zmiany struktury białek, będące wynikiem oddziaływań z RFT, w znaczny sposób wpływają na metabolizm komórki. Modyfikacje białek wywołane przez RFT polegają na ich utlenieniu, w tym między innymi karbonylacji, przez utworzenie grupy karbonylowej w niektórych resztach aminokwasowych [27-30]. W ostatnich latach coraz większą uwagę poświęca się identyfikacji białek ulegających karbonylacji w tkankach roślinnych i znaczeniu tego procesu w fizjologii roślin. Do takich modyfikacji dochodzi podczas niekorzystnych warunków środowiska spowodowanych obecnością metali ciężkich np. kadmu [31-33], rtęci [33,34], ołowiu, aluminium, cynku, miedzi, kobaltu, niklu, chromu [33], a także w atmosferze o podwyższonym stężeniu CO_2 [35], w stresie chłodu [36-38], suszy [39], zasolenia [40] lub po zastosowaniu herbicydów [37]. Z drugiej strony coraz więcej danych, wskazuje, że karbonylacja białek zachodzi również w trakcie niezakłóconego rozwoju roślin [28], w czasie starzenia [41,42] oraz podczas ustępowania spoczynku jak również w procesie kiełkowania nasion [17,28]. Powszechność występowania karbonylowanych białek powoduje, że proponuje się uznanie ich za jeden z markerów stresu oksydacyjnego [29,30]. Juszczuk i współautorzy [43] podkreślają, że wysokie stężenie karbonylowanych białek może sygnalizować wysoki poziom RFT w komórce, któremu nie jest w stanie przeciwdziałać system antyoksydacyjny. Zaletą karbonylowanych białek stosowanych jako znacznik stresu oksydacyjnego jest ich względnie duża stabilność oraz łatwe i niedrogi metody detekcji [30].

Niniejsza praca stanowi próbę podsumowania istniejących dotychczas informacji dotyczących roli karbonylowanych białek w organizmach roślinnych. Zagadnienie to, dopiero od kilku lat stanowi przedmiot zainteresowania biochemików i fizjologów roślin, dlatego w niektórych przypadkach, posłużono się odniesieniami do prac wykonanych na innych organizmach (bakterie, grzyby, tkanki zwierzęce).

MODYFIKACJE BIAŁEK WYWOŁANE PRZEZ RFT

Pod wpływem RFT białka ulegają utlenieniu. Działanie RFT na grupy sulfhydrylowe białek prowadzi do powstania mostków disiarczkowych (RS=SR) lub grup sulfenianowych (R-SOH), sulfinianowych (R-SO₂H), sulfonianowych (R-SO₃H). Utlenienie może być odwracalne, gdy powstają RS=SR, R-SOH lub nieodwracalne, gdy tworzą się: R-SO₂H, R-SO₃H [4,6,44,45]. Wynikiem tych modyfikacji może być uzyskanie bądź utrata funkcji białka [45,46]. Oksydacyjnym modyfikacjom mogą ulegać wszystkie białkowe i niebiałkowe grupy tiolowe [45]. W przypadku białek niezależne od stanu redoks komórki najbardziej podatne na modyfikacje są grupy tiolowe mające istotne znaczenie dla aktywności białka [45].

Oddziaływanie RFT na cząsteczkę białka nie zawsze kończy się utlenieniem reszt siarkowych cysteiny, może też prowadzić do karbonylacji. Karbonylacja polega na utworzeniu grupy karbonylowej (ketonowej lub aldehydowej) w resztach takich aminokwasów jak: lizyna, prolina, treonina, czy arginina [30]. W wyniku tej reakcji z reszty proliny powstaje 2-pirolidon, z reszty argininy semialdehyd glutaminowy, z reszty lizyny semialdehyd aminoadypinowy, natomiast z reszty treoniny kwas 2-amino-3-ketomasłowy [30]. Skutkiem takiej modyfikacji jest zmiana konformacji białka, co z kolei wpływa na jego funkcję. Niektórzy badacze rozróżniają karbonylację bezpośrednią (ang. *primary protein carbonylation*) oraz karbonylację pośrednią (ang. *secondary protein carbonylation*) [30,47,48]. O karbonylacji bezpośredniej mówi się w przypadku bezpośredniego, katalizowanego przez jony metali ataku oksydacyjnego (MCO, ang. *metal catalyzed oxidative attack*) na wyżej wymienione reszty aminokwasowe [21]. Natomiast modyfikacje pośrednie polegają na oddziaływaniu reaktywnych pochodnych karbonylowych (RCS, ang. *reactive carbonyl species*) na reszty cysteinowe, histydynowe oraz lizynowe. Do RCS zaliczamy produkty peroksydacji lipidów: 4-hydrokso-trans-nonenal (HNE), aldehyd akrylowy (akroleina, ACR), glioksal (GO), dialdehyd malonowy (MDA) i metyloglioksal (MGO) [30,47,49,50]. Powstające w wyniku utlenienia lipidów związki mogą reagować z grupą aminową reszty lizyny, grupą imidazolową reszty histydyny lub z grupą sulfhydrylową reszty cysteiny. Do RCS zalicza się również związki powstające w reakcji RFT z cukrami redukującymi lub produktami ich utlenienia (ketoaminami, ketoaldehydami). W tym przypadku RCS są przyłączane do grupy aminowej reszty lizyny [30,47,49,50], a następstwem reakcji jest powstanie końcowych produktów glikacji (AGE, ang. *advanced glycation end products*) [50]. Wydaje się jednak, że podział na karbonylację bezpośrednią i pośrednią nie ma większego znaczenia fizjologicznego, ponieważ do tej pory nie stwierdzono różnic między białkami zawierającymi grupy karbonylowe będącymi wynikiem bezpośredniego oddziaływania z RFT, a białkami karbonylowanymi w reakcji z RCS [30]. Natomiast należy zwrócić uwagę, że liczebność karbonylowanych białek może w znacznym stopniu ulec zmniejszeniu przez podanie związków usuwających RCS. Wykazano, że np. proantocyjanidyna B2, obecna w korze cynamonowca (*Cinnamomum*) hamuje tworzenie końcowych produktów glikacji [51].

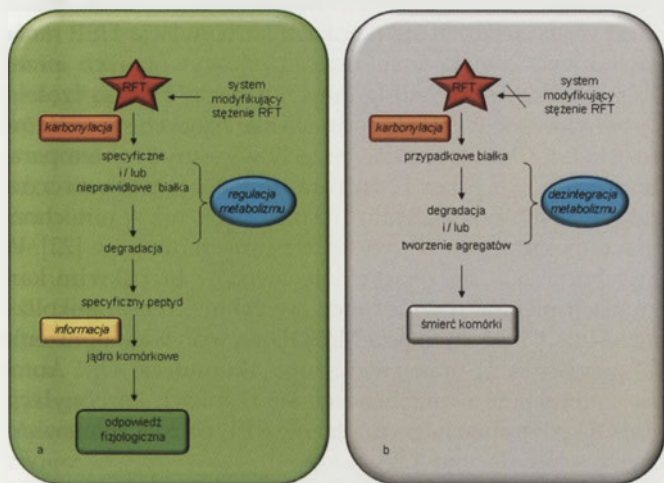
Uważa się, że zakres zmian oksydacyjnych, którym podlega dane białko zależy od wielu czynników, do których zalicza się między innymi: stężenie i lokalizację samego białka oraz utleniacza, szybkość reakcji białka z utleniaczem oraz miejsce powstawania utleniacza i funkcjonowanie systemu antyoksydacyjnego [27]. Regulacja stężenia RFT jest bardzo ważna szczególnie wtedy, gdy organizm znajduje się w warunkach stresu. Wykazano, że tiamina gromadzona w siewkach rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*), poddanego działaniu stresu: solnego, cieplnego, osmotycznego lub oksydacyjnego, może ograniczać akumulację RFT (głównie H_2O_2) oraz karbonylowanych białek [52]. Stężenie H_2O_2 w siewkach traktowanych parakwatem i tiaminą było niższe niż w siewkach rosnących na pożywce zawierającej tylko parakwat. Znaczne obniżenie ilości grup karbonylowanych

białek oznaczono w siewkach rzodkiewnika rosnących na pożywce z parakwatem po podaniu tiaminy [52].

Sugeruje się, że chociaż karbonylacji podlegają wszystkie białka, to niektóre wydają się być bardziej podatne na tę modyfikację i w zależności od rodzaju utleniacza następuje ona w określonym miejscu cząsteczki [47]. Ilość powstających grup karbonylowych może być uwarunkowana strukturą przestrzenną białka. Przykładem jest krucyferyna (białko zapasowe nasion rzodkiewnika), której podjednostka α jest łatwiej i szybciej karbonylowana w porównaniu, z podjednostką β mniej eksponowaną na zewnątrz struktury białka [53]. Podobnie wykazano, że aktywność dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego (GAPDH) jest hamowana pod wpływem HNE [54]. Zmiana aktywności tego enzymu następuje na skutek modyfikacji reszt histydyny-164 oraz cysteiny-281 znajdujących się na powierzchni białka, a nie jak wcześniej sądzono, reszty cysteiny zlokalizowanej w miejscu katalitycznym [54]. Wskazuje to, że reszty cysteilo-we, histydylowe oraz lizylowe znajdujące się na powierzchni białka są łatwiej modyfikowane. Z kolei wyniki badań Wong i współpracowników [48] uzyskane na materiale zwierzęcym sugerują, że proces karbonylacji konkretnych białek może być determinowany rodzajem RFT.

DEGRADACJA BIAŁEK ZMODYFIKOWANYCH ZA POŚREDNICTWEM RFT

Białka uważa się za cząsteczki najczęściej modyfikowane przez RFT [27]. Gębicki i Bartosz [55] sugerują, że lipidy i kwasy nukleinowe są wtórnymi obiektami ataku RFT. Poza tym białka mogą ulegać uszkodzeniu nawet wtedy, gdy głównym celem ataku RFT są lipidy błonowe lub kwasy nukleinowe. Białka modyfikowane w wyniku karbonylacji ulegają degradacji na drodze proteolizy [56] lub autofagii [57], chociaż znane są też przykłady takich białek, które po karbonylacji nie są degradowane [48]. Do tej pory nie wiadomo, dlaczego białka po karbonylacji są bardziej podatne na atak proteolityczny. Można przypuszczać, że grupy karbonylowe stanowią pewnego rodzaju znacznik, dzięki któremu białka naznaczone są do degradacji [6,43,58]. Degradacja karbonylowanych białek odbywa się głównie przy udziale proteasomów 26S [59]. Wzmoczoną degradację zmodyfikowanych białek obserwuje się w roślinach poddanych różnym warunkom stresowym. W liściach grochu (*Pisum sativum*), po podaniu jonów kadmu ($50 \mu M CdCl_2$), zauważono nie tylko akumulację karbonylowanych białek, ale także wzrost aktywności endoproteaz [31]. Przypuszcza się, że fizjologiczny sens wzmoczonej karbonylacji białek i towarzyszący jej wzrost aktywności proteolitycznej może być związany z zabezpieczeniem dostarczania aminokwasów niezbędnych do syntezy białek *de novo* [21]. Wówczas, sprawny system degradacji zmodyfikowanych białek mógłby być ważnym mechanizmem zwiększającym tolerancję roślin na stres. W takim układzie proteoliza karbonylowanych białek np. w liściach słonecznika (*Helianthus annuus*), w stresie związanym z obecnością kadmu ($100-300 \mu M$), mogłaby dostarczać aminokwasów do syntezy białek wiążących metale ciężkie [32]. Warto także zwrócić uwagę na fakt, że w mitochondriach, chloroplastach lub peroksysomach, w których produkcja RFT i karbonylowanych białek jest intensywna,



Rycina 1. Hipotetyczny model obrazujący dwie strategie działania RFT. RFT mogą uczestniczyć w przekazywaniu sygnału, a ich stężenie jest kontrolowane przez sprawnie działający system modyfikujący stężenie RFT. Metabolizm komórki może być regulowany dzięki karbonylacji pewnych białek, które następnie są degradowane (a). W warunkach zbyt wysokiego stężenia RFT może dochodzić do masowej karbonylacji białek, a proces ten wymyka się spod kontroli systemu modyfikującego stężenie RFT. Wówczas, modyfikowane białka w większości tworzą w komórce agregaty (b).

obecne są nie tylko enzymy systemu antyoksydacyjnego, ale również aktywne proteazy [43,58].

Jak już wspomniano, nie wszystkie białka po karbonylacji są degradowane, część z nich może tworzyć agregaty, które akumulują się w komórce (Ryc. 1b). Zahamowanie proteolizy może być efektem powstania grup zmodyfikowanych białek, niewrażliwych na degradację i skutecznie blokujących proteasom [21]. Nagromadzenie takich agregatów białkowych może w rezultacie prowadzić do śmierci komórki (Ryc. 1b). Stwierdzono, że wzrost karbonylacji białek w czasie starzenia może być związany właśnie z gromadzeniem się w komórce agregatów białkowych, a nie ze spadkiem aktywności enzymów systemu antyoksydacyjnego [21,60]. Taką sytuację obserwowano w komórkach pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*) [61]. Podczas detekcji karbonylowanych białek nie wykazano zmian ich mas molekularnych, co dowodzi pośrednio, że białka te nie były degradowane. Ponadto zmiana warunków kultury bakterii z tlenowych na beztlenowe, w celu zahamowania karbonylacji, nie spowodowała zmniejszenia zawartości zmodyfikowanych białek [61].

Zarówno u roślin jak i u zwierząt obserwuje się znacznie niższą zawartość karbonylowanych białek w fazie generatywnej mimo tego, że w ontogenezie tych organizmów następuje przejściowe nagromadzenie zmodyfikowanych białek [41]. Nie można wykluczyć, że zjawisko to może mieć związek albo ze wzrostem aktywności mechanizmów odpowiedzialnych za degradację białek o zmienionej strukturze, lub ze wzrostem aktywności systemu antyoksydacyjnego usuwającego RFT. Na tym tle interesujące są wyniki doświadczeń, w których zbadano zmiany zawartości karbonylowanych białek w liściach rzodkiewnika w jego cyklu życiowym [41]. Okazało się, że w fazie wegetatywnej dochodzi do stopniowego gromadzenia się karbonylowanych białek, po czym, tuż przed rozpoczęciem kwitnienia (około 20 dnia kultury) ich zawartość spada. W trakcie kwitnie-

nia rzodkiewnika zawartość karbonylowanych białek w liściach nie ulegała zmianie i była podobna do zawartości zmodyfikowanych białek, jaką obserwowano w pierwszych dniach fazy wegetatywnej [41]. Z doświadczeń przeprowadzonych na drożdżach (*Saccharomyces cerevisiae*) wynika, że komórki potomne zawierają niewiele karbonylowanych białek w porównaniu z komórkami macierzystymi, u których wraz ze wzrostem liczby podziałów wzrasta ilość zmodyfikowanych białek [62]. Białka te pozostają na terenie komórki macierzystej i nie są kierowane do komórki potomnej. Należy tu jednak zwrócić uwagę na fakt, że komórki drożdży ulegają wielokrotnym podziałom, po których stają się fenotypowo starsze (akumulują się w nich niefunkcjonalne mitochondria i pozachromosomowy kolisty rDNA). Komórki te jednak zachowują zdolność do podziałów. Na razie nie wyjaśniono, w jaki sposób w komórkach drożdży nie dochodzi do przekazania zmodyfikowanych białek do komórek potomnych [62].

ZNACZENIE FIZJOLOGICZNE KARBONYLACJI BIAŁEK

Karbonylacja, poprzez wpływ na aktywność specyficznych białek, może regulować reakcję fizjologiczną organizmu na warunki środowiska [32,33]. W siewkach ogórka (*Cucumis sativus*) rosnących na podłożu z 250 i 500 μM ołowiem zaobserwowano wysoki poziom karbonylowanych białek [34]. Siewki te jednocześnie charakteryzowały się niską aktywnością CAT i APX. Natomiast w siewkach rozwijających się na podłożu zawierającym ołów w niższych stężeniach (0,5; 50 μM) lub na podłożu bez metalu ciężkiego obserwowano wyższą aktywność enzymów systemu antyoksydacyjnego oraz mniejszą zawartość grup karbonylowych w białkach. Biorąc to pod uwagę, nie można wykluczyć, że wzrost stężenia RFT w warunkach stresowych może być skutkiem niskiej aktywności niektórych enzymów systemu antyoksydacyjnego, wynikającej np. z ich karbonylacji [6]. I tak, zwiększoną karbonylację SOD, CAT oraz GR zaobserwowano w ekstraktach z liści grochu rosnącego w obecności 50 μM kadmu [31]. Podobnie, w peroksysomach izolowanych z bielma nasion fasoli (*Phaseolus vulgaris*) traktowanych OH obserwowano karbonylację CAT, skorelowaną jednocześnie z obniżeniem aktywności tego enzymu [63].

Z drugiej strony, wzrost ilości grup karbonylowych białek w ekstraktach z komórek *E. coli* traktowanych streptomycyną (0,01-1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) nie powodował zahamowania aktywności enzymów systemu antyoksydacyjnego: SOD, CAT oraz wzrostu stężenia O_2^- [64]. Podobną karbonylację białek obserwowano u *E. coli* po podaniu streptomycyny w wyższym stężeniu (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) [61]. Można więc przypuszczać, że zawartość zmodyfikowanych białek pojawiających się u *E. coli* nie jest bezpośrednim rezultatem stresu oksydacyjnego, wyrażającego się zwiększonym stężeniem RFT, tym bardziej, że karbonylacja może być spowodowana także działaniem produktów utleniania lipidów. Karbonylacja białek nie byłaby zatem limitowana tylko produkcją RFT. Autorzy wskazują, że w tym przypadku nasilenie karbonylacji zależy prawdopodobnie od dostępności substratu podlegającego utlenianiu, czyli np. od ilości nieprawidłowych białek w komórkach. Z kolei znakowanie nieprawidłowych białek poprzez tworzenie grup karbonylowych może spr-

wiać, że białka takie nie podlegają mechanizmom naprawy, a są w pierwszej kolejności degradowane [63].

Ciekawe doświadczenie obrazujące jak karbonylacja określonego białka może wpływać na metabolizm komórki przedstawili Iwai i współautorzy [65]. Białko IRP 2 (ang. *iron regulatory protein 2*), inkubowane w roztworze FeCl_3 o różnych stężeniach (5-50 μM) ulegało karbonylacji, a następnie ubikwitylacji przed ostateczną degradacją w proteasomach [65]. W obecności donora żelaza (cytrynian amonowo-żelazowy) oznaczono karbonylację białka IRP. Stosując przeciwciała przeciwko ubikwitynie oraz inhibitor hamujący działanie proteasomów (MG-132), obserwowano nagromadzenie się koniugatów ubikwityny i karbonylowanych białek IRP w immunoprecypitatach komórek tętnicy płucnej bydła. W warunkach obniżonego stężenia jonów żelaza, kiedy komórki inkubowano ze specyficznym chelatorem tych jonów (deferoksamina) oraz zahamowania aktywności proteasomów przez podanie inhibitora (MG-132), nie stwierdzono obecności kompleksów ubikwityny znakującej karbonylowane białko IRP [65]. Na podstawie tych doświadczeń zaproponowano sekwencje zdarzeń, w której (i) IRP 2 wiąże jony żelaza, ulegając karbonylacji w obecności tlenu, (ii) karbonylowane IPR2 jest poddawane zależnej od ubikwityny degradacji w proteasomach. Przy niedoborze żelaza IRP 2 pozostaje aktywnym, niezmodyfikowanym białkiem [65].

Biorąc pod uwagę fakt, że reakcje na stres dotyczą konkretnego przedziału komórki, coraz ciekawsze stają się dane dotyczące subkomórkowej lokalizacji białek z grupami karbonylowymi. Tak zmodyfikowane białka zlokalizowano w: peroksysomach [31], mitochondriach i chloroplastach [31,43,66,67]. Okazuje się, że w liściach pszenicy (*Triticum aestivum*) poddanych działaniu stresu suszy najwięcej karbonylowanych białek obserwowano w mitochondriach [39], które w nefotosyntetyzujących tkankach są jednym z głównych źródeł RFT. Juszczuk i współautorzy [43] sądzą jednak, że większa ilość białek może ulegać karbonylacji w chloroplastach. Ci sami autorzy zwracają uwagę, że proteazy obecne w chloroplastach mogą efektywniej degradować zmodyfikowane białka niż proteazy w mitochondriach.

Istnieją przesłanki, że podczas kolejnych etapów w ontogenezie roślin dochodzi do karbonylacji konkretnych białek. Zwiększona karbonylacja białek występuje podczas przechodzenia ze stanu spoczynku i w trakcie kiełkowania zarodków słonecznika [17] i jabłoni (*Malus domestica*) (dane własne niepublikowane). Zaobserwowano zmiany karbonylacji określonych białek w nasionach słonecznika w trakcie dojrzewania posprzętowego [17]. Zmniejszyła się np. ilość karbonylowanych podjednostek α proteasomów 26S. Aktywne proteasomy, w których podjednostka α nie uległa karbonylacji w trakcie kiełkowania, są odpowiedzialne za degradację białek, a powstające peptydy mogą być wykorzystane do syntezy nowych białek. Z kolei czynnik elongacyjny translacji EF-2, był karbonylowany w większym stopniu. Oksydacyjna modyfikacja cząsteczki czynnika EF-2 być może hamuje biosyntezę białek w trakcie przechowywania nasion [17]. Białka szoku cieplnego (HSP) wydają się być jednym z głównych celów ataku RFT, chociaż podczas dojrzewania posprzętowego nasion słonecznika

poziom karbonylacji tych białek nie ulegał zmianie. Natomiast w starzejących się tkankach karbonylacja HSP może powodować zwiększenie uszkodzeń wywołanych przez stres oksydacyjny. Według innych badaczy HSP są częściej karbonylowane w mitochondriach starzejących się owoców brzoskwini (*Prunus persica*) (przechowywanych w temperaturze pokojowej przez 12 dni) oraz mitochondriach owoców traktowanych przez 20 min 100 mM H_2O_2 , niż w mitochondriach izolowanych ze świeżo zerwanych owoców [22]. W mitochondriach starzejących się owoców brzoskwini karbonylacji ulegały również enzymy cyklu Krebsa, glikolizy oraz MnSOD. Modyfikacja MnSOD wywoływała obniżenie aktywności SOD oraz zwiększoną akumulację O_2^- . Autorzy sugerują, że w starzejących się tkankach karbonylacja MnSOD powoduje nagromadzenie RFT, co znacznie zwiększa stres oksydacyjny [22].

Jak już wspomniano, następstwem karbonylacji białek może być utrata ich funkcji, co może wywoływać zmiany w metabolizmie komórki. Proponuje się nawet uznanie stopnia karbonylacji białek za jeden z markerów jakości nasion. W suchych, dojrzałych nasionach rzodkiewnika karbonylacji ulegają w większości białka zapasowe, co ułatwia ich mobilizację w czasie kiełkowania [28]. Natomiast w kiełkujących nasionach głównie modyfikowane są białka cyklu Krebsa, szlaku glikolitycznego, glukoneogenezy, biosyntezy tłuszczu, metabolizmu aminokwasów, a także czynniki translacyjne i białka zaangażowane w odpowiedź rośliny na warunki stresowe [17,28]. Job i współautorzy [28] sugerują, że jest to jeden z mechanizmów kontroli szlaków metabolicznych. Modyfikacja np. enzymów glikolizy, może powodować wzrost przepływu ekwiwalentów glukozy przez szlak pentozofosforanowy, a powstająca siła redukcyjna w postaci NADPH może być wykorzystana przez system antyoksydacyjny [28] do zapobiegania wzrostowi stężenia RFT [17]. Z doświadczeń przeprowadzonych na nasionach rzodkiewnika wynika, że obecna w błonie oksydaza NADPH jest jednym z głównych źródeł RFT w czasie dojrzewania posprzętowego nasion [11]. Zaobserwowano, że mutanty *AtrbohB* nie wykazujące aktywności oksydazy NADPH, charakteryzowały się znacznie mniejszą karbonylacją białek i jednocześnie opóźnionym dojrzewaniem posprzętowym.

Karbonylacja białek może mieć również znaczenie jako jedna z dróg transdukcji sygnału. Indukowaną karbonylacją aktywację ekspresji genów wykazano u bakterii na przykładzie czynnika transkrypcyjnego PerR [68]. Geny (między innymi geny kodujące białko CAT) podlegające regulacji przez PerR są indukowane H_2O_2 w stężeniu poniżej 10 μM . Prawdopodobnie w przypadku czynnika transkrypcyjnego PerR w reakcji MCO dochodzi do utleniania histydyny i tak zmodyfikowane białko PerR ulega degradacji, co z kolei powoduje zahamowanie aktywności odpowiednich genów [68].

Karbonylacja białek może także dotyczyć przekazywania sygnału ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki. Stwierdzono, że po przyłączeniu się ligandu (endoteliny, ET), wydzielanej przez komórki śródbłonki naczyń krwionośnych do receptora obecnego w tętnicy płucnej cieląt, dochodziło do zwiększonej karbonylacji białek [69]. Po 10-

cio minutowym traktowaniu ET (30 nM) komórek izolowanych z tętnicy płucnej cieląt zaobserwowano karbonylację białek HSP, peroksyredoksyny, aneksyny, dehydrogenazy fosfoglicerynianu. Równolegle już po 5-cio minutowym traktowaniu komórek tętnicy ET obserwowano wzrost zawartości H_2O_2 . Zmodyfikowane białka podlegały degradacji w proteasomach lub procesowi „dekarbonylacji”. Jak dotąd nie ma jednak jednoznacznych odpowiedzi na pytanie o odwracalność procesu karbonylacji. Po traktowaniu komórek tętnicy płucnej ET przy równoczesnym podaniu 2% β -merkaptopetanolu (jako związku redukującego), nie obserwowano zmian liczby grup karbonylowych w białkach. Może to potwierdzać tezę, według której „dekarbonylacja” zachodzi w wyniku reakcji redukcji. Wong i współpracownicy [69] jako pierwsi opisali, na przykładzie tkanek zwierzęcych, możliwość występowania „dekarbonylacji”. Na uwagę zasługuje fakt, że po traktowaniu komórek ET wzrastał poziom tioredoksyny. Autorzy sugerują, że nie ulegała ona karbonylacji, ale po reakcji z grupą karbonylową białka, była redukowana przez reduktazę tioredoksyny. Jednym z dowodów potwierdzającym słuszność tej hipotezy jest wzrost karbonylacji białek następujący po podaniu inhibitora reduktazy tioredoksyny [69]. Autorzy wskazują, że mechanizm dekarbonylacji może być związany z redukcją grup karbonylowych w obecności związków zawierających grupy tiolowe (-SH) [48], przy czym prawdopodobnie chodziłoby w tym przypadku o uruchamianie procesów enzymatycznych prowadzących do redukcji grup karbonylowych, a nie o oddziaływanie bezpośrednie. Alternatywnym postulowanym mechanizmem „dekarbonylacji” może być dalsze przekształcanie grup karbonylowych w inne grupy funkcyjne [48], co mogłoby być wyjaśnieniem zmian ilościowych białek karbonylowanych (szczególnie spadku ich zawartości) przy jednoczesnym braku zmian aktywności proteolitycznej.

Opisana powyżej reakcja dekarbonylacji w obecności tioredoksyny byłaby w pewnym sensie podobna do reakcji denitrozylacji białek (usuwania modyfikacji białek wywołanej przez reaktywne formy azotu), zachodzącej przy udziale glutationu w reakcji katalizowanej tym razem przez reduktazę S-nitrozoglutationu (GSNOR). S-nitrozylacja, tak jak karbonylacja jest modyfikacją potranslacyjną, polegającą na podstawieniu NO do reszty cysteiny w wyniku czego powstają S-nitrozotiole [70,71]. Denitrozylacja białka zachodząca przy udziale glutationu (transnitrozylacja glutationu) prowadzi do powstania nitrozoglutationu (GSNO). Może on ulec przekształceniu w formę utlenioną glutationu (GSSG), dzięki aktywności GSNOR [7,72,73]. W procesie denitrozylacji białek, podobnie jak w dekarbonylacji, może uczestniczyć tioredoksyna [74]. Proponowany jest mechanizm polegający na (i) tworzeniu przez tioredoksynę kompleksu z białkiem za pomocą powstałego między nimi mostka disiarczkowego lub (ii) tioredoksyna nie tworzy kompleksu z białkiem, ale ulega S-nitrozylacji. S-nitrozylowana tioredoksyna byłaby przekształcana do tioredoksyny za pomocą reakcji katalizowanej przez reduktazę tioredoksyny [74].

Interesującą hipotezę dotyczącą funkcji fizjologicznej karbonylacji białek przedstawili Sweetlove i Møller [75]. Sugerują oni, że peptydy powstające po degradacji proteoli-

tycznej karbonylowanych białek mogą uczestniczyć w przekazywaniu sygnału w czasie stresu oksydacyjnego [58,75]. Badacze ci postulują, że sygnał RFT jest sygnałem ogólnym, ponieważ nawet pomimo zdefiniowania komórkowego miejsca produkcji RFT nie zawsze dochodzi do zmiany ekspresji genów specyficznych dla tego organellum. Przy takim założeniu, peptydy powstające z karbonylowanych białek w określonym przedziale komórki (mitochondria, chloroplasty, peroksysony), zawierające utlenione aminokwasy, mogłyby uczestniczyć w aktywowaniu genów specyficznych dla danego przedziału komórkowego [58,75]. Takie sygnałowe peptydy mogłyby funkcjonować, jako drugorzędowe przekazywacze informacji RFT kierowane do jądra komórki (Ryc. 1a).

REGULACJA PROCESÓW KARBONYLACJI I UTLENIEŃ BIAŁEK PRZEZ REAKTYWNE FORMY AZOTU

Do reaktywnych cząsteczek występujących w komórkach zaliczamy oprócz RFT również reaktywne formy azotu (RFA) np.: tlenek azotu NO, ditlenek azotu NO_2 oraz nad-tlenoazotyn ONOO- [12]. Te cząsteczki modyfikują białka na zasadzie S-nitrozylacji (o czym wspomiano wcześniej) lub nitracji, polegającej na przyłączeniu NO do pierścienia aromatycznego reszty tyrozyny. Modyfikacje białek wywołane przez NO zostały szczegółowo opisane w pracy przeglądowej w 56 tomie *Postępyw Biochemii* [70]. RFA również mogą pośrednio uczestniczyć w modyfikacji białek przez utlenianie [4,27,45] lub mogą wpływać na zawartość karbonylowanych białek [76]. Dla przykładu, po krótkotrwałym traktowaniu ONOO- zawiesiny chloroplastów izolowanych z liści soi (*Glycine max*), wzrasta zawartość karbonylowanych białek chloroplastowych [76]. Natomiast krótkotrwałe traktowanie chloroplastów GSNO nie powoduje wzrostu zawartości karbonylowanych białek, a nawet prowadzi do obniżenia ich stężenia.

Nie można wykluczyć, że RFA mogą uniemożliwiać karbonylację niektórych białek. NO, reagując bezpośrednio z RFT, może wpływać na modyfikacje struktur komórkowych. Powstający w takich reakcjach np. ONOO- rozpada się do NO_2 i O_2 lub uczestniczy w utlenianiu reszt aminokwasowych cysteiny, metioniny, tryptofanu [71]. Pojawia się coraz więcej przesłanek świadczących o współdziałaniu RFT i RFA w modyfikacji struktury i funkcji białek.

Doświadczenia przeprowadzone na pomarańczy gorzkiej (*Citrus aurantium*) traktowanej przez 48 h 100 μ M nitroprusydkiem sodu (SNP) podczas wzrostu w warunkach stresu solnego wykazały, że zawartość karbonylowanych białek w liściach roślin kontrolnych (nie poddanych stresowi) i poddanych stresowi zasolenia była podobna [40]. Autorzy sądzą, że modyfikacja białek wywołana przez NO, czyli S-nitrozylacja może ograniczać karbonylację białek [40]. S-nitrozylacja reszt cysteinowych prowadząca do zmian w strukturze przestrzennej białka, może zabezpieczać białko przed karbonylacją [40]. Ta obniżona podatność białka na karbonylację mogłaby być związana z ograniczeniem dostępu RFT do odpowiednich reszt aminokwasowych takich jak: arginina, lizyna, prolina, czy treonina. Hipoteza ta, jest tym ciekawsza, że okazało się, iż białka, które

Tabela 1. Wykaz przykładowych białek podlegających modyfikacji za pośrednictwem RFT i/lub RFA

białko	organizm	rodzaj modyfikacji	Piśmiennictwo
aldolaza fruktozo-1,6 bisfosforanu	drożdże	karbonylacja	[81]
	ssaki	nitracja	[82]
	ryż	karbonylacja	[66]
	rzodkiewnik	S-nitrozyłacja	[83]
dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego	drożdże	karbonylacja	[84]
	ssaki	nitracja	[85]
	rzodkiewnik	S-nitrozyłacja	[83]
Enolaza	drożdże	karbonylacja	[86]
	ssaki	nitracja	[87]
akonitaza	drożdże	karbonylacja	[88]
	ssaki,	nitracja	[85]
	ryż	karbonylacja	[66]
	rzodkiewnik	S-nitrozyłacja	[83]
dehydrogenaza α -ketoglutaranu	bakterie	karbonylacja	[88]
	ssaki	nitracja	[89]
syntaza ATP	drożdże	karbonylacja	[90]
	ssaki	nitracja	[85]
	ryż	karbonylacja	[66]
	rzodkiewnik	S-nitrozyłacja	[83]
SOD dysmutaza ponadtlenkowa	ssaki	nitracja	[91]
	ryż	karbonylacja	[66]
	rzodkiewnik	S-nitrozyłacja	[83]
CAT katalaza	drożdże	karbonylacja	[81]
	ssaki	nitracja	[91]
	ryż	karbonylacja	[66]
GPX peroksydaza glutationowa	ssaki	karbonylacja	[92]
	rzodkiewnik	S-nitrozyłacja	[83]
HSP 60	drożdże	karbonylacja	[88]
	ssaki	nitracja	[93]
	ryż	karbonylacja	[66]
Aktyna	ssaki	karbonylacja	[94]
	drożdże	nitracja	[91]
	rzodkiewnik	S-nitrozyłacja	[83]
Tubulina	ssaki	karbonylacja	[95]
	ssaki	nitracja	[96]
	rzodkiewnik	S-nitrozyłacja	[83]
Rubisco	ryż	karbonylacja	[66]
	rzodkiewnik	S-nitrozyłacja	[83]

są karbonylowane mogą również podlegać S-nitrozyłacji lub nitracji (Tab. 1). Można przypuszczać, że S-nitrozyłacja jako modyfikacja odwracalna, mogłaby tymczasowo zmieniać funkcję białka (aktywować lub dezaktywować enzym) w zależności od panujących w komórce warunków. Sun i współpracownicy już w 2006 roku [77] sugerowali, że modyfikacje wywołane przez RFA mogą chronić białka przed dalszym utlenieniem.

Modyfikacje białek wywołane przez RFA mogą również, podobnie jak karbonylacja, istotnie wpływać na ich funkcje oraz na poziom powstających w komórce RFT. Przykładem antyoksydacyjnej funkcji NO może być S-nitrozyłacja tioredoksyny w komórkach śródbłonkowych układu żylnego człowieka, powodująca aktywację tego białka co prowadzi do ograniczenia wewnątrzkomórkowego stężenia RFT [78]. Okazuje się, że aktywność enzymów biorących udział w kontrolowaniu stężenia RFT, a zawierających aktywną resztę cysteiny (ang. *active Cys*), takich jak CAT, GR, GPX, może być regulowana przez S-nitrozyłację [77]. NO może również

uczestniczyć bezpośrednio w hamowaniu powstawania OH, przez wiązanie wolnych jonów Fe^{+2} [79] lub pośrednio w wyniku przekształcania akonitazy obecnej w cytosolu w IRP (ang. *iron regulatory protein*) [80]. W ten sposób nie powstaje niebezpieczny OH, odpowiadający między innymi za tworzenie grup karbonylowych w białkach.

PODSUMOWANIE

RFT w zależności od różnych czynników, w tym także stresów środowiskowych, mogą pełnić różne funkcje w komórkach roślinnych: cytotoksyczne lub/i informacyjne (Ryc. 1). W trakcie niezakłóconego rozwoju organizmu roślinnego RFT są stale produkowane w takich organellach komórkowych jak: mitochondria, chloroplasty, peroksy-somy, ściana komórkowa, a także w obrębie cytoplazmy. Spełniają wówczas funkcję sygnałową i razem z RFA mogą regulować metabolizm komórki oraz znakować np. nieprawidłowe białka powstające w trakcie błędnej transkrypcji lub translacji [64] (Ryc. 1a). Można przypuszczać, że mająca wówczas miejsce, modyfikacja białek jest specyficzna i stanowi swoisty element szlaku sygnalizacyjnego, a także uczestniczy w ochronie komórki przed nieprawidłowymi białkami. W warunkach, kiedy komórkowy system antyoksydacyjny, działający jako system modyfikujący stężenie RFT, nie jest w stanie dostatecznie kontrolować stężenia RFT/RFA możemy mówić o indukcji stresu oksydacyjnego i stresu nitrozyacyjnego, które towarzyszą wielu stresom abiotycznym i biotycznym. Prawdopodobnie wówczas z powodu wysokiego stężenia RFT dochodzi do przypadkowej modyfikacji niespecyficznych białek za pośrednictwem RFT. Modyfikacje te mogą prowadzić do utraty funkcji przez niektóre enzymy, w tym także kluczowe enzymy systemu antyoksydacyjnego, przez co komórka nie jest w stanie dłużej przeciwdziałać wzrastającemu stężeniu RFT, a to prowadzi do jej śmierci (Ryc. 1b). Karbonylacja białek będąca jedną z potranslacyjnych modyfikacji białek może być z jednej strony uznawana za marker stresu oksydacyjnego, ale jednocześnie prawdopodobnie stanowi istotny element w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, podobnie jak modyfikacje białek wywołane przez NO [70]. Jak przedstawiono na rycinie 1a, peptydy powstające w konkretnych organellach komórkowych po proteolitycznej degradacji karbonylowanych białek, mogłyby modyfikować transkrypcję genów specyficznych dla danego przedziału komórkowego. Takie sygnałowe peptydy mogłyby funkcjonować, jako drugorzędowe, przekaźniki informacji RFT kierowane do jądra komórki.

PIŚMIENNICTWO

- Hancock JT, Desikan R, Neill SJ (2001) Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biochem Soc Trans* 29: 345-350
- Blokhina O, Fagerstedt KV (2010) Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiol Plant* 138: 447-462
- Malinska D, Mirandola SR, Kunz WS (2010) Mitochondrial potassium channels and reactive oxygen species. *FEBS Lett* 584: 2043-2048
- Rinalducci S, Murgiano L, Zolla L (2008) Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *J Exp Bot* 14: 3781-3801
- Triantaphylidès C, Krische M, Hoeberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Van Breusegem F, Mueller MJ (2008) Singlet oxygen is the

- mayor reactive oxygen species involve in photooxidative damage in plant. *Plant Physiol* 148: 960-968
6. Møller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Ann Rev Plant Biol* 58: 459-481
 7. del Rio AL, Sandalio ML, Corpas FJ, Palma MJ, Barroso BJ (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, Scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol* 141: 330-335
 8. del Rio AL, Corpas FJ, Sandalio ML, Palma MJ, Gómez M, Barroso BJ (2002) Reactive oxygen species antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* 53: 1255-2002
 9. Carol RJ, Dolan L (2006) The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *J Exp Bot* 57: 1829-1834
 10. Müller K, Linkies A, Vreeburg RAM, Fry SC, Krieger-Liszczay A, Leubner-Metzger G (2009) In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiol* 150: 1855-1865
 11. Müller K, Carstens AC, Linjies AL, Torres MA, Leubner-Metzger G (2009) The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in *Arabidopsis* seed after-ripening. *Plant Physiol* 148: 855-897
 12. Bartosz G (2006) *Druga twarz tlenu*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
 13. Posmyk MM, Janas KM (2009) Melatonin in plants. *Acta Physiol Plant* 31: 1-11
 14. Malecka A, Tomaszewska B (2005) Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obronne. *Post Biol Kom* 32: 311-325
 15. Rucińska-Sobkowiak R (2010) Stres oksydacyjny wywołany działaniem metali ciężkich na rośliny. *Post Biochem* 56: 191-200
 16. Sen CK (2000) Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul* 36: 1-30
 17. Oracz K, El-Maarouf Bouteau H, Farrant JM, Cooper K, Belghazi M, Job C, Job D, Corbineau F, Bailly Ch (2007) ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant J* 50: 452-465
 18. Schopfer P, Plachy C, Frahy G (2001) Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidases in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol* 125: 1591-1602
 19. Gniazdowska A, Krasuska U, Czajkowska K, Bogatek R (2010) Nitric oxide, hydrogen cyanide and ethylene are required in the control of germination and undisturbed development of young apple seedlings. *Plant Growth Regul* 61: 75-84
 20. Lehner A, Mamadou N, Poels P, Come D, Bailly C, Corbineau F (2007) Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during ageing in wheat grains. *J Cereal Sci* 47: 555-565
 21. Nyström T (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* 24: 1311-1317
 22. Qin G, Meng X, Wang Q, Tian S (2009) Oxidative damage of mitochondrial proteins contributes to fruit senescence: a redox proteomics analysis. *J Proteome Res* 8: 2449-2462
 23. Srivastava N, Gonugunta VK, Puli MR, Raghvendra AS (2009) Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *Planta* 229: 757-765
 24. Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H, Corbineau F (2008) From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *CR Biol* 331: 806-814
 25. Wojtyła Ł, Garnczarska M, Ratajczak L (2006) Rola reaktywnych form tlenu w procesie rozwoju i kiełkowania nasion. *Post Biol Kom* 3: 543-553
 26. Krasuska U, Gniazdowska A, Bogatek R (2011) Rola ROS w fizjologii nasion. *Kosmos* 60: 113-128
 27. Davies MJ (2005) The oxidative environment and protein damage. *Biochem Biophys Acta* 1703: 93-109
 28. Job C, Rajjou L, Lovigny Y, Belghazi M, Job D (2005) Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiol* 138: 790-802
 29. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329: 23-38
 30. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 9: 169-176
 31. Romero-Puertas MC, Palma MJ, Gómez M, del Rio LA, Sandalio LM (2002) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ* 25: 677-686
 32. Pena BL, Pasquinia AL, Tomaro ML, Gallego MS (2006) Proteolytic system in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves under cadmium stress. *Plant Sci* 171: 531-537
 33. Pena BL, Tomaro ML, Gallego MS (2006) Effect of different metals on protease activity in sunflower cotyledons. *Electronic J Biotech* 9: 258-262
 34. Cargnelutti D, Tabaldi LA, Spanevello MR, Jucoski OG, Battisti V, Redni M, Linares JOG, Dressler LV, Flores MME, Nicoloso TF, Morscch MV, Schetiner ChRM (2006) Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. *Chemosphere* 65: 999-1006
 35. Qiu Q, Huber JL, Booker FL, Jain V, Leakey ADB, Fiscus EL, Yau PM, Ort DR, Huber SC (2008) Increased protein carbonylation in leaves of *Arabidopsis* and soybean in response to elevated CO₂. *Photosynth Res* 97: 155-166
 36. Prasad TK (1996) Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids and protease activities. *Plant J* 10: 1017-1026
 37. Kingston-Smith AH, Foyer CH (2000) Bundle sheath proteins are more sensitive to oxidative damage than of the mesophyll in maize leaves exposed to paraquat or low temperatures. *J Exp Bot* 51: 123-130
 38. Tambussi EA, Bartoli CG, Guiamet JJ, Beltrano J, Araus JL (2004) Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L.Merr.) leaves. *Plant Sci* 167: 19-26
 39. Bartoli CG, Gómez F, Martinem DE, Guiamet JJ (2004) Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Exp Bot* 5: 1663-1669
 40. Tanou G, Job C, Rajjou L, Arc E, Belghazi M, Diamantidis G, Molasiotis A, Job D (2009) Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *Plant J* 60: 795-804
 41. Johansson E, Olsson O, Nyström T (2004) Progression and specificity of oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279: 22204-22208
 42. Rajjou L, Lovigny Y, Groot PCS, Belghazi M, Job C, Job D (2008) Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: a comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiol* 148: 620-641
 43. Juszczyk IM, Tybura A, Rychter AM (2008) Protein oxidation in the leaves and roots of cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) mutant MSC16 and wild type. *J Plant Physiol* 165: 355-356
 44. Wu W, Zhang C, Kong X, Hua Y (2009) Oxidative modification of soy protein by peroxy radicals. *Food Chem* 116: 293-301
 45. Eaton P (2006) Protein thiol oxidation in health and disease: Techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Rad Biol Med* 40: 1889-1899
 46. Dalle-Donne I, Carini M, Orioli M, Vistoli G, Regazzoni L, Colombo G, Rossi R, Milzani A, Aldini G (2009) Protein carbonylation: 2,4-dinitrophenylhydrazine reacts with both aldehydes/ ketones and sulfenic acids. *Free Rad Biol Med* 46: 1411-1419
 47. Madian AG, Regnier FE (2010) Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. *J Proteome Res* 9: 3766-3780
 48. Wong CM, Marcocci L, Liu L, Suzuki YJ (2010) Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. *Antioxid Redox Signal* 12: 393-404
 49. Aldini G, Dalle-Donne I, Colombo R, Facino MR, Milzani A, Carini M (2006) Lipoxidation-derived reactive carbonyl species as potential

- drug targets in preventing protein carbonylation and related cellular dysfunction. *Chem Med Chem* 1: 1045-1058
50. Portero-Otin M, Bellmunt MJ, Requena R, Pamplona R (2003) Protein modification by advanced Maillard adducts can be modulated by dietary polyunsaturated fatty acids. *Biochem Soc Trans* 31: 1403-1405
 51. Peng X, Cheng K, Ma J, Chen B, Ho C, Lo C, Chen F, Wang M (2008) Cinnamon bark proanthocyanidins as reactive carbonyl scavengers to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *J Argri Food Chem* 56: 1970-1911
 52. Tunc-Ozdemir M, Miller G, Song L, Kim J, Sodek A, Koussevitzky S, Misra AN, Mittler R, Dhintani D (2009) Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 151: 421-432
 53. Rajjou L, Belghazi M, Huguet R, Robin C, Moreau A, Job C, Job D (2006) Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiol* 141: 910-923
 54. Ishii T, Tatsuda E, Kumazawa S, Nakayama T, Uchida K (2003) Molecular basis of enzyme inactivation by an endogenous electrophile 4-hydroxy-2-nonenal: identification of modification sites in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 42: 3474-3480
 55. Gębicki JM, Bartosz G (2010) Rola białek jako przekaźników uszkodzeń indukowanych przez reaktywne formy tlenu *in vivo*. *Post Biochem* 56: 115-123
 56. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies M (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324: 1-18
 57. Xiong Y, Contento AL, Nguyen PQ, Bassham DC (2007) Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143: 291-299.
 58. Møller IM, Sweetlove LJ (2010) ROS signalling- specificity is required. *Trends Plant Sci* 15: 370-374
 59. Vanita J, Werner K, Huber SC (2008) Cytokinin inhibits the proteasome-mediated degradation of carbonylated proteins in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiol* 49: 843-852
 60. Procházková D, Wilhelmová N (2009) Leaf senescence and antioxidants. *Biol Plant* 51: 401-406
 61. Maisonneuve E, Frayssé L, Lignon S, Tarpon L, Dukan S (2008) Carbonylated proteins are detectable only in a degradation-resistant aggregate state in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190: 6609-6614
 62. Aguilaniu H, Gustafsson L, Rigoulet M, Nyström T (2003) Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science* 299: 1751-1753
 63. Nguyen AT, Donaldson RP (2005) Metal-catalyzed oxidation induces carbonylation of peroxisomal proteins and loss of enzymatic activities. *Arch Biochem Biophys* 439: 25-31
 64. Dukan S, Farwell A, Ballestros M, Taddei F, Radman M, Nyström T (2000) Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5746-5749
 65. Iwai K, Drake SK, Wehr NB, Weissman AM, LaVoute T, Minato N, Klausner RD, Levine RL, Rouault TA (1998) Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4924-4928
 66. Kirstensen BK, Askerlund P, Bykova NV, Egsgaard H, Møller IM (2004) Identification of oxidized proteins in the matrix of rice leaf mitochondria by immunoprecipitation and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometer. *Phytochem* 65: 1839-1851
 67. Morgan JM, Lehmann M, Schwarzlander M, Baxter CJ, Sienkiewicz-Porzucek A, Williams TCR, Schauer N, Fernie AR, Fricker MD, Ratcliffe RG, Seetlove LJ, Finkemeier (2008) Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. *Plant Physiol* 147: 101-114
 68. Lee JW, Helmann JD (2006) The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* 440: 363-367
 69. Wong ChM, Cheema AK, Zhang L, Suzuki YJ (2008) Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. *Circ Res* 102: 310-318
 70. Szuba A, Wojtaszek P (2010) Modyfikacje strukturalne białek wywołane przez tlenek azotu. *Post Biochem* 56: 107-114
 71. Gębicka L, Didik J (2010) Nadtlenoazotyn jako czynnik wywołujący stres oksydacyjny. *Post Biochem* 56: 103-106
 72. Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Rodriguez-Serrano M, Esteban FJ, Fernandez-Ocana A, Chaki M, Romero-Puertas MC, Valderrama R, Sandalio LM, del Rio LM (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J Exp Bot* 57: 1785-1793
 73. Sakamoto A, Ueda M, Morikawa H (2002) *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett* 515: 20-24
 74. Benhar M, Forrester MT, Stamler JS (2009) Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nature* 10: 721-732
 75. Sweetlove L, Møller IM (2009) Oxidation of proteins in plants - mechanisms and consequences. *Adv Bot Res* 52: 1-23
 76. Jasid S, Simontacchi M, Bartoli CG, Puntarulo S (2006) Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiol* 142: 1246-1255
 77. Sun J, Steenbergen C, Murphy E (2006) S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8: 1693-1705
 78. Haendler J, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S (2004) Antioxidant effects of Statins via S-nitrosylation and activation of thioredoxin in endothelial cells: a novel vasculoprotective function of statins. *J Am Heart Assoc* 110: 856-861
 79. Lu C, Koppenol WH (2005) Inhibition of the Fenton reaction by nitrogen monoxide. *J Biol Chem* 10: 732-738
 80. Navarre DA, Wendehenne D, Durner J, Noad R, Klessig DF (2000) Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiol* 122: 573-582
 81. Reverter-Branch G, Cabisco E, Tamarit J, Ros J (2004) Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets and prevention by caloric restriction. *J Biol Chem* 279: 31983-31989
 82. Koeck T, Fu X, Hazen SL, Crabb JW, Stuehr DJ, Aulak KS (2004) Rapid and selective oxygen-regulated protein tyrosine denitration and nitration in mitochondria. *J Biol Chem* 279: 27257-27262
 83. Lindermayr C, Saalbach G, Durner J (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 137: 921-930
 84. Costa VM, Amorim M A, Quintanilha A, Moradas-Ferreira P (2002) Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. *Free Radic Biol Med* 33: 1507-1515
 85. Kanski J, Behring A, Pelling J, Schoneich C (2005) Proteomic identification of 3-nitrotyrosine-containing rat cardiac proteins: effects of biological aging. *Am J Physiol Heart Physiol* 288: 371-381
 86. England K, O'Driscoll C, Cotter TG (2004) Carbonylation of glycolytic proteins is a key response to drug-induced oxidative stress and apoptosis. *Cell Death Differ* 11: 252-260
 87. Shin EJ, Jhoo JH, Kim WK, Jhoo WK, Lee C, Jung BD, Kim HC (2004) Protection against kainate neurotoxicity by pyrrolidine dithiocarbamate. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31: 320-326
 88. Cabisco E, Piulats E, Echave P, Herrero E, Ros J (2000) Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275: 27393-27398
 89. Park LC, Zhang H, Sheu KF, Calingasan NY, Kristal BS, Lindsay JG, Gibson GE (1999) Metabolic impairment induces oxidative stress, compromises in inflammatory responses, and inactivates a key mitochondrial enzyme in microglia. *J Neurochem* 72: 1948-1958
 90. O'Brien KM, Dirmeier R, Engle M, Poyton RO (2004) Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese- (MnSOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage. *J Biol Chem* 279: 51817-51827

91. Aulak KS, Miyagi M, Yan L, West KA, Massillon D, Crabb JW, Stuehr DJ (2001) Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12056–12061
92. Kinter M, Roberts RJ (1996) Glutathione consumption and glutathione peroxidase inactivation in fibroblast cell lines by 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic Biol Med* 21: 457–462
93. Khor HK, Fischer MT, Schöneich C (2004) Potential role of methionine sulfoxide in the inactivation of the chaperone GroEL by hypochlorous acid (HOCl) and peroxynitrite (ONOO⁻). *J Biol Chem* 279: 19486–19493
94. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Gagliano N, Lusini L, Milzani A, Di Simplicio P, Colombo R (2001) Actin carbonylation: from a simple marker of protein oxidation to relevant signs of severe functional impairment. *Free Radic Biol Med* 31: 1075–1083
95. Aksenov MY, Aksenova MV, Butterfield DA, Geddes JW, Markesbery WR (2001) Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 103: 373–383
96. Landino LM, Hasan R, Mc Gaw A, Cooley S, Smith AW, Masselam K, Kim G (2002) Peroxynitrite oxidation of tubulin sulfhydryls inhibits microtubule polymerization. *Arch Biochem Biophys* 398: 213–220

Protein carbonylation and its role in physiological processes in plants

Karolina Dębska, Renata Bogatek, Agnieszka Gniazdowska[✉]

Department of Plant Physiology, Warsaw University of Plant Sciences-SGGW, 159 Nowoursynowska St., 02-776 Warsaw, Poland

✉ e-mail: agnieszka_gniazdowska@sggw.pl

Key words: protein carbonylation, RNS, ROS, seed germination

ABSTRACT

Plant cells produce reactive oxygen species (ROS) continuously as a byproducts of oxygen metabolism and reaction to various environmental stresses. ROS are considered as chemicals inducing damage of cellular components (DNA, lipids and proteins), but also might act as signaling agents. Protein oxidation is one of covalent modification of protein induced by ROS or other products of oxidative stress. Carbonylation of particular amino acid residues (arginine, lysine, treonine or proline) is one of the most commonly occurring oxidative modification of proteins. This modification might lead to alteration in protein activity, its proteolytic breakdown or, in the opposite, aggregate formation. Carbonylated proteins have been identified in many plant species at different stage of growth and development. The analysis of subcellular localization of carbonylated proteins arised the hypothesis on their signaling function. We summarize the current knowledge on the detection of carbonylation protein in plants taking to the account the conditions which may influence their production or removal. We present also their putative role in plant physiology and discuss interaction between ROS and RNS in regulation of protein carbonylation.

Anna Drożak

Wioleta Wasilewska

Alicja Buczyńska

Elżbieta Romanowska

Zakład Molekularnej Fizjologii Roślin, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa

Zakład Molekularnej Fizjologii Roślin, Wydział Biologii UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: (22) 554 39 16, e-mail: romana@biol.uw.edu.pl

Artykuł otrzymano 14 lipca 2011 r.
Artykuł zaakceptowano 22 października 2011 r.

Słowa kluczowe: C4 podtypy, ewolucja, fotosynteza, metabolizm, stres

Wykaz skrótów: ATP – adenozylo trójfosforan; ALAT – aminotransferaza alaninowa; AspAT – aminotransferaza asparaginowa; BS – pochew wokółwiązkowa; G3P – aldehyd 3- fosfoglicerynowy; M – mezofil; MDH – dehydrogenaza jabłczanowa; NAD – dinukleotyd nikotynaminoadeninowy; NADP – fosforan dinukleotydu nikotynaminoadeninowego; NAD-ME – enzym jabłczanowy zależny od NAD; NADP-ME – enzym jabłczanowy zależny od NADP; NDH – kompleks dehydrogenazy; OAA – szczawiooctan; PEP – fosfoenolopirogronian; PEPC – karboksylaza fosfoenolopirogronianu; PEPCK – karboksykinaza fosfoenolopirogronianu; PPK – dikinaza pirogronian; pirofosforan; PSI – fotoukład I; PSII – fotoukład II; Rubisco – karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu

Podziękowanie: Praca finansowana częściowo z projektu nr N N303 393636 MNiSW.

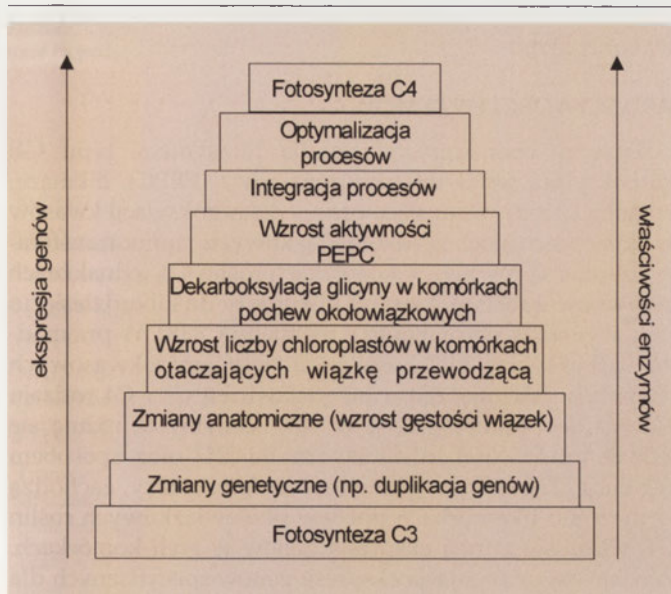
STRESZCZENIE

Fotosynteza C4 jest serią zmian anatomicznych i biochemicznych zwiększających stężenie CO₂ w miejscu działania Rubisco, w celu ograniczenia/wyeliminowania procesu fotooddychania. Prowadzi to do wzrostu wydajności fotosyntetycznej i przyrostu biomasy. Jest przystosowaniem do wysokich natężeń światła, podwyższonej temperatury i suszy. U roślin C4 występują zwykle dwa typy komórek otaczających radialnie wiązkę przewodzącą i uczestniczących w fotosyntezie, komórki mezofilu i komórki pochew okołowiązkowych. Procesy asymilacji i redukcji CO₂ rozdzielone są przestrzennie i katalizowane są przez dwa różne enzymy. Jedynie w chloroplastach komórek pochew okołowiązkowych zachodzi cykl Calvina i występuje Rubisco, natomiast pierwotne wiązanie CO₂ odbywa się w komórkach mezofilu przy udziale karboksylazy fosfoenolopirogronianowej, a w chloroplastach zachodzą tylko reakcje świetlne fotosyntezy. Różnice te prowadzą również do zmian potencjału redoks w obu typach komórek. Rośliny C4 zostały podzielone na trzy podtypy ze względu na mechanizm dekarboksylacji C4 kwasów. Rośliny o typie „C4-like” stanowiąc będą podstawę wyżywienia ludzi oraz zwierząt w najbliższych dziesięcioleciach.

WPROWADZENIE - EWOLUCJA ROŚLIN C4

Fotosynteza typu C4 występuje u ponad 7500 gatunków roślin. Ewolucja roślin C3 do C4 zachodziła niezależnie ponad 50 razy w co najmniej 19 rodzinach roślin, zarówno jednoliściennych, jak i dwuliściennych i około 75% przedstawicieli typu C4 znajduje się w czterech rodzinach *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae*, *Euphorbiaceae* i *Asteraceae* [1]. Ewolucja C4 jest znakomitym przykładem zmian konwergencyjnych w odpowiedzi na zmiany środowiska. Jest adaptacją roślin pozwalającą na wysoką produktywność w warunkach podwyższonej temperatury i obniżonego stężenia CO₂. Fotosyntetyczna produktywność roślin C4 jest 1,5-2 razy wyższa niż u roślin C3, dlatego też prowadzone są intensywne badania nad wykorzystaniem roślin C4 jako źródła energii oraz w inżynierii genetycznej do uzyskania ryżu „C4-like” ważnego w produkcji żywności [2,3]. Zmieniające się warunki środowiskowe były głównym motorem w procesie ewolucji prowadzącej do różnych podtypów fotosyntezy C4. Poznanie mechanizmów fotosyntezy C4 jest wyzwaniem dla inżynierii genetycznej w celu projektowania roślin „C4-like” o zwiększonej wydajności fotosyntetycznej w różnych strefach klimatycznych. Badania przeprowadzone na roślinach ryżu wykazały, że wzrost syntezy białek kluczowych enzymów fotosyntetycznych miał nieznaczny wpływ na natężenie fotosyntezy, a jednocześnie obserwowano karłowacenie otrzymanych roślin [3]. Jak dotąd nie powiodły się badania nad uzyskaniem z roślin C3 roślin „C4-like”.

Rośliny C4 występują w strefie tropikalnej, subtropikalnej oraz strefach o podwyższonej temperaturze (np. Australia, Afryka wschodnia, Ameryka Północna (Meksyk), Ameryka Południowa, Azja Centralna). Większość roślin C4 należy do traw (około 4500 gatunków), u których fotosynteza C4 po raz pierwszy pojawiła się około 35-24 mln lat temu, najmłodsze pochodzą sprzed 7-5 mln lat. Największa liczba gatunków C4 występuje w podrodzynie *Chloridoideae* i *Panicoidae*. Hamowanie natężenia fotosyntezy pod wpływem suszy, podwyższonej temperatury i zasolenia zwiększa się u roślin w atmosferze o obniżonym stężeniu CO₂ ograniczając ich wzrost i reprodukcję [1]. Ponieważ rośliny C4 występują głównie w regionach gorących, suchych i/lub słonych, przyjmuje się, że szlak C4 wykształcił się jako odpowiedź na obniżenie stężenia CO₂ w atmosferze do poziomu niższego niż występujący obecnie. Wśród roślin C4 występują też gatunki przystosowane do życia w obniżonej temperaturze, spotykane są one zarówno w tundrze, jak i lasach borealnych. Chociaż gatunki te są przystosowane do obniżonej temperatury, wymagają jednak podczas dnia wyższych temperatur, co bezpośrednio wynika z właściwości katalitycznych enzymu Rubisco. Fotosynteza C4 występuje również u glonów [4].



Rycina 1. Model przedstawiający główne etapy ewolucji roślin C4.

Zmiany ewolucyjne roślin C4 dotyczą zarówno anatomicznych, jak i biochemicznych modyfikacji, nie jest natomiast jasne, które z nich pojawiły się jako pierwsze. Istnieje wiele gatunków roślin wykazujących właściwości pośrednie między roślinami C3 i C4, określa się je jako rośliny przejściowe typu C3-C4 [5]. Metabolizm C4 jest kompleksową adaptacją drogi C3 prowadzącą do ograniczenia procesu fotooddychania. Dokonało się to poprzez zwiększenie stężenia CO_2 w miejscu działania Rubisco, przy udziale pompy biochemicznej CO_2 . Również ewolucja C4-specyficznej karboksylazy fosfoenolopirogronianowej (PEPC) zachodziła niezależnie co najmniej 8 razy z tego samego C3-PEPC enzymu. Obserwowane różnice pomiędzy C3 PEPC i C4 PEPC dotyczą zmian w obrębie 21 reszt aminokwasowych [6]. Drogi ewolucji roślin C4 można podzielić na kilka etapów (Ryc. 1).

Do najważniejszych należą zmiany genetyczne prowadzące do powstania wielu kopii genów i następnie ich modyfikacji, z jednoczesnym zachowaniem pierwotnej funkcji oraz zmiany anatomiczne, polegające na zwiększeniu zarówno liczby, jak i gęstości wiązek przewodzących, ważne w warunkach o ograniczonej dostępności wody i mających również znaczenie mechaniczne. Spowodowało to w konsekwencji zwiększenie liczby komórek otaczających wiązkę i wzrost liczby chloroplastów, peroksysomów i mitochondriów w tych komórkach. Zmiany w ekspresji genów kodujących podjednostki dekarboksylazy glicyny, kluczowego enzymu fotooddychowego i obecność ich w komórkach otaczających wiązkę przewodzącą miały istotny wpływ na zwiększenie stężenia CO_2 w tych komórkach. Decydujące znaczenie dla powstania metabolizmu C4 miało jednak zwiększenie zawartości PEPC i anhidrazy węglanowej w cytoplazmie komórek mezofilowych (M) oraz oddzielenie przestrzenne dwóch reakcji karboksylacji, z enzymem Rubisco występującym tylko w chloroplastach komórek pochw okołowiązkowych (BS). Różne zapotrzebowanie energetyczne i na czynniki redukcyjne komórek M i BS umożliwiło optymalizację i integrację różnych dróg metabolicznych

w komórkach. Sugeruje się, że regulacja ekspresji genów odpowiedzialnych za rozwój i różnicowanie dwóch typów komórek u roślin C4 nie jest znacząco różna od działającej u roślin C3. Procesy rozwojowe i metaboliczne roślin C3 stanowiły platformę dla pojawienia się zmian anatomicznych i metabolicznych charakterystycznych dla roślin C4. Brak jest jednak informacji o czynnikach regulacyjnych odpowiedzialnych za ekspresję genów w obu typach komórek. Wykrycie różnej ekspresji genów czynników transkrypcyjnych GOLDEN2-LIKE (GLK) w M i BS może stanowić istotny krok w badaniach regulacji funkcji genów w obu typach komórek [7].

METABOLIZM C4

Fotosynteza C4 to cykl reakcji enzymatycznych zachodzących w komórkach mezofilu i pochw okołowiązkowych takich roślin, jak np. kukurydza, sorgo, trzcina cukrowa i innych traw strefy podzwrotnikowej, pozwalający na wiązanie CO_2 i przekształcenie go do cukrów. Rośliny o tym typie fotosyntezy charakteryzuje najczęściej radialna budowa anatomiczna, gdzie wiązkę przewodzącą otoczona jest komórkami tzw. pochwy okołowiązkowej, które następnie otoczone są komórkami mezofilowymi (budowa Kranz). Komórki pochwy okołowiązkowej mają u wielu gatunków grube ściany zewnętrzne, przesycone suberyną utrudniającą dyfuzję CO_2 . Kontakt między komórkami zapewniają plazmodesmy. W fotosyntezie typu C4, procesy asymilacji i redukcji CO_2 rozdzielone są przestrzennie i katalizowane przez dwa różne enzymy: PEPC oraz Rubisco. Asymilacja dwutlenku węgla zachodzi w cytoplazmie komórek mezofilu, gdzie CO_2 przekształcany jest początkowo przez anhidrazę węglanową do jonu HCO_3^- , który następnie jest przyłączany do fosfoenolopirogronianu (PEP) z wytworzeniem szczawiooctanu (OAA). Ten etap jest wspólny dla wszystkich typów fotosyntezy C4. Następne etapy metabolizmu szczawiooctanu różnią się u poszczególnych podtypów roślin C4. OAA przekształcany jest do jabłczanu lub asparaginianu i kwasy te transportowane są do komórek pochw okołowiązkowych, w których następuje ich dekarboksylacja.

Proces dekarboksylacji może być katalizowany przez trzy rodzaje enzymów: enzym jabłczanowy zależny od NADP, enzym jabłczanowy zależny od NAD oraz przez karboksykinazę PEP. Uwolniony w procesie dekarboksylacji, CO_2 ulega asymilacji przez enzym Rubisco (którego występowanie ogranicza się tylko do chloroplastów komórek BS) i zachodzi redukcja CO_2 w cyklu Calvina-Bensona. Powstałe w procesie dekarboksylacji związki, powracają do komórek mezofilu, gdzie regenerowany jest fosfoenolopirogronian (PEP), pierwszy akceptor CO_2 . Reakcja fosforylacji pirogronianu do PEP jest katalizowana przez enzym dikinazę fosfopirogronianu (PPDK), zlokalizowaną w chloroplastach komórek mezofilu i w ten sposób dochodzi do zamknięcia cyklu [8]. Takie przestrzenne rozdzielenie procesów asymilacji i redukcji CO_2 pozwala nawet na ponad dziesięciokrotne (w porównaniu ze stężeniem CO_2 w powietrzu) zwiększenie stężenia dwutlenku węgla w komórkach BS [9]. Utrzymanie wysokiego stężenia CO_2 w komórkach BS wiąże się po części również z brakiem lub niewielką zawartością enzymu anhidrazy węglanowej. Zapobiega to

szybkemu przekształcaniu dwutlenku węgla w anion węglanowy, który nie jest substratem dla Rubisco [10].

Procesy syntezy sacharozy i skrobi są również rozdzielone między dwa typy komórek. Sacharoza syntetyzowana jest głównie w komórkach mezofilu, natomiast skrobia w komórkach pochw okołowiązkowych, ale enzymy odpowiedzialne za przeprowadzenie tych reakcji zostały znalezione w obu typach komórek [11].

BUDOWA LIŚCI ROŚLIN C4

Przestrzenne rozdzielanie procesów asymilacji i redukcji CO₂ pociąga za sobą szereg przystosowań w anatomii i ultrastrukturze liścia [8]. Wyróżniono różne typy budowy liści roślin C4. W najczęściej spotykanym typie, odznaczające się grubymi ścianami komórki pochw okołowiązkowych, ściśle otaczają pojedynczą wiązkę przewodzącą, natomiast komórki mezofilu, o znacznie cieńszych ścianach, zlokalizowane są między epidermą liścia a komórkami BS [12]. Natomiast u niektórych roślin C4 z rodzaju *Cleome*, a także u przedstawicieli z rodziny astrowatych (*Asteraceae*) oraz komosowatych (*Chenopodiaceae*), kilka wiązek przewodzących otoczonych jest przez jeden pierścień komórek pochw okołowiązkowych, a te z kolei otacza pojedynczy pierścień komórek mezofilu [13,14]. Ponadto komórki mezofilu z komórkami pochw okołowiązkowych łączy gęsta sieć plasmodesm, przez które zachodzi intensywny transport metabolitów [8]. W liściach roślin C4 występuje znacznie więcej wiązek przewodzących, w porównaniu z liśćmi roślin C3 [15]. U roślin dwuliściennych z rodzaju *Flaveria* nie dotyczy to zagęszczenia wiązek głównych, lecz tych o wyższej rzędowości (od czwartorzędowych w górę) [16]. Zwiększenie gęstości wiązek przewodzących poprawia zaopatrzenie liści w wodę, co jest ważne w gorących i suchych warunkach. Ma też wpływ na właściwości mechaniczne liścia, co nie jest bez znaczenia w siedliskach wietrznych [1]. Stwierdzono także, że u roślin C4 stosunek ilości komórek M do BS jest niższy w porównaniu z C3 i u niektórych przedstawicieli może on wynosić nawet 1:1 [15,16]. Zwykle w fotosyntezie typu C4 reakcje karboksylacji rozdzielone są przestrzennie między dwa typy komórek, jednakże u niektórych gatunków cały proces może odbywać się w obrębie jednej komórki. Dotyczy to zarówno gatunków wodnych, takich jak *Hydrilla verticillata* i *Egeria densa* [18], jak i lądowych: *Bienertia cycloptera* i *Borszczowia aralocaspica* [19].

U *Suaeda aralocaspica* (wcześniej *Borszczowia aralocaspica*), dwa typy chloroplastów przeprowadzających różne reakcje fotosyntetyczne, rozmieszczone są w innych częściach komórki miękiszu, jeden przy ścianie graniczącej z wiązką przewodzącą, a drugi po przeciwnej stronie komórki [19]. Natomiast u *Bienertia cycloptera* i *Bienertia sinuspersici*, asymilacja CO₂ z udziałem karboksylazy PEP zachodzi w peryferycznej części komórek miękiszu, gdzie zlokalizowane są również chloroplasty posiadające enzym dikinazę pirogronian:Pi zaangażowaną w regenerację PEP. Natomiast procesy dekarboksylacji i redukcji dwutlenku węgla (charakterystyczne dla komórek BS) zachodzą w centralnym przedziale komórki, odznaczającym się dużym skupiskiem chloroplastów, mitochondriów i peroksyosomów, tworzących kolistą

strukturę. Oba te przedziały oddzielone są od siebie dużą wakuolą [20].

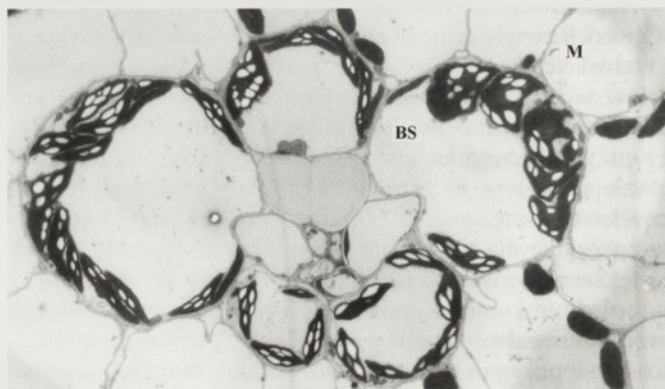
WŁAŚCIWOŚCI ENZYMÓW C4

Enzymy charakterystyczne dla fotosyntezy typu C4: karboksylaza fosfoenolopirogronianowa (PEPC), dikinaza, enzymy przeprowadzające proces dekarboksylacji kwasów w komórkach pochw okołowiązkowych, aminotransferazy, obecne są również w komórkach roślin C3, jednakże ich aktywność u roślin C4 jest od kilkunastu do kilkudziesięciu razy wyższa w porównaniu z roślinami C3 [8]. W przypadku karboksylazy PEP, sekwencja reszt aminokwasowych enzymu występującego u przedstawicieli C3 i C4 rodzaju *Flaveria*, jest homologiczna w 96%, enzymy te różnią się jednak właściwościami kinetycznymi [21] oraz sposobem regulacji [22]. Fakt, że różne reakcje fotosyntezy, zachodzą w mezofilu i komórkach pochw okołowiązkowych roślin C4, wiąże się z inną ekspresją genów w tych komórkach. Wydaje się, że regulacja ekspresji genów specyficznych dla komórek mezofilu odbywa się głównie na poziomie transkrypcji [23], podczas gdy dla komórek BS może odbywać się zarówno na poziomie transkrypcji, jak i na poziomie potranskrypcyjnym (np. ekspresja genów kodujących Rubisco) [24].

PODTYPY METABOLICZNE ROŚLIN C4

W zależności od enzymu przeprowadzającego proces dekarboksylacji, miejsca dekarboksylacji w komórkach pochw okołowiązkowych, a także od rodzaju transportowanego kwasu karboksylowego, w fotosyntezie typu C4 wyróżniono trzy podtypy metaboliczne: NADP-ME, NAD-ME i PEP-CK [25]. Oprócz różnic w reakcjach fazy ciemnej fotosyntezy, rośliny należące do poszczególnych podtypów charakteryzują się swoistymi cechami anatomicznymi i ultrastrukturalnymi. Cechy charakterystyczne poszczególnych podtypów reprezentujących fotosyntezę typu C4 przedstawione zostały w tabeli 1.

U podtypu NADP-ME (Ryc. 2), którego przedstawicielami są m. in.: kukurydza, trzcina cukrowa, sorgo, powstały w reakcji karboksylacji fosfoenolopirogronianu szczawioocetan, redukowany jest do jabłczanu. Reakcja ta zachodzi w chloroplastach komórek mezofilu i katalizowana jest przez



Rycina 2. Rozmieszczenie chloroplastów w komórkach mezofilowych (M) i pochew okołowiązkowych (BS) kukurydzy (podtyp NADP-ME) (zdjęcie A. Drożak).

Tabela 1. Cechy charakterystyczne dla wyróżnienia podtypów roślin C4 opracowane na podstawie literatury.

Cecha	NADP-ME podtyp		NAD-ME podtyp		PEPCK podtyp	
	M	BS	M	BS	M	BS
Rubisco (plastyd)	-	+	-	+	-	+
PEPC (cytosol)	+	-	+	-	+	-
Pobieranie CO ₂	+	-	+	-	+	-
NADP- ME (plastyd)	+	+	-	-	-	-
NAD- ME (mitochondrium)	-	-	+	+	-	-
PEPCK (cytosol)	-	-	-	-	+	+
Transport jabłczanu (plazmodesmy)	+		-			+
Transport pirogronianu (plazmodesmy)	+		-			+
Transport asparagianu (plazmodesmy)	-		+			+
Transport alaniny (plazmodesmy)	-		+			+

M, mezofil; BS, komórki pochew okółowiązkowych; +, obecny; -, brak

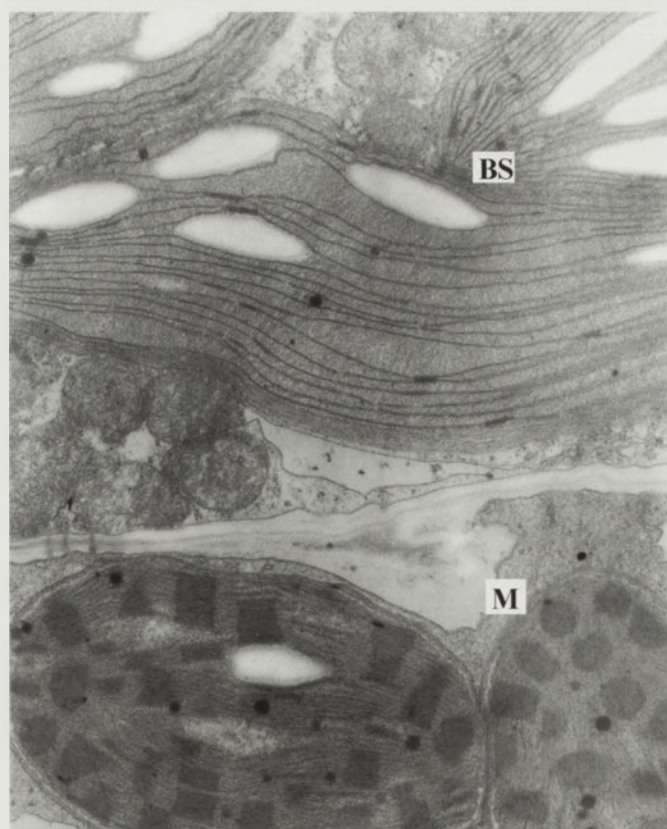
enzym dehydrogenazę jabłczanową, zależną od NADPH. Następnie jabłczan transportowany jest do chloroplastów komórek pochew okółowiązkowych, gdzie następuje jego dekarboksylacja, katalizowana przez enzym jabłczanowy zależny od NADP. W wyniku tej reakcji powstaje CO₂, który jest włączany do cyklu Calvina-Bensona oraz pirogronian, który transportowany jest do chloroplastów komórek mezofilowych. Tam dikinaza fosfopirogronianowa, zużywając ATP, przekształca pirogronian do fosfoenolopirogronianu. W ten sposób cykl ulega zamknięciu [8].

Charakterystyczną cechą roślin o podtypie fotosyntezy NADP-ME jest obecność warstwy suberyny w ścianie komórek pochew okółowiązkowych, sąsiadujących z komórkami mezofilu [26], odśrodkowe ułożenie chloroplastów w komórkach BS (Ryc. 2), a także zróżnicowanie struktury chloroplastów. Chloroplasty w mezofilu mają budowę granową i są mniejsze od chloroplastów komórek pochew okółowiązkowych, które są bezgranowe lub posiadają szczątkowe grana (Ryc. 3) [27,28].

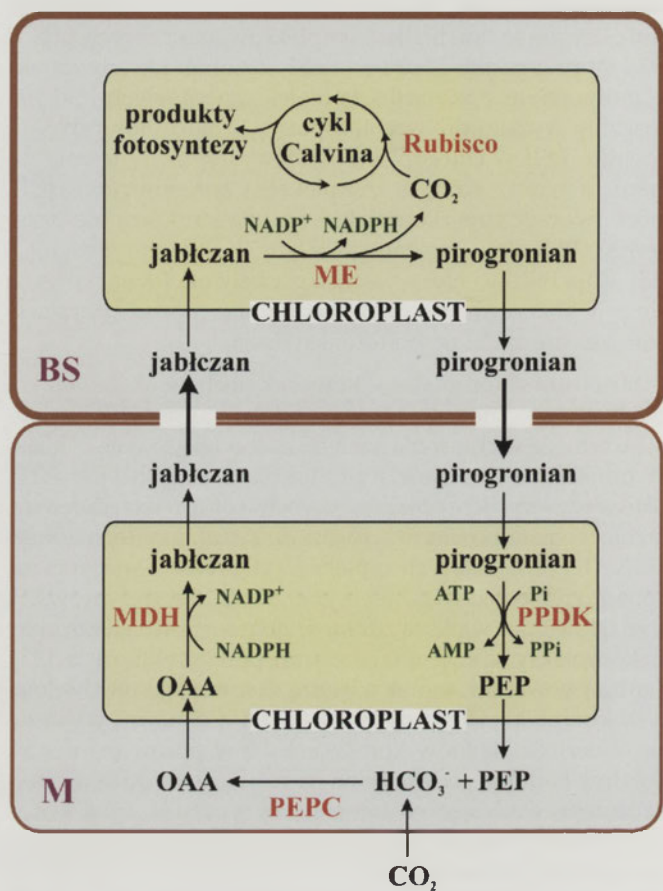
Chloroplasty dwóch typów komórek różnią się także udziałem poszczególnych fotosystemów w błonach tylakoidowych. Dominującym fotoukładem w chloroplastach BS jest fotoukład I (PSI). Początkowo uważano, że chloroplasty te nie posiadają fotoukładu II (PSII) [29,30]. Potem stwierdzono, że jest on obecny, ale jest go znacznie mniej niż w chloroplastach granowych i jest nieaktywny, ze względu na brak białka OEC33 z kompleksu utleniającego wodę oraz, że budowa PSII odpowiada kompleksowi z błon stromowych chloroplastów roślin C3 (występuje w postaci monomeru) [31]. Wykazano jednak, że PSII w chloroplastach z komórek pochew okółowiązkowych posiada wszystkie podjednostki kompleksu utleniającego wodę i jest w stanie transportować

elektrony z H₂O [32]. Mimo że chloroplasty BS nie posiadają gran, obecne są tam białka kompleksów antenowych LHCI [33]. W przypadku Lhcb1 i Lhcb2 stosunek ich zawartości w porównaniu z zawartością białek rdzeniowych PSII jest znacznie wyższy niż w chloroplastach mezofilowych [34]. Ponadto PSII w chloroplastach BS występuje w formie dimeru, a nawet wraz z kompleksem antenowym LHCI, może tworzyć superkompleksy i swoją strukturą nie przypomina PSII zlokalizowanego w lamellach stromy roślin C3 [35]. Rola PSII w chloroplastach pochew okółowiązkowych nie jest jeszcze dokładnie poznana, ale można przypuszczać, że chroni PSI przed fotooksydacją.

Struktura chloroplastów komórek pochew okółowiązkowych, a także znacznie większy udział PSI niż PSII, świadczą o tym, że w chloroplastach BS zachodzi głównie cykliczny transport elektronów, a produktem fazy jasnej jest ATP. Potwierdza to także obecność dwóch izoform ferredoksyny, różniących się powinowactwem do reduktazy ferredoksyny: NADP⁺ [36], których synteza jest tkankowo specyficzna. Ponadto ferredoksyna II (specyficzna dla chloroplastów BS) wydaje się mieć większą zdolność do transportu elektronów na kompleksy biorące udział w transporcie cyklicznym [37]. Zaobserwowano również większą ekspresję genów kodujących kompleks dehydrogenazy (NDH) [38] oraz zwiększoną zawartość białka w komórkach BS w porównaniu z M. Ostatnie badania prowadzone na roślinach z rodzaju *Flaveria* przeprowadzających fotosyntezę typu: C4, C3-C4 oraz C3 wykazały zwiększoną zawartość kompleksu NDH oraz białka PGR5 w roślinach C4, w porównaniu z pozostałymi typami oraz ich specyficzną lokalizację w komórkach BS



Rycina 3. Ultrastruktura chloroplastów komórek pochew okółowiązkowych (BS) i mezofilu (M) kukurydzy (zdjęcie A. Drożak).



Rycina 4. Reakcje fazy ciemnej fotosyntezy u podtypu metabolicznego NADP-ME roślin C4. Schemat wykonano na podstawie Hatch'a [8]. Kolorem czerwonym oznaczono enzymy katalizujące reakcje. MDH – dehydrogenaza jabłczanowa; ME – enzym jabłczanowy; OAA – szczawiooocian; PEP – fosfoenolopirogronian; PEPC – karboksylaza PEP; PPDK – dikinaza pirogronian; Pi; Rubisco – karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu.

[39]. Udział białka PRG5 w cyklicznym transporcie elektronów również potwierdzono u *Arabidopsis thaliana* [40].

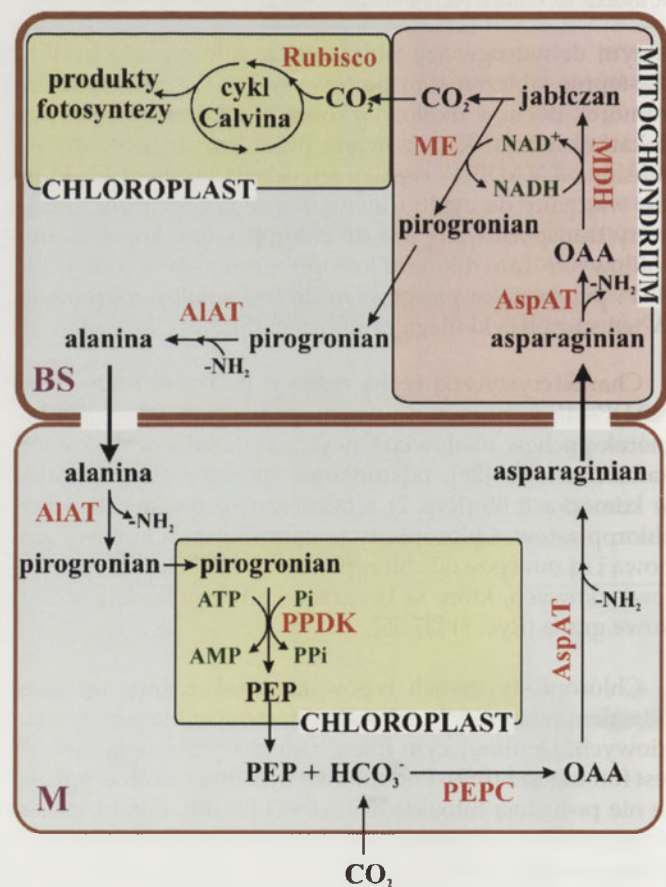
U podtypu NADP-ME głównym produktem fazy jasnej fotosyntezy w chloroplastach BS jest ATP, NADPH potrzebne do redukcji 3-fosfoglicerynianu (3-PGA) w cyklu Calvin-Bensona, pochodzi z reakcji dekarboksylacji jabłczanu przeprowadzanej przez enzym jabłczanowy zależny od NADP+ (Ryc. 4). Połowa powstającego 3-PGA transportowana jest do chloroplastów mezofilowych, gdzie zachodzi jego redukcja do aldehydu 3-fosfoglicerynowego (G3P), który następnie może być transportowany do chloroplastów BS i włączany na dalszym etapie do cyklu Calvin-Bensona [8].

U roślin C4 reprezentujących podtyp NAD-ME (Ryc. 5), którego przedstawicielem jest np. proso zwyczajne, powstający w cytoplazmie szczawiooocian przekształcany jest przez enzym aminotransferazę asparaginianową (AspAT) do asparaginianu i w tej postaci transportowany do mitochondriów komórek pochew okołowiązkowych. Tam następuje jego deaminacja i ponowne przekształcenie w szczawiooocian, który redukowany jest do jabłczanu przez enzym dehydrogenazę jabłczanową, zużywającą NADH. W mitochondriach zachodzi również dekarboksylacja jabłczanu, katalizowana przez enzym jabłczanowy zależny od NAD. Produktami tej reakcji są: CO₂, który jest włączany w

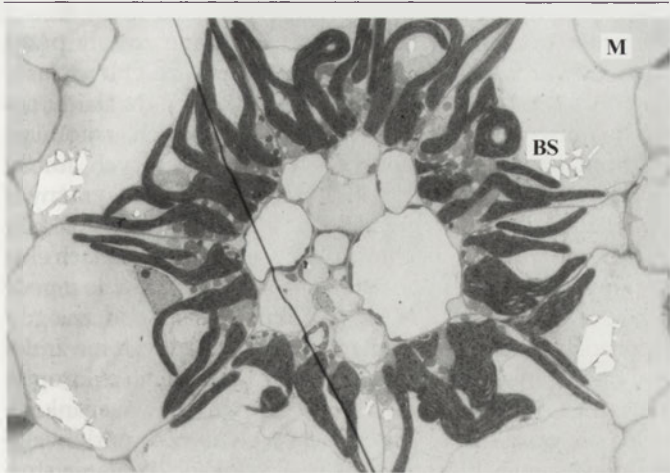
chloroplastach do cyklu Calvin-Bensona oraz pirogronian, który w cytoplazmie przekształcany jest przez aminotransferazę alaninową (ALAT) do alaniny i następnie transportowany do komórek mezofilu. W cytoplazmie komórek mezofilu zachodzi odtworzenie pirogronianu, a jego fosforylacja i przekształcenie do fosfoenolopirogronianu zachodzi w chloroplastach i jest katalizowana przez enzym dikinazę fosfopirogronianu [8].

Pod względem budowy anatomicznej, przedstawiciele podtypu NAD-ME wyróżniają się dośrodkowym umieszczeniem chloroplastów i mitochondriów w komórkach pochew okołowiązkowych [27], znacznie większym udziałem tych organelli (szczególnie mitochondriów) w komórkach BS [28] oraz brakiem warstwy suberyny w ścianach komórkowych [26] (Ryc. 6).

Takie ułożenie chloroplastów i mitochondriów zapobiega dyfuzji CO₂ z komórek BS przy braku dodatkowej bariery, jaką stanowi warstwa suberynowa. Charakterystyczną cechą podtypu są też większe rozmiary chloroplastów i peroksysomów zlokalizowanych w komórkach BS w porównaniu z mezofilowymi, natomiast wielkość mitochondriów nie różni się w obu typach komórek [28]. Chloroplasty M i BS mają strukturę granową [27], zdolne są do wytwarzania ATP i NADPH w fazie jasnej fotosyntezy [8], ale różnią się



Rycina 5. Reakcje fazy ciemnej fotosyntezy u podtypu metabolicznego NAD-ME roślin C4. Schemat wykonano na podstawie Hatch'a [8]. Kolorem czerwonym oznaczono enzymy katalizujące reakcje. ALAT – aminotransferaza alaninowa; AspAT – aminotransferaza asparaginianowa; MDH – dehydrogenaza jabłczanowa; ME – enzym jabłczanowy; OAA – szczawiooocian; PEP – fosfoenolopirogronian; PEPC – karboksylaza PEP; PPDK – dikinaza pirogronian; Pi; Rubisco – karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu.



Rycina 6. Rozmieszczenie chloroplastów w komórkach mezofilowych (M) i pochwów okółowiązkowych (BS) prosa zwyczajnego (podtyp NAD-ME) (zdjęcie A. Drożak).

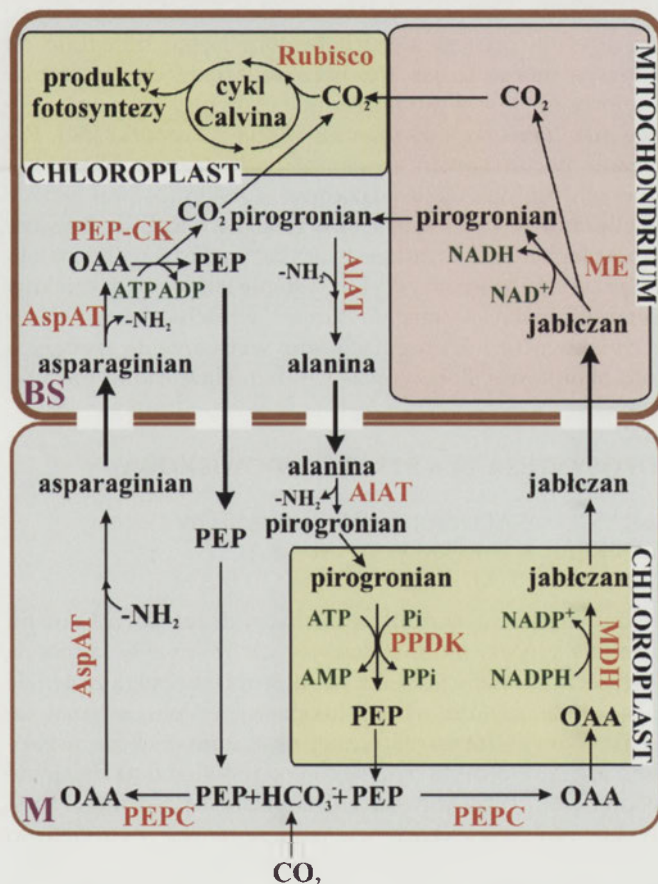
ultrastrukturą i udziałem PSII. Chloroplasty komórek pochwów okółowiązkowych u roślin należących do podtypu NAD-ME charakteryzuje większy udział błon ścięśnionych do nieścięśnionych [41] oraz większa zawartość fotoukładu II [42,43] w porównaniu z chloroplastami mezofilowymi. Podobne strukturalne różnicowanie chloroplastów występuje u *Binertia cycloptera*, rośliny należącej do podtypu NAD-ME [44], u której proces fotosyntezy zachodzi w obrębie jednej komórki. Chloroplasty znajdujące się w centralnym przedziale komórki (funkcjonalnie odpowiadające chloroplastom z komórek BS) mają 1,5-róża większy indeks granowy i większy rozmiar gran w porównaniu z chloroplastami zlokalizowanymi w części peryferycznej (odpowiadającymi chloroplastom z komórek mezofilu) [45]. W przeciwieństwie do roślin z podtypu NADP-ME, u tego podtypu proponuje się większy udział cyklicznego, zależnego od NDH, transportu elektronów w chloroplastach mezofilowych w porównaniu z chloroplastami komórek pochwów okółowiązkowych. Znajduje to odzwierciedlenie w znacznej różnicy w zawartości białka NDH między komórkami M i BS [46]. Może mieć to również związek z większym zapotrzebowaniem komórek mezofilu na ATP powstające w fazie jasnej fotosyntezy [8].

W przeciwieństwie do wcześniej opisanych podtypów, których przedstawiciele należą zarówno do roślin jedno-, jak i dwuliściennych, podtyp PEPCK spotykany jest wyłącznie u roślin jednoliściennych [47]. Charakteryzuje się on bardziej złożonym przebiegiem fazy ciemnej fotosyntezy (Ryc. 7). Z komórek mezofilu do komórek pochwów okółowiązkowych mogą być transportowane zarówno jabłczan, jak i asparaginian, a reakcja dekarboksylacji może zachodzić przy udziale dwóch enzymów. W pierwszym przypadku, powstający, w wyniku karboksylacji fosfoenolpirogrogonianu (PEP) szczawiooctan, może być przekształcany (tak jak u podtypu NAD-ME) w asparaginian, który jest następnie transportowany do cytoplazmy komórek pochwów okółowiązkowych. Asparaginian ulega tam deaminacji do szczawiooctanu, substratu dla karboksylazy PEP (PEP-CK). Enzym ten, używając cząsteczkę ATP, przekształca OAA do fosfoenolpirogrogonianu i CO_2 [48]. Następnie PEP wraca do komórek mezofilu, gdzie może być ponownie karboksy-

lowany, a CO_2 włączany jest do cyklu Calvina-Bensona w chloroplastach BS.

Drugim z możliwych sposobów przebiegu fazy ciemnej, jest redukcja szczawiooctanu do jabłczanu. Reakcja ta, podobnie jak u podtypu NADP-ME zachodzi w chloroplastach mezofilu i katalizowana jest przez dehydrogenazę jabłczanową, zależną od NADP. Jabłczan transportowany jest do mitochondriów komórek BS i tam zachodzi jego dekarboksylacja przy pomocy enzymu jabłczanowego zależnego od NAD. Uwolniony CO_2 włączany jest do cyklu Calvina-Bensona, a powstający NADH może służyć jako substrat dla łańcucha oddechowego. Produktem tej reakcji jest również pirogrogonian, przekształcany w cytoplazmie do alaniny. Alanina transportowana jest do komórek mezofilowych, tam ulega deaminacji, a odtworzony pirogrogonian służy jako substrat dla dikinazy fosfopirogrogonianu i przekształcany jest w PEP [8]. Szacuje się, że oba te sposoby dekarboksylacji dostarczają w równym stopniu CO_2 do cyklu Calvina-Bensona. ATP, zużywany przez karboksylazę PEP może pochodzić z utlenienia NADH, wytwarzanego w mitochondriach w reakcji dekarboksylacji jabłczanu przez enzym jabłczanowy zależny od NAD [49].

U roślin wykazujących ten podtyp fotosyntezy, zaobserwowano obecność warstwy suberyny w tej części ściany



Rycina 7. Reakcje fazy ciemnej fotosyntezy u podtypu metabolicznego PEP-CK roślin C4. Schemat wykonano na podstawie Hatch'a [8]. Kolorem czerwonym oznaczono enzymy katalizujące reakcje. AIAT - aminotransferaza alaninowa; AspAT - aminotransferaza asparaginianowa; MDH - dehydrogenaza jabłczanowa; ME - enzym jabłczanowy; OAA - szczawiooctan; PEP - fosfoenolpirogrogonian; PEPCK - karboksylaza PEP; PEP-CK - karboksylaza PEP; PPDK - dikinaza pirogrogonian; Pi - karboksylaza/oxygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu.

komórek pochw okołowiązkowych, która graniczy z mezofilem [26]. Chloroplasty i mitochondria występują licznie w komórkach BS w porównaniu z komórkami M i dodatkowo mają większe rozmiary [28]. Organelle w komórkach pochw okołowiązkowych mogą być ułożone odśrodkowo lub rozmieszczone równomiernie w całej komórce [28,47]. Chloroplasty w obu typach komórek mają strukturę granową, ale różnią się wielkością gran, w komórkach mezofilu grana mają układ centryfugalny i zawierają więcej błon tylakoidowych przypadających na granum [47] (Ryc. 8)

U wszystkich badanych podtypów zaobserwowano większy udział organelli w komórkach pochw okołowiązkowych w porównaniu z mezofilem, jednakże w odniesieniu do całego liścia, udział chloroplastów BS w ogólnej puli wynosi od 30 do 46% u wszystkich podtypów. Natomiast mitochondria, występujące w komórkach pochw okołowiązkowych stanowią od 30 do 85% całkowitej zawartości w liściu. Najmniej mitochondriów zaobserwowano u przedstawicieli podtypu NADP-ME, natomiast najwięcej u roślin z podtypu PEPCK [28]. Liczba mitochondriów w komórkach jest ściśle skorelowana z różnym zapotrzebowaniem energetycznym roślin reprezentujących podtypy C4.

Opisany powyżej mechanizm koncentracji CO₂ rozwinięty przez rośliny C4 w komórkach pochw okołowiązkowych, jak również inne przystosowania takie jak obecność warstwy suberynowej w ścianie komórkowej, miejsce zachodzenia procesu dekarboksylacji i jego odległość od warstwy mezofilu, jak też rozmieszczenie chloroplastów i mitochondriów w komórce, mają również na celu zapobieganie „ucieczce” dwutlenku węgla z komórki [50]. Powstanie przystosowań zwiększających stężenie CO₂ w komórkach pochwy okołowiązkowej u roślin C4 praktycznie wyeliminowało aktywność oksygenazową Rubisco i proces fotooddychania. Warunkuje to szybszy wzrost roślin i większe przyrosty biomasy. Wykorzystanie istniejących szlaków metabolicznych wymagało zmian właściwości kinetycznych enzymów i ich regulacji oraz wytworzenia specyficzności tkankowej. Fotosynteza C4 uzupełnia zatem metabolizm C3.

FOTOSYNTENZA C4 A STRES ŚRODOWISKOWY

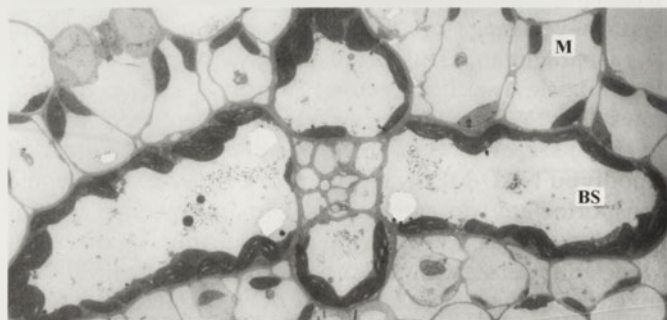
ZMIANY LOKALIZACJI CHLOROPLASTÓW W OBRĘBIE KOMÓRKI W WARUNKACH DZIAŁANIA STRESU ŚRODOWISKOWEGO

Zmieniające się warunki świetlne podczas wzrostu roślin indukują procesy aklimatyzacyjne zachodzące w komórce. Powszechnie znany jest fakt, że chloroplasty mogą zmieniać swoją wewnątrzkomórkową lokalizację w celu optymalizacji aktywności fotosyntetycznej oraz zmniejszenia uszkodzeń aparatu fotosyntetycznego w odpowiedzi na działanie światła [51]. W ciemności chloroplasty są rozmieszczone zwykle pod wszystkimi ścianami komórki. W świetle o niskim i wysokim natężeniu gromadzą się odpowiednio, przy ścianach prostopadłych lub równoległych do kierunku jego padania [52]. Te formy odpowiedzi chloroplastów na natężenia światła mogą być modyfikowane również przez inne czynniki środowiskowe [53,54]. Niewiele uwagi poświęcono ruchowi chloroplastów w komórkach roślin typu C4. Obserwacje zmian w wewnątrzkomórkowej lokalizacji

chloroplastów u tych roślin w odpowiedzi na stresy środowiskowe, inne niż światło, zapoczątkowane zostały przez Lal i Edwards [55]. Wykazano wówczas, że chloroplasty komórek mezofilowych kukurydzy poddane działaniu suszy lokalizują się wzdłuż ścian komórkowych, natomiast chloroplasty komórek pochw okołowiązkowych traciły swą odśrodkową pozycję. Efekt ten nie był tak wyraźny u *Amaranthus cruentus* przedstawiciela podtypu NAD-ME. Wykazano również, że chloroplasty mezofilu w liściach eksponowanych na wysokie natężenia światła, zarówno u podtypu NADP-ME, jak i NAD-ME skupiały się, podczas gdy chloroplasty komórek pochw okołowiązkowych nie zmieniały położenia. Opisane zmiany rozmieszczenia chloroplastów mezofilowych miały miejsce również w warunkach zasolenia oraz suszy. Obserwacje wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia chloroplastów w warunkach działania stresu środowiskowego wskazują na to, że położenie chloroplastów w obu typach komórek podlega innej kontroli, a skupianie się chloroplastów w komórkach mezofilowych jest mechanizmem adaptacyjnym w warunkach stresowych [51].

TOLERANCJA NA CHŁÓD ROŚLIN C4

Produktywność wielu gatunków roślin reprezentujących fotosyntezę typu C4, włączając gatunki zbóż takich jak kukurydza, sorgo czy trzcina cukrowa jest limitowana przez niską wydajność fotosyntetyczną w obniżonych temperaturach. Do wyjątków należy m.in. *Miscanthus x giganteus*, wieloletnia trawa, która nie tylko jest w stanie przetrwać w niskich temperaturach, ale jest wysoce produktywna w chłodnym klimacie [56]. W Wielkiej Brytanii jej produkcja wynosi ponad 30 ton suchej masy/ha/rok. Natomiast u kukurydzy rosnącej w 14°C maksymalne natężenie fotosyntezy jest obniżone o 90% w porównaniu ze wzrostem w temperaturze 25°C. Temperatura 14°C podczas wzrostu nie zmniejsza wydajności fotosyntezy u *Miscanthus x giganteus* a niewielkie obniżenie natężenia procesu obserwuje się w temperaturze 10°C [57]. Molekularny mechanizm, dzięki któremu gatunki C4 tolerujące chłód utrzymują wysoką wydajność fotosyntezy pozostaje nieznan. Wykazano natomiast, że u gatunków roślin C4 nietolerujących chłodu (temperatura poniżej 15°C) poza obniżeniem asymilacji CO₂ dochodzi do fotoinhibicji aparatu fotosyntetycznego [56]. U gatunku *Miscanthus x giganteus* nie stwierdza się takich uszkodzeń, jest wysoki poziom asymilacji CO₂ i obserwuje się zwiększenie niefotochemicznego wygaszania nadmiaru energii, które bezpośrednio związane jest ze zwiększeniem udziału cyklu



Rycina 8. Rozmieszczenie chloroplastów w komórkach mezofilowych (M) i pochw okołowiązkowych (BS) prosa olbrzymiego (podtyp PEP-CK) (zdjęcie A. Drożak).

ksantofilowego oraz wyższą zawartością antyoksydantów [57]. Indukowane chłodem obniżenie natężenia fotosyntezy u roślin C4 jest skorelowane ze zmniejszeniem: wydajności karboksylacji PEP, regeneracji PEP, aktywności Rubisco bądź hamowania w różnym stopniu wyżej wymienionych procesów [56]. Nie obserwowano jednak zwiększenia zawartości Rubisco u roślin C4 w odpowiedzi na działanie niskiej temperatury. Ponadto, wcześniejsze analizy *Miscanthus x giganteus* potwierdziły, że zawartości tego białka pozostawała na stałym poziomie przy zmianie temperatury (z 14 na 25°C) podczas wzrostu roślin. Jednocześnie stwierdzono wyraźne zwiększenie zawartości PPK [58]. W jaki sposób zatem utrzymana jest maksymalna wydajność fotosyntezy u gatunków C4 tolerujących/preferujących wzrost przy obniżonej temperaturze? Wykazano, że enzym Rubisco u roślin C3 pochodzących z chłodnych środowisk w porównaniu z roślinami środowisk ciepłych charakteryzował się wyższą wartością stałej karboksylacji. Stwierdzono również, wyższą wartość tej stałej dla roślin szpinaku rosnących w niskiej temperaturze [59]. Porównując Rubisco z dwóch gatunków: kukurydzy i z roślin *Miscanthus* wykazano 91% oraz 89% homologii, odpowiednio w sekwencji cDNA i białka. Sekwencje odpowiadające za stabilność termiczną enzymu, tworzeniu holoenzymu są zachowane w ewolucji. Odpowiedź roślin, zarówno C3 jak i C4 na zmiany temperatury zależy od natężenia światła i stężenia CO₂. U roślin C4 wzrost temperatury powoduje zwiększenie pobierania CO₂ wraz z natężeniem światła.

FOTOSYNTENZA C4 A STRES WODNY

Stres wodny jest jednym z czynników, który w największym stopniu ogranicza produktywność roślin, a spowodowany jest brakiem dostępnej wody w środowisku glebowym oraz w atmosferze. Głównymi symptomami związanymi z działaniem stresu wodnego na rośliny typu C4 są zmniejszenie aktywności enzymów cyklu Calvina oraz obniżenie zawartości ATP [60]. W odpowiedzi na suszę dochodzi do syntezy białek np. enzymów antyoksydacyjnych, białek odpowiedzialnych za przekazywanie sygnału oraz białek opiekuńczych [61]. Większość roślin C4 jest lepiej zaadaptowana do stresu związanego z suszą niż przedstawiciele roślin C3. Zrozumienie mechanizmów różnicowania i rozdziału funkcji pomiędzy komórki mezofilowe i pochw okołowiązkowych jest kluczowa u roślin C4 w wykorzystaniu potencjału fotosyntetycznego tych roślin w warunkach niekorzystnych.

FOTOSYNTENZA C4 A NATĘŻENIE ŚWIATŁA

Światło jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za budowę anatomiczną liścia. Wpływa ono na ilość, wielkość i ułożenie chloroplastów w komórce oraz ich ultrastrukturę [62]. Wiadomo również, że natężenie światła warunkuje zawartość kompleksów w tylakoidach jak też reguluje wielkość i skład kompleksów antenowych [63].

Wcześniej uważano, że natężenie światła nie ma wpływu na ultrastrukturę chloroplastów roślin C4, szczególnie u podtypu NADP-ME [27]. Badania ostatnich lat wykazały, że rośliny C4 prezentują różne strategie pozwalające na jak najlepsze wykorzystanie światła. Dla kukurydzy (podtyp

NADP-ME) związane jest to ze zmianami wielkości anten LHClI bez wpływu na ultrastrukturę chloroplastów, natomiast u podtypu NAD-ME i PEP-CK ze zmianami liczby i wielkości gran bez zmian w obrębie białek antenowych [64]. Zwiększanie liczby gran także wpływa na efektywność wychwytywania światła, gdyż przekazywanie energii wzbudzenia może zachodzić nie tylko między kompleksami zlokalizowanymi w obrębie jednej błony, ale także pomiędzy kompleksami sąsiadującymi ze sobą ściśnionych błon [65]. Zróżnicowana struktura granowa pozwala też na utrzymanie równowagi między cyklicznym i niecyklicznym transportem elektronów [66]. Może to zatem tłumaczyć zmiany w strukturze chloroplastów roślin C4 w celu jak najlepszego wykorzystania światła. Chociaż rośliny C4 dostosowały się do wzrostu w warunkach silnego oświetlenia i wysokiej temperatury [8], to stwierdzono, że podobnie jak u roślin C3 ich aparat fotosyntetyczny również ulega fotoinhibicji.

U roślin C4 ściśle współdziałanie chloroplastów z dwóch rodzajów komórek, pozwala na wyeliminowanie procesu fotooddychania w warunkach silnego oświetlenia i wysokiej temperatury. Rośliny te nie potrafią jednak tak dobrze jak rośliny C3, przystosować się do wzrostu w środowiskach zacienionych oraz do efektywnego wykorzystywania krótkich błysków światła o wysokim natężeniu. Rośliny C4 należące do trzech podtypów metabolicznych, wytworzyły odmienne strategie zapewniające przystosowanie do różnych warunków świetlnych środowiska. Dotyczy to dostosowania przez zmianę wielkości kompleksów antenowych lub zmiany struktury chloroplastu. Wydaje się, że różnice w intensywności reakcji świetlnych fotosyntezy przebiegających w zróżnicowanych strukturalnie i funkcjonalnie chloroplastach komórek mezofilowych i pochw okołowiązkowych roślin C4 są ważnym strategicznym mechanizmem umożliwiającym roślinom C4 lepsze przystosowanie się do wysokich natężeń światła podczas wzrostu z jednoczesnym obniżeniem strat energii niewykorzystywanej w fotosyntezie. Charakter polifiletyczny ewolucji roślin C4 sugeruje, że modyfikacje anatomiczne i biochemiczne, które pojawiły się u wielu gatunków roślin wymagały stosunkowo niewielkich zmian głównie w ekspresji genów warunkujących dostosowanie aparatu fotosyntetycznego. Zatem uzyskanie roślin C3 o funkcji typu „C4-like” jest teoretycznie możliwe.

PIŚMIENNICTWO

1. Sage RF (2004) The evolution of C₄ photosynthesis. *New Phytol* 161: 341-370
2. Hibberd JM, Sheehy JE, Langdale JA (2008) Using C₄ photosynthesis to increase the yield of rice – rationale and feasibility. *Curr Opin Plant Biol* 11: 228- 231
3. Tanigushi Y, Ohkawa H, Masumoto C, Fukuda T, Tamai T, Lee K, Sudoh S, Tshuhida H, Sasaki H, Fukayama H, Miyao M (2008) Overproduction of C₄ photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an aproch to introduce the C₄-like photosynthetic pathway into rice. *J Exp Bot* 59: 1799-1809
4. Reinfelder JR, Kraepiel AM, Morel FM (2000) Unicellular C₄ photosynthesis in a marine diatom. *Nature* 407: 996-999
5. Rawsthorne S (1992) Intermediate photosynthesis: linking physiology to gene expression. *Plant J* 2: 267-274
6. Christin PA, Salamin N, Savolainen V, Duvall MR, Besnard G (2007) C₄ photosynthesis evolved in grasses via parallel adaptive genetic changes. *Curr Biol* 17: 1241-1247

7. Waters MT, Langdale JA (2009) The making of the chloroplasts. *EMBO J* 28: 2861-2873
8. Hatch MD (1987) C₄ photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim Biophys Acta* 895: 81-106
9. Furbank RT, Hatch MD (1987) Mechanism of C₄ photosynthesis. The size and composition of the inorganic carbon pool in bundle sheath cells. *Plant Physiol* 85: 958-964
10. Burnell JN, Hatch MD (1988 a) Low bundle sheath carbonic anhydrase is apparently essential for effective C₄ pathway operation. *Plant Physiol* 86: 1252-1256
11. Majeran W, Cai Y, Sun Q, van Wijk KJ (2005) Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomic. *Plant Cell* 17: 3111-3140
12. Hatch MD (1992) C₄ photosynthesis: an unlikely process full of surprises. *Plant Cell Physiol* 33: 333-342
13. Kadereit G, Borsch T, Weising K, Freitag H (2003) Phylogeny of *Amaranthaceae* and *Chenopodiaceae* and the evolution of C₄ photosynthesis. *Int J of Plant Sci* 164: 959-986
14. Koteyeva NK, Voznesenskaya EV, Roalson EH, Edwards GE (2011) Diversity in forms of C₄ in the genus *Cleome* (Cleomaceae). *Ann Bot* 107: 269-283
15. Dengler NG, Dengler RE, Donnelly PM, Hattersley PW (1994) Quantitative leaf anatomy of C3 and C4 grasses (Poaceae): bundle sheath and mesophyll surface area relationship. *Ann Bot* 73: 241-255
16. McKown A, Dengler NG (2009) Shifts in leaf vein density through accelerated vein formation in C₄ *Flaveria* (Asteraceae). *Ann Bot* 104: 1085-1089
17. Sage RF, McKown AD (2006) Is C₄ photosynthesis less phenotypically plastic than C₃ photosynthesis? *J Exp Bot* 57: 303-317
18. Bowes G, Rao SK, Estavillo GM, Reiskind JB (2002) C4 mechanism in aquatic angiosperms comparisons with terrestrial C4 systems. *Funct Plant Biol* 29: 379-392
19. Voznesenskaya EV, Franceschi VR, Kiirats O, Freitag H, Edwards GE (2001) Kranz anatomy is not essential for terrestrial C₄ plant photosynthesis. *Nature* 414: 543-546
20. Voznesenskaya EV, Koteyeva NK, Chuong SDX, Akhani H, Edwards GE, Franceschi VR (2005) Differentiation of cellular and biochemical features of the single-cell C₄ syndrome during leaf development in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *Am J Bot* 92: 1784-1795
21. Izui K, Matsumura H, Furumoto T, Kai Y (2004) Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Ann Rev Plant Biol* 55: 69-84
22. Svensson P, Blasing OE, Westhoff P (2003) Evolution of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch Biochem Biophys* 414: 180-188
23. Langdale JA, Taylor WC, Nelson T (1991) Cell-specific accumulation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase is correlated with demethylation at a specific site >3 kb upstream of the gene. *Mol Gen Genet* 225: 49-55
24. Sheen J (1999) C₄ gene expression. *Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol* 50: 187-217
25. Hatch MD, Kagawa T, Craig S (1975) Subdivision of C₄-pathway species based on differing C₄ acid decarboxylating systems and ultrastructural features. *Aust J Plant Physiol* 2: 111-128
26. Hattersley PW, Browning AJ (1981) Occurrence of suberised lamella in leaves of grasses of different photosynthetic types. I. In parenchymatous bundle sheath and PCR ('Kranz') sheaths. *Protoplasma* 109: 371-401
27. Laetsch WM (1971) Chloroplast structural relationships in leaves of C₄ plants. W: Hatch MD, Osmond CB, Slatyer RO (red) *Photosynthesis and Photorespiration*, Wiley-Interscience, New York, str. 323-349
28. Yoshimura Y, Kubota F, Ueno O (2004) Structural and biochemical bases of photorespiration in C₄ plants: quantification of organelles and glycine decarboxylase. *Planta* 220: 307-317
29. Woo KC, Anderson JM, Boardman NK, Downton WJS, Osmond CB, Thorne SW (1970) Deficient photosystem II in agranal bundle sheath chloroplasts of C₄ plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 67: 18-25
30. Schuster G, Ohad I, Martineau B, Taylor WC (1985) Differentiation and development of bundle sheath and mesophyll thylakoids in maize. Thylakoid polypeptide composition, phosphorylation and organization of photosystem II. *J Biol Chem* 260: 11866-11873
31. Bassi R, Marquardt J, Lavergne J (1995) Biochemical and functional properties of photosystem II in agranal membranes from maize mesophyll and bundle sheath chloroplasts. *Eur J Biochem* 233: 709-719
32. Romanowska E, Drozak A, Pokorska B, Shiell BJ, Michalski WP (2006) Organization and activity of photosystems in the mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *J Plant Physiol* 163: 607-618
33. Vainstein A, Ferreira P, Peterson CC, Verbeke JA, Thornber JP (1989) Expression of the major light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein and its import into thylakoids of mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *Plant Physiol* 89: 602-609
34. Drozak A, Romanowska E (2006) Acclimation of mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize to different irradiances during growth. *Biochim Biophys Acta* 1757: 1539-1546
35. Romanowska E, Kargul J, Powikrowska M, Finazzi G, Nield J, Drozak A, Pokorska B (2008) Structural organization of photosynthetic apparatus in agranal chloroplasts of maize. *J Biol Chem* 283: 26037-26046
36. Matsumura T, Kimata-Arigo Y, Sakakibara H, Sugiyama T, Murata H, Takao T, Shimomishi Y, Hase T (1999) Complementary DNA cloning and characterization of ferredoxin localized in bundle-sheath cells of maize leaves. *Plant Physiol* 119: 481-488
37. Kimata-Arigo Y, Matsumura T, Kada S, Fujimoto H, Fujita Y, Endo T, Mano J, Sato F, Hase T (2000) Differential electron flow around photosystem I by two C₄-photosynthetic-cell-specific ferredoxins. *EMBO J* 19: 5041-5050
38. Majeran W, Zybailov B, Ytterberg AJ, Dunsmore J, Sun Q, Wijk KJ (2008) Consequences of C₄ differentiation for chloroplast membrane proteomes in maize mesophyll and bundle sheath cells. *Mol Cell Proteomics* 7: 1609-1638
39. Munekage YN, Eymery F, Rumeau D, Cuine S, Oguri M, Nakamura N, Yokota A, Genty B, Peltier G (2010) Elevated expression of PGR5 and NDH-H in bundle sheath chloroplasts in C₄ *Flaveria* species. *Plant Cell Physiol* 51: 664-668
40. Munekage YN, Genty B, Peltier G (2008) Effect of PGR5 impairment on photosynthesis and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 49: 1688-1698
41. Voznesenskaya EV, Franceschi VR, Pyankov VI, Edwards GE (1999) Anatomy, chloroplast structure and compartmentation of enzymes relative to photosynthetic mechanisms in leaves and cotyledons of species in the tribe *Salsoleae* (Chenopodiaceae). *J Exp Bot* 50: 1779-1795
42. Pfündel E, Nagel E, Meister A (1996) Analyzing the light energy distribution in the photosynthetic apparatus of C₄ plants using highly purified mesophyll and bundle-sheath thylakoids. *Plant Physiol* 112: 1055-1070
43. Pfündel E, Neubohn B (1999) Assessing photosystem I and II in leaves from C₄ plants using confocal laser scanning microscopy. *Plant Cell Environ* 22: 1569-1577
44. Offermann S, Okita TW, Edwards GE (2011) Resolving the compartmentation and function of C₄ photosynthesis in single-cell C₄ species *Bienertia sinuspersici*. *Plant Physiol* 155: 1622-1628
45. Voznesenskaya EV, Franceschi VR, Kiirats O, Artyusheva EG, Freitag H, Edwards GE (2002) Proof of C₄ photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *Plant J* 31: 649-662
46. Takabayashi A, Kishine M, Asada K, Endo T, Sato F (2005) Differential use of two cyclic electron flows around photosystem I for driving CO₂-concentration mechanism in C₄ photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16898-16903
47. Voznesenskaya EV, Franceschi VR, Chuong SDX, Edwards GE (2006) Functional characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase-type C4 leaf anatomy: immuno-, cytochemical and ultrastructural analyses. *Ann Bot* 98: 77-91
48. Watanabe M, Ohnishi J, Kanai R (1984) Intracellular localization of phosphoenolpyruvate carboxylase in bundle sheath cells of C4 plants. *Plant Cell Physiol* 25: 69-76

49. Burnell JN, Hatch MD (1988) Photosynthesis in phosphoenolpyruvate carboxykinase-type C₄ plants: pathways of C₄ acid decarboxylation in bundle sheath cells of *Urochloa panicoides*. Arch Biochem Biophys 260: 187-199
50. von Caemmerer S, Furbank RT (2003) The C₄ pathway: an efficient CO₂ pump. Photosynth Res 77: 191-207
51. Yamada M, Kawasaki M, Sugiyama T, Miyake H, Taniguchi M (2009) Differential positioning of C₄ mesophyll and bundle sheath chloroplasts: aggregative movement of C₄ mesophyll chloroplasts in response to environmental stresses. Plant Cell Physiol 50: 1736-1749
52. Niska-Mazur A, Bernas T, Gabrys H (2009) *In vivo* reorganization of the actin cytoskeleton in leaves of *Nicotiana tabacum* L. transformed with plastin-GFP: Correlation with light-activated chloroplast responses. BMC- Plant Biol 9: 1-14
53. Sato Y, Kadota A (2007) Chloroplast movements in response to environmental signals. W: Wise RR, Hooper JK (red) The Structure and Function of Plastids, Springer, str. 527-537
54. Kodama Y, Tsuboi H, Kagawa T, Wada M (2008) Low temperature-induced chloroplast relocation mediated by a blue light receptor, phototropin 2, in fern gametophytes. J Plant Res 121: 441-448
55. Lal A, Edwards GE (1996) Analysis of inhibition of photosynthesis under water stress in the C₄ species *Amaranthus cruentus* and *Zea mays*: electron transport, CO₂ fixation and carboxylation capacity. Aust J Bot 23: 403-412
56. Wang D, Naidu SL, Portis Jr AR, Moose SP, Long SP (2008) Can the cold tolerance of C₄ photosynthesis in *Miscanthus x giganteus* relative to *Zea mays* be explained by differences in activities and thermal properties of Rubisco? J Exp Bot 59: 1779-1787
57. Farage PK, Blowers D, Long SP, Baker NR (2006) Low growth temperatures modify the efficiency of light use by photosystem II for CO₂ assimilation in leaves of two Schilling-tolerant C₄ species, *Cyperus longus* L. and *Miscanthus x giganteus*. Plant Cell Environ 29: 720-728
58. Naidu SL, Moose SP, Shoabi KA, Raines CA, Long SP (2003) Cold tolerance of C₄ photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*: adaptation in amounts and sequence of C₄ photosynthesis enzymes. Plant Physiol 132: 1688-1697
59. Yamori W, Suzuki K, Noguchi KO, Nakai M, Terashima I (2006) Effects of Rubisco kinetics and Rubisco activation state on the temperature dependence of the photosynthetic rate in spinach leaves from contrasting growth temperatures. Plant Cell Environ 29: 1659-1670
60. Ghannoum O (2009) C₄ photosynthesis and water stress. Ann Bot 103: 635-644
61. Zhao Y, Du H, Wang Z, Huang B (2011) Identification of proteins associated with water-deficit tolerance in C₄ perennial grass species, *Cynodon dactylon* × *Cynodon transvaalensis* and *Cynodon dactylon*. Physiol Plant 141: 40-55
62. Anderson JM, Chow WS, Goodchild DJ (1988) Thylakoid membrane organisation in sun/shade acclimation. Aust J Plant Physiol 15: 11-26
63. Caffarri S, Frigerio S, Olivieri E, Righetti PG, Bassi R (2005) Differential accumulation of *Lhcb* gene products in thylakoid membranes of *Zea mays* plants grown under contrasting light and temperature conditions. Proteomics 5: 758-768
64. Romanowska E, Drozak A, Powikrowska M, Zienkiewicz M, Pokorska B (2008) Mechanisms of Photosynthetic Apparatus Acclimation of C₄ Plants to Different Irradiances. W: Allen JF, Gantt E., Goldbeck JH, Osmond B (red) Photosynthesis. Energy from the sun, Springer, str. 1045-1048
65. Allen JF, Forsberg J (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. Trends Plant Sci 6: 317-326
66. Joliot P, Béal D, Joliot A (2004) Cyclic electron flow under saturating excitation of dark-adapted *Arabidopsis* leaves. Biochim Biophys Acta 1656: 166-176

C4 type photosynthesis

Anna Drożak, Wioleta Wasilewska, Alicja Buczyńska, Elżbieta Romanowska

University of Warsaw, Department of Molecular Plant Physiology, 1 Miecznikowa St., 02-096 Warsaw, Poland

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

Key words: C₄ subtypes, evolution, metabolism, photosynthesis, stress

ABSTRACT

C₄ photosynthesis includes several anatomical and biochemical modifications that allow plants to concentrate CO₂ at the site of Rubisco. The photorespiratory pathway is repressed in C₄ plants, since the rates of photosynthesis and biomass production are increased. This is an adaptation to high light intensities, high temperatures and dryness. C₄ plants contain two distinct types of photosynthetic cells, mesophyll and bundle sheath. The processes of assimilation and reduction of CO₂ are separated spatially and catalyzed by two different enzymes. Only the bundle sheath chloroplasts perform the reactions of the Calvin-Benson cycle with the help of the Rubisco enzyme present exclusively in this cell type. The primary CO₂ fixation occurs in mesophyll cells through the action of the phosphoenolpyruvate carboxylase. The light-dependent reactions of the photosynthesis occur exclusively in the latter cell type. These differences in photochemistry lead to distinct redox profiles in both types of cells. C₄ plants are divided into three biochemical subtypes on the basis of differences in the mechanisms of decarboxylation of the C₄ acids. C₄ plants will provide the main source of food for humans and animals in the nearest decade.

Agata Bogusz

Instytut Biologii Roślin, Zakład Fizjologii Roślin Uniwersytetu Wrocławskiego

Instytut Biologii Roślin, Zakład Fizjologii Roślin, ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław; tel.: (71) 375 41 11, e-mail: agata.bogusz@biol.uni.wroc.pl

Artykuł otrzymano 22 czerwca 2011 r.
Artykuł zaakceptowano 1 października 2011 r.

Słowa kluczowe: kanały chlorkowe, azotany, tonoplast

Wykaz skrótów: CBS (ang. *cystathionine β-synthetase*) – syntetaza β-cystationinowa; CIC (ang. *chloride channel*) – kanały chlorkowe; TGN (ang. *trans-Golgi network*) – sieć trans aparatu Golgiego

Podziękowanie: Artykuł finansowany z grantu MNiSzW nr N N303 818740.

STRESZCZENIE

W komórkach roślin, podobnie jak w komórkach zwierząt, kanały/transportery anionowe odgrywają znaczącą rolę w kontrolowaniu metabolizmu, utrzymaniu gradientu elektrochemicznego protonów w poprzek błony oraz ścieżkach przekazywania sygnałów w odpowiedzi na stresy biotyczne i abiotyczne. Jedną z ważniejszych klas białek transportujących aniony jest rodzina kanałów chlorkowych CIC, którą tworzą dwie podklasy: kanały Cl⁻ oraz antyporterzy 2Cl⁻/H⁺. Białka te występują niemal we wszystkich organizmach, zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Wszyscy przedstawiciele tej rodziny są homodimerami, w których każdy monomer tworzy indywidualną drogę przenikania jonów Cl⁻ oraz zawiera kluczowe reszty aminokwasowe umożliwiające wiązanie jonów i determinujące selektywność anionową. Większość CIC posiada także długie cytosolowe fragmenty łańcucha z wolną grupą karboksylową zawierające dwie domeny syntetazy β-cystationinowej (CBS), które są kluczowe dla regulacji aktywności tych białek. Poniższa praca jest podsumowaniem dostępnej wiedzy na temat tej dużej i ważnej rodziny białek, ze szczególnym uwzględnieniem roślinnych kanałów chlorkowych CIC oraz pełnionych przez nie funkcji.

WPROWADZENIE

Wśród różnych systemów transportu zaangażowanych w podstawowe funkcje komórkowe kanały anionowe stanowią bardzo dużą klasę białek uczestniczących w wielu procesach fizjologicznych. W komórkach roślin wyższych są odpowiedzialne za zachowanie turgoru [1,2], ruchy aparatów szparkowych [3-5], transport składników pokarmowych [1,6] oraz za procesy związane z odpornością roślin na metale ciężkie [7]. Ważną grupą białek transportujących aniony jest rodzina kanałów chlorkowych CIC (ang. *chloride channel*), zidentyfikowana w niemal wszystkich typach komórek eukariotycznych oraz w wielu organizmach prokariotycznych. Pierwszy przedstawiciel rodziny CIC, CIC-0, został wyizolowany z organu elektrycznego ryby *Torpedo marmorata* [8,9]. U *Escherichia coli* CIC-ec1 promuje wyrzucanie protonów w warunkach niskiego pH środowiska [10]. W błonach aparatu Golgiego komórek *Saccharomyces cerevisiae* obecny jest pojedynczy kanał chlorkowy CIC kodowany przez gen *GEF1* [11], który odgrywa kluczową rolę w stabilizacji potencjału błonowego i balansowaniu dodatnich ładunków wynikających z pompowania protonów i transportu jonów miedzi [12].

W komórkach ssaków zidentyfikowano 9 genów CIC kodujących białka o różnym rozmieszczeniu w tkankach i komórkach. Badania nad chorobami człowieka o podłożu genetycznym wykazały udział tej rodziny w stabilizacji potencjału błonowego, kontroli pobudliwości, zakwaszaniu pęcherzyków synaptycznych oraz w regulacji egzocytozy pęcherzyków sekrecyjnych [13].

Pierwszymi zidentyfikowanymi u roślin genami kodującymi białka należące do tej rodziny były CIC-Nt1 z *Nicotiana tabaco* [14] oraz cztery geny w komórkach *Arabidopsis thaliana* [15]. Obecnie w genomie *Arabidopsis* znanych jest 7 homologów CIC [16]. Uniwersalną właściwością rodziny CIC wszystkich eukariotycznych organizmów jest przynależność do niej białek o charakterze kanałów anionowych, jak i białek o charakterze wtórnych transporterów. Niektóre CIC mogą zmieniać swoje właściwości i w zależności od warunków środowiskowych funkcjonować jako kanały, bądź jako transportery aktywne [17]. Ponadto przedstawiciele tej rodziny należący do podklasy antyporterów roślinnych charakteryzują się wysoką specyficnością anionową. Antyporterzy występujące w komórkach człowieka, a także bakteryjne białko CIC-ec1, wykazują znacznie słabszą selektywność anionową. Mogą one funkcjonować jako antyporterzy Cl⁻/H⁺, ale również transportować azotany, przy czym transport azotanów nie jest sprzężony z transportem protonów. Najprawdopodobniej wiąże się to z niewielką zawartością azotanów w komórkach zwierzęcych, przez co rozróżnienie między tymi anionami nie jest konieczne. Transport azotanów sprzężony z transportem protonów jest charakterystyczny jedynie dla roślinnych białek CIC

(AtClCa). Transportery roślinne wykazują ponadto wyższą selektywność wobec azotanów niż anionów chlorkowych. Komórki roślin muszą transportować obydwa aniony, a rozróżnienie między nimi jest kluczowe dla fizjologii komórki [18].

Dotychczas udało się poznać budowę oraz molekularne podstawy transportu anionów a także selektywności anionowej tej grupy białek u *Escherichia coli* oraz *Salmonella typhimurium* [19], a ostatnio również u krasnorostu *Cyanidioschyzon merolae* [20]. Wysoki stopień zachowania struktury w ewolucji, obserwowany w rodzinie ClC, pozwala z dużym prawdopodobieństwem określić mechanizm transportu w homologach występujących u innych organizmów, w tym także u roślin. Ponieważ w ostatnich latach stale wzrasta zainteresowanie tą rodziną białek, poniższa praca dokonuje zestawienia dotychczasowej wiedzy na ich temat, ze szczególnym uwzględnieniem roślinnych kanałów chlorkowych ClC.

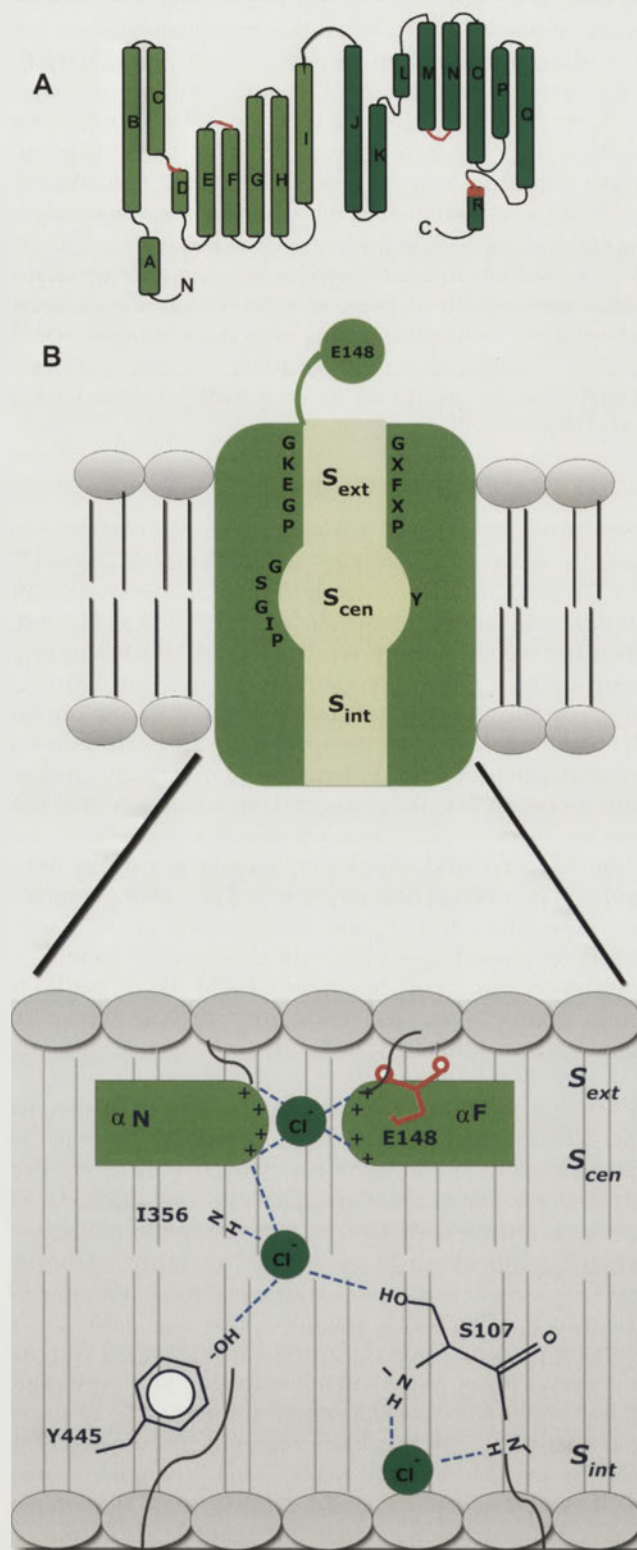
STRUKTURA REGIONU TRANSBŁONOWEGO ORAZ MOLEKULARNE PODSTAWY WIĄZANIA JONÓW Cl⁻

Poznanie struktury białka transporterowego umożliwia wgląd w mechanizmy jego funkcjonowania, dlatego też krystalizacja białek ClC-ec1 z *Escherichia coli* oraz StClC z *Salmonella typhimurium* stała się krokiem milowym w badaniach nad rodziną kanałów chlorkowych [19]. ClC-ec1 jest homodimerem zbudowanym z dwóch identycznych podjednostek, z których każda posiada 18 α -helis o różnej długości oraz krótkie, eksponowane po cytoplazmatycznej stronie błony, rejony N- i C-końcowe. Podjednostki wykazują antyrównoległą architekturę: każda zawiera dwie odpowiadające sobie strukturalnie połówki przecinające błonę w przeciwną orientację [17].

Każda podjednostka zawiera trzy miejsca wiązania anionów: wewnętrzne, centralne i zewnętrzne (Ryc. 1). Miejsce wewnętrzne i zewnętrzne kontaktują się bezpośrednio z roztworami wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym, podczas gdy miejsce centralne zlokalizowane w środku warstwy lipidowej błony jest izolowane od hydrofilowego środowiska. Miejsca to określane jako centralne miejsce wiązające S_{cen} (ang. *central binding site*) stanowią zachowane w ewolucji reszty tyrozyny w pozycji 445 (Y445; numeracja dla AtClCa) i seryny w pozycji 107 motywu GSGIP. Wewnętrzne miejsce wiązające S_{int} (ang. *internal binding site*) tworzą atomy azotu grupy amidowej reszt glicyny (G149), izoleucyny (I356) i fenyloalaniny (F357) w mniejszym stopniu zachowanego w ewolucji fragmentu łańcucha głównego. Zewnętrzne miejsce wiązające (S_{ext} , ang. *external binding site*) obejmuje natomiast reszty aminokwasowe biorące udział w transporcie anionu Cl⁻ przez białko ClC. Szczególną funkcję w tym miejscu pełni reszta glutaminianu w pozycji 148 (E148; Glu₁₄₈). Te trzy miejsca wiązające tworzą wspólnie drogę, wzdłuż której jony Cl⁻ przemieszczają się zgodnie ze swoim gradientem elektrochemicznym [21].

Jon Cl⁻ w miejscu S_{cen} jest częściowo lub całkowicie odwodniony i związany koordynacyjnie z atomami tlenu grupy hydroksylowej reszt seryny w pozycji 107 (S107) i tyrozyny w pozycji 445 (Y445), znanych również jako Ser_{cen}

i Tyr_{cen}, przez atomy azotu grup amidowych reszt glicyny w pozycji 149 (G149), izoleucyny w pozycji 356 (I356), fenyloalaniny w pozycji 357 (F357) oraz reszty glutaminianu w



Rycina 1. Budowa i mechanizm transportu Cl⁻ przez kanałowe białko ClC. A) Struktura podjednostki białka ClC ukazująca antyrównoległą architekturę. Na czerwono zaznaczono regiony tworzące filtr selektywności. Na podstawie [19]; zmienione. B) Schemat przedstawia wszystkie najważniejsze motywy oraz reszty aminokwasowe biorące udział w transporcie anionu Cl⁻ przez białko ClC. Szczegółowy opis w tekście. Na podstawie [22]; zmienione.

pozycji 148 (E148, Glu_{ex}) [19,22]. Znajdująca się w miejscu S_{ex} białek CIC ujemnie naładowana reszta Glu_{ex} prawdopodobnie konkuruje z jonem Cl⁻ o miejsce wiązania. Dlatego anion Cl⁻ może być przekazany w miejsce S_{ex} jedynie wtedy, gdy Glu_{ex} jest konstytucyjnie uprotonowana albo usunięta poprzez mutację [22,23]. Wszystkie trzy miejsca wiążą jony raczej słabo, z milimolarnym powinowactwem [23,24]. Badania wykazały, że wiązanie Cl⁻ jest najsilniejsze w miejscu S_{cen}, K_d ~0,7-3 mM, pośrednie w S_{ex} (K_d ~0,9-3,9 mM) i najslabsze w S_{in} (z powinowactwem >20 mM). Ostatnio poznano także strukturę krystaliczną eukariotycznego białka CIC, CmCIC z *Cyanidioschyzon merolae*. Budowa rejonu transportującego jest niezwykle podobna do odkrytego u CIC-ec1. Udało się jednak zaobserwować nowy stan konformacyjny białka, nieznan do tej pory, w którym bramkująca reszta glutaminianu zajmuje centralną pozycję w miejscu wiążącym S_{cen}. Ponadto reszta glutaminianu wiążąca jony H⁺ u CIC-ec1 została zastąpiona w przypadku białka CmCIC resztą treoniny [20].

DROGA TRANSPORTU JONÓW Cl⁻

Struktura krystaliczna CIC-ec1 wykazała obecność lukiowatego kanału, którym jony Cl⁻ przekraczają błonę [22] (Ryc. 1). Dwa odmienne strukturalnie elementy regulują przestrzennie dostęp jonów do wnętrza białka. Pierwszy z nich to łańcuch boczny reszty Glu_{ex} (E148) bramkujący dostęp jonów z zewnątrzkomórkowego roztworu. Mutacje Glu_{ex} prowadzą do powstania stale otwartych kanałów CIC [22] i transporterów, które nie sprzęgają transportu anionów z transportem protonów. Potwierdza to rolę reszty glutaminianu w pozycji 148 jako zewnątrzkomórkowej bramki [22].

Natura wewnątrzkomórkowej bramki jest mniej jasna. Najprawdopodobniej tworzą ją reszty Tyr_{cen} i Ser_{cen} bowiem mutacje, w których Tyr_{cen} jest podstawiana przez alaninę lub serynę, powodują otwarcie drogi od strony wewnątrzkomórkowej i indukują transport Cl⁻ [25]. W wypadku tej mutacji obserwowane jest także rozprężenie transportu anionów z transportem H⁺ [25].

Poznanie struktury krystalicznej kolejnego białka należącego do rodziny CIC, CmCIC, pozwoliło stworzyć hipotetyczny cykl zmian konformacyjnych obrazujący drogę transportu jonów chlorkowych. Najpierw dochodzi do protonacji grupy karboksylowej reszty glutaminianu w miejscu S_{ex}. Umożliwia to zmianę pozycji grupy karboksylowej Glu_{ex}, otwarcie kanału i wiązanie dwóch anionów Cl⁻ w miejscu S_{ex}. Związanie anionów powoduje jednoczesną dysocjację protonu i powrót grupy karboksylowej Glu_{ex} do pozycji wyjściowej. Skutkiem takiej zmiany konformacyjnej jest uwolnienie anionów chlorkowych z miejsca S_{ex} i związanie w miejscu S_{cen}. W rezultacie następuje przemieszczenie dwóch jonów chlorkowych przez błonę i uwolnienie anionów do wnętrza komórki. Jednocześnie reszta glutaminianu zlokalizowana w S_{ex} ponownie znajduje się w pozycji umożliwiającej przyjęcie H⁺. Każda przemiana w tym cyklu jest odwracalna [20].

DROGA TRANSPORTU JONÓW H⁺

W przeciwieństwie do transportu Cl⁻, droga transportu H⁺ przez CIC jest słabiej poznana. Badania wykazały, że dwie reszty glutaminianu, w pozycji 148 i 203 (Glu_{ex} i Glu_{in}; numeracja dla *E.coli*) z CIC-ec1 mogą być zewnątrz- i wewnątrzkomórkowymi akceptorami H⁺ [26]. Ich rola została potwierdzona także w innych transporterach CIC [27]. Reszta glutaminianu w pozycji 203 zlokalizowana po cytoplazmatycznej stronie błony najprawdopodobniej wiąże protony i przekazuje na bramkującą resztę glutaminianu w pozycji 148 (E148), co skutkuje powiązaniem transportu anionowego z protonowym [28-30]. Gdy Glu_{ex} i Glu_{in} poprzez mutacje punktowe zostaną zastąpione resztami aminokwasowymi nieulegającymi protonacji, antyporterzy CIC tracą zdolność transportu H⁺, podczas gdy transport Cl⁻ jest zachowany. Zamiana innych reszt glutaminianowych lub asparaginianowych w białku ma niewielki wpływ na właściwości kinetyczne i sprzężenie pomiędzy transportem jonów chlorkowych i protonów, przynajmniej w przypadku CIC-ec1. Powyższe fakty sugerują, że tylko reszty Glu_{ex} i Glu_{in} w obrębie proteiny CIC są bezpośrednio zaangażowane w transport H⁺.

Miejsca wejścia i wyjścia H⁺ w transporterach CIC rozdziela łańcuch o długości ~14Å zbudowany głównie z reszt aminokwasów hydrofobowych. Nie jest jednak jasne, w jaki sposób protony przekraczają tę warstwę. Obecnie sugeruje się, że wewnątrz hydrofobowego rdzenia CIC-ec1, dzięki wiązaniom wodorowym, formowany jest łańcuch cząsteczek wody, który przejściowo łączy Glu_{in} oraz Glu_{ex}, pozwalając na przepływ H⁺ [31]. Najnowsze badania nad CIC-ec1 pozwoliły na stworzenie hipotetycznego modelu tłumaczącego, w jaki sposób transport dwóch jonów Cl⁻ może być sprzężony z transportem H⁺. Odkryto, że jon Cl⁻ związany w miejscu S_{cen} za pośrednictwem czterech cząsteczek wody, łączy się z E148, hipotetyczną stroną wyjścia protonu. Zakładając przejściowe tworzenie chlorowodoru w S_{cen} CIC-ec1, łańcuch cząsteczek wody mógłby tworzyć transbłonową drogę transportu protonu zaczynając od E203 na E148 kończąc [32].

STRUKTURA I FUNKCJA DOMEN CYTOPLAZMATYCZNYCH

Wszystkie eukariotyczne białka CIC oraz ~50% białek prokariotycznych posiada duże cytoplazmatyczne domeny z wolną grupą karboksylową i aminową, które odgrywają kluczową rolę w regulacji aktywności tych białek. Mutacje w domenach cytoplazmatycznych CIC komórek człowieka prowadzą do poważnych chorób genetycznych, takich jak choroba Thomsonsena czy zespół Barrtera. Domena C-końcowa odgrywa kluczową rolę w regulowaniu aktywności kanałów i antyporterów CIC, a przynajmniej w jednym przypadku otwarcie kanału jest związane ze zmianami konformacyjnymi w tej domenie [33].

Chociaż poziom zachowania w ewolucji sekwencji rejonu cytoplazmatycznego nie jest wysoki, wszystkie białka CIC zawierają w jej obrębie dwie domeny syntetazy β-cystationinowej (CBS). Domeny zbudowane z ~50 reszt aminokwasowych rozdzielone są fragmentami łańcucha

o różnej długości i różnym stopniu hydrofobowości [34]. Struktura krystaliczna cytoplazmatycznej domeny kanału CIC-Ka wykazała, że domeny CBS składają się z dwóch uporządkowanych wzdłuż dwukrotnej osi symetrii subdomen (CBS1 i CBS2). Dwie subdomeny CBS2 tworzą dużą powierzchnię oddziaływania ($>2000\text{Å}^2$), natomiast wąski kanał wyścielony jest cząsteczkami wody [35]. Domeny CBS są podobnie skonstruowane w przypadku kanału CIC-0 i transportera CIC-5, co sugeruje zachowany w ewolucji charakter cytoplazmatycznych domen białek CIC.

WIĄZANIE NUKLEOTYDÓW

Ostatnie badania wykazały, że nukleotydy adenozyne, takie jak ATP, mogą wiązać się z cytoplazmatycznymi domenami niektórych białek CIC, modulując transport jonów. Wewnątrzkomórkowe ATP w różny sposób wpływa na aktywność białek CIC: hamuje aktywność kanału CIC-1 oraz transportera AtClCa, natomiast aktywuje transporter CIC-5. Najlepiej mechanizm modulacji transportera CIC przez ATP wyjaśniają badania przeprowadzone na białku AtClCa. Wysokie stężenie wewnątrzkomórkowego ATP redukuje dwukrotnie aktywność transportową AtClCa. W przeciwieństwie do CIC-1 i CIC-5, AtClCa rozróżnia nukleotydy adenozyne: wiązanie ATP hamuje transport, ADP wydaje się nie mieć wpływu, natomiast AMP współzawodniczy z ATP o miejsce wiązania i zmniejsza jego hamujący efekt, ale sam nie wpływa na aktywność transportera [36].

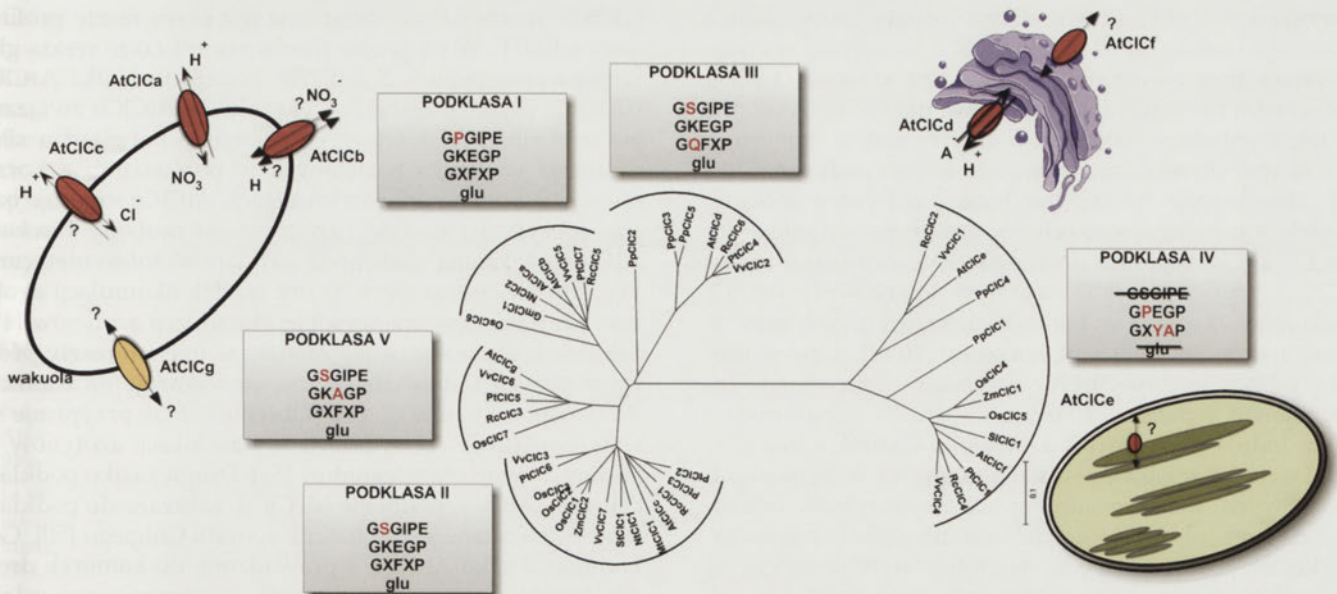
MOLEKULARNE PODSTAWY SELEKTYWNOŚCI ANIONOWEJ

Większość kanałów i antyporterów z rodziny CIC wykazuje podobną sekwencję selektywności wobec anionów: $\text{SCN}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^-$ [26,29]. Selektywność białek CIC wydaje się być wyznaczona przez pojedyncze miejsce S_{cen} podczas gdy miejsce S_{ex} jest nieselektywne, a S_{in} wykazuje

niewielką preferencję wobec SCN^- [23]. Badania wykazały, że selektywność CIC zależy głównie od reszty Ser_{cen} . U mutantu CIC-0 S123T (mutacja w obrębie nukleotydów kodujących resztę seryny w miejscu S_{cen}) obserwowano wzrost przepuszczalności dla I^- oraz Br^- [37]. Potwierdzeniem krytycznej roli Ser_{cen} w determinowaniu selektywności stało się odkrycie, że w antyporterze NO_3^-/H^+ z *Arabidopsis thaliana* (AtClCa) reszta seryny jest podstawiona przez resztę proliny [1]. Kilka zespołów badawczych zauważyło, że transportery CIC-5, CIC-ec1 oraz kanał CIC-0, w których Ser_{cen} została zamieniona na resztę proliny, wykazywały preferencję wobec anionów azotanowych. [24,38,39]. Natomiast mutantu AtClCa z resztą seryny podstawioną w miejscu reszty proliny charakteryzowała aktywność antyportera Cl^-/H^+ [39]. Najnowsze badania nad AtClCa potwierdziły zaangażowanie reszty proliny w pozycji 160 w transport azotanów. Wykazano ponadto, że zmiany w transporcie azotanów u mutantu P160S AtClCa wynikają jedynie ze zmian selektywności anionowej białka [18]. Powyższe wyniki dowodzą, że selektywność anionowa w rodzinie białek CIC jest regulowana przez pojedynczą zamianę reszty aminokwasowej w miejscu S_{cen} : reszta proliny odpowiada za specyficzność wobec azotanów, podczas gdy reszta seryny determinuje selektywność chlorkową. Mechanizm selektywności bazujący na bezpośrednich oddziaływaniach pomiędzy substratem a pojedynczym łańcuchem bocznym CIC jest zupełnie odmienny i bardziej elastyczny niż w przypadku innych systemów transportu. Kanały K^+ , Na^+ i Ca^{2+} posiadają podobną strukturę poru, ale selekcja jonów zachodzi na drodze różnych mechanizmów [21].

FIZJOLOGICZNE FUNKCJE ROŚLINNYCH CIC

Obecnie w genomie rzodkiewnika znanych jest 7 genów kodujących CIC, które można podzielić na dwie klasy. Do pierwszej z nich należą białka AtClCa-d i g, tworzące odrębną gałąź drzewa filogenetycznego wszystkich poznanych



Rycina 2. Drzewo filogenetyczne wszystkich znanych roślinnych przedstawicieli rodziny kanałów chlorkowych CIC utworzone w oparciu o podobieństwo sekwencji aminokwasowych (pochodzących ze strony GenBank database, www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/). Drzewo wygenerowano za pomocą programu MEGA5.0. Na rycinie wskazano także prawdopodobne lokalizacje subkomórkowe oraz funkcje przedstawicieli rodziny występujących w komórkach *Arabidopsis thaliana*.

dotychczas CIC. Do drugiej klasy należą tylko dwa białka AtClCe i f zlokalizowane, odpowiednio, w chloroplastach i mitochondriach. Wykazują one homologię z białkami CIC występującymi w komórkach organizmów zaliczanych do innych królestw, szczególnie z białkami cyjanobakterii. Analiza pokrewieństwa roślinnych białek CIC pokazuje, że tworzą one 5 odrębnych podklas (Ryc. 2).

Pierwszą podklasę tworzą białka zawierające motyw GKEGP, GXFXP, resztę proliny w motywie GPGIPE oraz resztę glutaminianu w pozycji 270 (Ryc. 2). Należą tutaj między innymi białka AtClCa oraz AtClCb. Najlepiej scharakteryzowanym przedstawicielem tej podklasy jest AtClCa. Eksperymenty z użyciem fuzji tego białka z białkiem zielonej fluorescencji GFP wykazały jego tonoplastową lokalizację, potwierdzoną także w doświadczeniach z użyciem specyficznych przeciwciał anti-AtClCa [1,16]. Badania techniką patch-clamp dowiodły, że AtClCa funkcjonuje jako antyporter $2\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ i jest odpowiedzialny za magazynowanie azotanów w wakuoli [1] (Ryc. 2). Ekspresja genu *AtClCa* zachodzi zarówno w korzeniu, jak i pędzie i jest stymulowana azotanami. Badania wykazały, że mutant *clca* jest zdolny do akumulacji jedynie połowy ilości azotanów gromadzonej w roślinach typu dzikiego [40,41]. Badania te sugerują, że w komórkach *Arabidopsis* obecne są także inne geny odpowiedzialne za załadunek azotanów do wakuoli.

Również w tonoplaście zlokalizowane jest białko AtClCb. Ekspresja genu *AtClCb* także jest stymulowana azotanami, ale w przeciwieństwie do *AtClCa* jest silniejsza w korzeniu, natomiast znikoma w liściach i tkankach kwiatostanu [16]. Ostatnie badania potwierdziły jego aktywność antyporterową [42] (Ryc. 2). Nadal nie jest jednak jasne, czy AtClCb bierze udział w załadunku czy rozładunku azotanów z wakuoli.

Druga podklasa, do której należy m.in. białko AtClCc, charakteryzuje się obecnością motywów GSGIPE i GKEGP oraz obecnością E270. Stąd też są one prawdopodobnie wymiennikami H^+/Cl^- . Potwierdzona została tonoplastowa lokalizacja białka [16] (Ryc. 2). AtClCc przywraca normalny wzrost drożdżowemu mutantowi *gef1*. U mutantu *clcc-1* zaobserwowano zmienioną zawartość nie tylko azotanów, ale także chlorków, jabłczanów i cytrynianów, sugerując szerszą specyficzność anionową niż w przypadku AtClCa [43]. Transkrypcja AtClCc jest hamowana przez azotany, ale efekt ten może zostać odwrócony przez dodanie anionów Cl^- [43]. Istnieją silne dowody na zaangażowanie białka AtClCc w regulację ruchów aparatów szparkowych. AtClCc ulega silnej ekspresji w komórkach szparkowych oraz w pyłku, natomiast słabiej w korzeniu [16,44]. Cztery mutanty T-DNA w genie *AtClCc* wykazały zaburzenia w indukowanym światłem otwieraniu aparatów szparkowych oraz w indukowanym ABA zamykaniu szparek. Zmiany te korelowały ze zmianami stężenia jonów Cl^- w komórkach szparkowych. Ponadto mutanty *clcc* wykazywały wrażliwość na stres solny, co objawiało się zahamowaniem wzrostu. Redukcja wzrostu pędu mutantów w odpowiedzi na zasolenie miała charakter szybkiej odpowiedzi związanej ze wzrostem zewnętrznego ciśnienia osmotycznego oraz wolniejszej odpowiedzi późnej, związanej z akumulacją tok-

sycznych jonów [45]. Wydaje się, że AtClCc bierze udział w drugiej fazie odpowiedzi na zasolenie [44].

Kolejną podklasę białek CIC (podklasa III) stanowią białka zawierające motywy GSGIPE, GKEGP, reszta glutaminianu w pozycji 270 oraz reszta glutaminy w motywie GQFXP. Należy tutaj, zlokalizowany w sieci *trans* aparatu Golgiego (TGN), AtClCd (Ryc. 2). Podobnie jak AtClCc, AtClCd może komplementować mutant drożdżowego *gef1*. Synteza AtClCd jest słaba we wszystkich organach, nieco silniejsza w hydrotodach oraz kwiatach (szczególnie pylnikach i pyłku). Jest rozwojowo regulowana i relatywnie silniejsza w korzeniach młodych siewek. Mutanty *clcd* nie wykazują zmian w akumulacji jonów NO_3^- czy Cl^- w porównaniu z roślinami typu dzikiego, co sugeruje, że ClCd nie uczestniczy w transporcie jonów i utrzymaniu homeostazy anionowej [46]. Liczne badania wskazują na udział endosomalnych kanałów ClCd w zakwaszaniu przedziałów wewnątrzkomórkowych [47]. Z badań nad izolowanymi zwierzęcymi endosomami wiadomo, że zakwaszanie jest bardziej efektywne w obecności zewnątrzpęcherzykowych chlorków [48]. Badania *in situ* nad pęcherzykami sieci *trans* aparatu Golgiego wskazują na zależność stopnia zakwaszenia od poziomu chlorków w cytosolu [49]. Ponadto AtClCd wraz z AtClCa są zaangażowane w mechanizmy odporności na metale ciężkie, w szczególności kadm. Badania wykazały, że funkcjonalnie działające AtClCa oraz AtClCd zwiększają akumulację metali ciężkich w wakuoli i/lub w kwaśnych pęcherzykach, i w ten sposób biorą udział w detoksykacji cytoplazmy. Odporność roślin na toksyczne działanie jonów Cd^{2+} jest dużo niższa w przypadku podwójnych mutantów *atclcad*. Ponadto zaobserwowano, że obecność w pożywce jonów wapnia przywraca normalny wzrost i rozwój korzeni u roślin traktowanych kadmem jedynie w przypadku roślin z prawidłowo działającymi białkami AtClCa oraz AtClCd [7].

Czwartą podklasę tworzą białka, które nie posiadają w swojej strukturze motywu GS/PGIPE, a w motywie GKEGP reszta lizyny zastąpiona jest przez resztę proliny, stąd: GPEGP. W tej grupie nieobecna jest także reszta glutaminianu w pozycji 270 (E270). Należą tu białka AtClCe i AtClCf (Ryc. 2). Badania wykazały, że AtClCe związany jest z błonami tylakoidów, co pośrednio potwierdza silna ekspresja w tkankach zielonych w porównaniu z korzeniem [50]. Subkomórkowa lokalizacja AtClCe sugeruje bardzo specyficzną funkcję i rzeczywiście mutanty *knock-out* AtClCe wykazują zmienioną aktywność fotosyntetyczną. Ponadto obserwuje się wyraźny spadek akumulacji azotanów przy jednocześnie wysokiej akumulacji azotynów [41]. Sekwencja aminokwasowa zawiera w miejscu reszty proliny w pozycji 160, resztę seryny, co wskazuje na zdolność do transportu jonów Cl^- [41]. Obecnie jednak przypisuje się białkom AtClCe raczej udział w translokacji azotynów ze stromy do wnętrza tylakoidów [51]. Drugie białko podklasy czwartej, AtClCf, podobnie jak ClCd, zaliczane do podklasy trzeciej, związane jest z błonami aparatu Golgiego [50]. Gen kodujący białko AtClCf, wprowadzony do komórek drożdży komplementuje mutant *gef1*, co sugeruje jego udział w zakwaszaniu pęcherzyków *cis* aparatu Golgiego [50,16].

AtClCg jest członkiem kolejnej podklasy (V), która została wytypowana na podstawie obecności motywów GSGIPE i GKAGP oraz E270 (Ryc. 2). Podklasa ta prawdopodobnie grupuje białka funkcjonujące jako prawdziwe kanały anionowe. Podobnie jak AtClCa-c białko AtClCg zlokalizowane jest w tonoplaście komórek roślinnych [16]. Na razie jego funkcja nie jest znana.

PODSUMOWANIE

Od momentu sklonowania pierwszego przedstawiciela kanałów chlorkowych ClC zainteresowanie tą rodziną białek stale wzrasta. Przyczyn popularności tej grupy kanałów anionowych jest wiele. Przede wszystkim członków tej rodziny odnaleźć można w komórkach wszystkich eukariotów oraz wielu prokariotów, zarówno w błonach zewnętrznych, jak i w wewnętrznych. Ponadto pełnią wiele kluczowych dla organizmu funkcji, o czym świadczy stale powiększająca się lista chorób genetycznych spowodowanych mutacjami w genach kodujących kanały ClC komórek człowieka. Ostatnia dekada przyniosła ze sobą cztery ważne odkrycia dotyczące rodziny białek ClC. Po pierwsze poznanie struktury krystalicznej ClC-ec1 ujawniło złożoną budowę regionu transbłonowego tego białka. Krystalizacja pierwszego eukariotycznego przedstawiciela, CmClC, potwierdziła wysoką homologię w obrębie tej grupy. Obecnie znane są cztery struktury krystaliczne białek ClC, które umożliwiły stworzenie hipotetycznego modelu wyjaśniającego transport anionów sprzężony z transportem protonów. Po drugie wykazano, że w obrębie tej rodziny występują nie tylko białka o charakterze kanałowym, ale także o charakterze antyporterów anionowo-protonowych. Co więcej, niektóre z tych białek mogą pełnić obie funkcje. Po trzecie, niedawno opisano modulujący wpływ nukleotydów adeninowych na funkcjonowanie ClC. Po czwarte, wykazano, że selektywność anionowa determinowana jest przez pojedynczą resztę aminokwasową.

Odkrycia te wyznaczyły nowe kierunki badań. Obecnie konieczne wydaje się zbadanie struktury prawdziwych kanałów chlorkowych, a przez to poznanie różnic pomiędzy kanałami i transporterami rodziny ClC. Ostatecznie pełnego wyjaśnienia wymagają także zmiany konformacyjne białka podczas transportu anionu oraz znalezienie odpowiedzi na pytania dotyczące komunikacji i oddziaływania ze sobą domen cytoplazmatycznych i transbłonowych. Nadal niekompletna jest również nasza wiedza na temat funkcji niektórych z nich w komórkach roślinnych.

PIŚMIENNICTWO

1. De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H (2006) The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* 442: 939-942
2. Li WY, Wong FL, Tsai SN, Phang TH, Shao G, Lam HM (2006) Tonoplast-located GmCLC1 and GmNHX1 from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells. *Plant Cell Environ* 29: 1122-1137
3. Schroeder JI, Keller BU (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5025-5029
4. Blatt MR (2000) Ca²⁺ signalling and control of guard-cell volume in stomatal movements. *Curr Opin Plant Biol* 3: 196-204
5. Garcia-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L, Blatt MR (2003) Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid evoked signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11116-11121
6. Geelen D, Lurin C, Bouchez D, Frachisse JM, Lelievre F, Courtial B, Barbier-Brygoo H, Maurel C (2000) Disruption of putative anion channel gene AtCLC-a in *Arabidopsis* suggests a role in the regulation of nitrate content. *Plant J* 21: 259-267
7. Moradi H (2009) Characterization of ClC transporter proteins : functional analysis of clc mutants in *Arabidopsis thaliana* (rozprawa doktorska). Pozytskano z: <http://dissertations.ub.rug.nl/faculties/science/2009/h.moradi/>
8. Gurnett CA, Kahl SD, Anderson RD, Campbell KP (1995) Absence of the skeletal muscle sarcolemma chloride channel ClC-1 in myotonic mice. *J Biol Chem* 270: 9035-9038
9. Klocke R, Steinmeyer K, Jentsch TJ, Jockusch H (1994) Role of innervation, excitability, and myogenic factors in the expression of the muscular chloride channel ClC-1. A study on normal and myotonic muscle. *J Biol Chem* 269: 27635-27639
10. Iyer R, Iverson TM, Accardi A, Miller C (2002) A biological role for prokaryotic ClC chloride channels. *Nature* 17: 715-718
11. Schwappach B, Stobrawa S, Hecheberger M, Steinmeyer K, Jentsch TJ (1998) Golgi localization and functionally important domains in the NH2 and COOH terminus of the yeast ClC putative chloride channel Gef1p. *J Biol Chem* 273: 15110-15118
12. Gaxiola RA, Yuan DS, Klausner RD, Fink GR (1998) The yeast ClC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4046-4050
13. Jentsch TJ, Maritz T, Zdebik AA (2005) Chloride channel diseases resulting from impaired transepithelial transport or vesicular function. *J Clin Invest* 115: 2039-2046
14. Lurin C, Geelen D, Barbier-Brygoo H, Guern J, Maurel C (1996) Cloning and Functional Expression of a Plant Voltage-Dependent Chloride Channel. *Plant Cell* 8: 701-711
15. Hechenberger M, Schwappach B, Fischer WN, Frommer WB, Jentsch TJ, Steinmeyer K (1996) A Family of Putative Chloride Channels from *Arabidopsis* and Functional Complementation of a Yeast Strain with a ClC Gene Disruption. *J Biol Chem* 271: 33632-33638
16. Lv Q, Tang R, Liu H, Gao X, Li Y, Zheng H, Zhang H (2009) Cloning and molecular analyses of the *Arabidopsis thaliana* chloride channel gene family. *Plant Science* 176: 650-661
17. Miller Ch (2006) ClC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature* 440: 484-489
18. Wege S, Jossier M, Filleur S, Thomine S, Barbier-Brygoo H, Gambale F, De Angeli A (2010) The proline 160 in the selectivity filter of the *Arabidopsis* NO₃⁻/H⁺ exchanger AtCLCa is essential for nitrate accumulation in planta. *Plant J* 63: 861-869
19. Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2002) X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415: 287-294
20. Feng L, Campbell EB, Hsiung Y, MacKinnon R (2010) Structure of a Eukaryotic ClC transporter defines an intermediate state in the transport cycle. *Science* 330: 635-641
21. Accardi A, Picollo A (2010) ClC channels and transporters: Proteins with borderline personalities. *Biochim Biophys Acta* 1798: 1457-1464
22. Dutzler R, Campbell EB, MacKinnon R (2003) Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science* 300: 107-112
23. Lobet S, Dutzler R (2006) Ion-binding properties of the ClC chloride selectivity filter. *EMBO J* 25: 24-33
24. Picollo A, Malvezzi M, Houtman J, Accardi A (2009) Basis of substrate binding and conservation of selectivity in the ClC family of channels and transporters. *Nature Struct Mol Biol* 16: 1294-1301
25. Accardi A, Lobet S, Williams C, Miller Ch, Dutzler R (2006) Synergism Between Halide Binding and Proton Transport in a ClC-type Exchanger. *J Mol Biol* 362: 691-699

26. Accardi A, Miller Ch (2004) Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl-channels. *Nature* 427: 803-807
27. Picollo A, Pusch M (2005) Chloride/proton antiporter activity of mammalian ClC proteins ClC-4 and ClC-5. *Nature* 436: 420-423
28. Accardi A, Walden M, Nguiragool W, Jayaram H, Williams C, Miller Ch (2005) Separate ion pathways in a Cl⁻/H⁺ exchanger. *J Gen Physiol* 126: 563-570
29. Nguiragool W, Miller Ch (2006) Uncoupling of a ClC Cl⁻/H⁺ exchange transporter by polyatomic anions. *J Mol Biol* 362: 682-690
30. Zdebek AA, Zifarelli G, Bergsdorf EY, Soliani P, Scheel O, Jentsch TJ, Pusch M (2008) Determinants of anion-proton coupling in mammalian endosomal ClC proteins. *J Biol Chem* 283: 4219-4227
31. Wang D, Voth G (2009) Proton transport pathway in the ClC Cl⁻/H⁺ antiporter. *Biophys J* 97: 121-131
32. Kieseritzky G, Knapp EW (2011) Charge Transport in the ClC-type Chloride-Proton Anti-porter from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 286: 2976-2986
33. Bykova EA, Zhang XD, Chen TY, Zheng J (2006) Large movement in the C terminus of ClC-0 chloride channel during slow gating. *Nature Struct Mol Biol* 13: 1115-1119
34. Estève R, Pusch M, Ferrer-Costa C, Orozco M, Jentsch TJ (2004) Functional and structural conservation of CBS domains from ClC channels. *J Physiol* 557: 363-378
35. Markovic S, Dutzler R (2007) The structure of the cytoplasmic domain of the chloride channel ClC-Ka reveals a conserved interaction interface. *Structure* 15: 715-725
36. De Angeli A, Moran O, Wege S, Filleur S, Ephritikhine G, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H (2009) ATP binding to the C terminus of the *Arabidopsis thaliana* nitrate/proton antiporter, AtCLCa, regulates nitrate transport into plant vacuoles. *J Biol Chem* 284: 26526-26532
37. Ludewig U, Pusch M, Jentsch TJ (1997) Independent gating of single pores in ClC-0 chloride channels. *Biophys J* 73: 789-797
38. Zifarelli G, Pusch M (2009) Conversion of the 2 Cl⁻/1 H⁺ antiporter ClC-5 in a NO₃⁻/H⁺ antiporter by a single point mutation. *EMBO J* 28: 175-182
39. Bergsdorf EY, Zdebek AA, Jentsch TJ (2009) Residues Important for Nitrate/Proton Coupling in Plant and Mammalian ClC Transporters. *J Biol Chem* 284: 11184-11193
40. Geelen D, Lurin C, Bouchez D, Frachisse JM, Lelievre F, Courtial B, Barbier-Brygoo H, Maurel Ch (2000) Disruption of putative anion channel gene *AtClC-a* in *Arabidopsis* suggests a role in the regulation of nitrate content. *Plant J* 21: 259-267
41. Monachello D, Allot M, Oliva S, Krapp A, Daniel-Vedele F, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G (2009) Two anion transporters AtCLCa and AtCLCe fulfill interconnecting but not redundant roles in nitrate assimilation pathways. *New Phytologist* 183: 88-94
42. von der Fecht-Bartenbach J, Bogner M, Dynowski M, Ludewig U (2010) ClC-b-Mediated NO₃⁻/H⁺ exchange across the tonoplast of *Arabidopsis* vacuoles. *Plant Cell Physiol* 51: 960-968
43. Harada H, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K, Leigh RA (2007) Quantitative trait loci analysis of nitrate storage in *Arabidopsis* leading to an investigation of the contribution of the anion channel gene, AtCLC-c, to variation in nitrate levels. *J Exp Bot* 55: 2005-2014
44. Jossier M, Kroniewicz L, Dalmas F, Le Thiec D, Ephritikhine G, Thomine S, Barbier-Brygoo H, Vavasseur A, Filleur S, Leonhardt N (2010) The *Arabidopsis* vacuolar anion transporter, AtCLCc, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance. *Plant J* 64: 563-576
45. Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59: 651-681
46. von der Fecht-Bartenbach J, Bogner M, Krebs M, Stierhof YD, Schumacher K, Ludewig U (2007) Function of the anion transporter AtCLC-d in the trans-Golgi network. *Plant J* 50: 466-474
47. Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebek AA (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 82: 503-568
48. Fuchs R, Male P, Mellman I (1989) Acidification and ion permeabilities of highly purified rat liver endosomes. *J Biol Chem* 264: 2212-2220
49. Demaurex N, Furuya W, D'Souza S, Bonifacino JS, Grinstein S (1998) Mechanism of acidification of the trans-Golgi network (TGN). In situ measurements of pH using retrieval of TGN38 and furin from the cell surface. *J Biol Chem* 273: 2044-2051
50. Marmagne A, Vinauger-Douard M, Monachello D, de Longevialle AF, Charon C, Allot M, Rappaport F, Wollman FA, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G (2007) Two members of the *Arabidopsis* ClC (chloride channel) family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and Golgi membranes, respectively. *J Exp Bot* 58: 3385-3393
51. Sugiura M, Georgescu MN, Takahashi M (2007) A nitrite transporter associated with nitrite uptake by higher plant chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 48: 1022-1035

The ClC chloride channels and their role in plant cell

Agata Bogusz 

Institute of Plant Biology, Department of Plant Physiology, University of Wrocław, 6/8 Kanonia St., 50-328 Wrocław, Poland

✉mail: agata.bogusz@biol.uni.wroc.pl

Key words: chloride channel, nitrate, tonoplast

ABSTRACT

The chloride channel superfamily (ClC) is the large group of anion transporters expressed in nearly every cell of eukaryotic as well as prokaryotic organisms. Functionally, ClC proteins can be divided into two classes: anion channels and secondary-active anion/proton transporters. Proteins from both classes are two-pore homodimers with monomers forming an individual anion-permeation pathway and key residues for ion binding and selectivity. Most ClC's have also large C-termini cytosolic domains containing two cystathionine β-synthetase domains (CBS) that are crucial for regulation of their activity. In plant cell, ClC proteins are present in membranes of various organelles including vacuole, Golgi and chloroplast. Although most of them is involve in Cl⁻ transport, recent studies on *Arabidopsis thaliana* have revealed that at least tonoplast AtCLCa can act as a NO₃⁻/H⁺ exchanger, suggesting the role of proteins from ClC family also in nitrate transport. Here we summarize recent advances in the molecular characterization of this family and its role in plants, especially in NO₃⁻ distribution within the cell.

Udział białek NRT1 w transporcie azotanów u roślin

STRESZCZENIE

Wnatlenionych glebach azotany są głównym źródłem azotu dla roślin. W warunkach zmiennej zawieszenia jonów azotanowych w glebie wzrost i rozwój roślin, w tym wielu gatunków powszechnie uprawianych, zależy od efektywności pobierania, akumulacji oraz rozmieszczenia azotanów w obrębie różnych komórek i tkanek. Procesy te angażują m.in. specyficzne białka błonowe wykazujące zróżnicowane powinowactwo do azotanów. U roślin wyższych (m.in. u *Arabidopsis thaliana*) zidentyfikowano do tej pory trzy typy transporterów jonów NO_3^- , które warunkują utrzymanie stałego stężenia azotanów w cytoplazmie. Są to białka należące do rodzin NRT1, NRT2 i CIC. Intensywne badania prowadzone w ostatnich dziesięciu latach pozwoliły określić rolę niektórych białek z tych rodzin w pobieraniu azotanów z roztworów glebowych, w transporcie jonów do komórki i do różnych organeli komórkowych, a także w wydzielaniu azotanów do ściany komórkowej oraz dalekiego transportu jonów między różnymi tkankami i organami roślinnymi. W niniejszym artykule przeglądowym zaprezentowano najnowsze informacje o białkach NRT1, a w szczególności dotyczące ich fizjologicznego znaczenia w prawidłowym wzroście i rozwoju roślin.

WPROWADZENIE

Azot należy do grupy makroelementów niezbędnych dla prawidłowego wzrostu i rozwoju wszystkich roślin. Wchodzi w skład biomolekuł o kluczowym znaczeniu dla metabolizmu komórkowego, takich jak aminokwasy będące składnikami peptydów i białek czy zasad pirymidynowych i purynowych budujących nukleotydy kwasów nukleinowych. Azot jako składnik tych i wielu innych związków uczestniczy w większości reakcji biochemicznych zachodzących w organizmach żywych, dlatego nawet krótkotrwały niedobór tego pierwiastka może znacznie ograniczać wzrost i plonowanie roślin. Azot może być dostępny dla roślin w postaci różnych związków w zależności od typu podłoża, pH, natlenienia gleby czy obecności i rodzaju mikroorganizmów glebowych.

Do organicznych form azotu wykorzystywanych przez rośliny należą mocznyk i aminokwasy, do nieorganicznych - azotany i amoniak. Obecny w glebie azot organiczny jest w niewielkim stopniu dostępny dla roślin, które głównie przyswajają ten pierwiastek w postaci azotanów i amoniaku. Stężenie jonów amonowych w roztworach glebowych jest długotrwale ustabilizowane, ponieważ są one wiązane w kompleksach sorpcyjnych gleby (za sprawą ładunku dodatniego). Kationy amonowe, łatwo asymilowane przez rośliny, w wysokich stężeniach są toksyczne dla komórki roślinnej dlatego dla większości roślin, szczególnie gatunków uprawnych strefy umiarkowanej, głównym źródłem azotu są azotany. Jony azotanowe (NO_3^-) ze względu na swój ujemny ładunek nie są wiązane przez kompleksy sorpcyjne gleby, dlatego pozostają dostępne w roztworach glebowych dla roślin. Jednakże stężenie azotanów w roztworach glebowych często się zmienia nie tylko z powodu intensywnego pobierania tych jonów przez rośliny, ale także na skutek wypłukiwania przez intensywne opady deszczu czy aktywności glebowych mikroorganizmów denitryfikujących [1]. Okresowo poziom azotanów w glebie może się znacznie zmieniać (nawet trzy-, czterokrotnie), zatem rośliny musiały rozwinąć skuteczne mechanizmy adaptacyjne umożliwiające szybką odpowiedź i efektywne dostosowanie do zmiennej zawieszenia azotanów w glebie. W warunkach wysokiego stężenia azotanów w roztworze glebowym, rośliny pobierają jony NO_3^- , korzystając z systemu transportowego LATS (ang. *Low Affinity Transport System*) o niskim powinowactwie (powyżej 1 mM) do azotanów, natomiast przy niskich stężeniach egzogennych azotanów uruchamiają system pobierania typu HATS (ang. *High Affinity Transport System*) o wysokim powinowactwie do tych anionów (poniżej 1 mM) [2]. Dzięki temu, niezależnie od zewnętrznego stężenia azotanów, rośliny w sposób ciągły zaopatrują swoje tkanki w azot.

Procesy pobierania i translokacji jonów azotanowych w komórkach roślinnych polegają na aktywnym transporcie azotanów przez błonę plazmatyczną i

Anna Warzybok

Magdalena Migocka

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski, ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław, Polska; tel.: (71) 375 41 11, e-mail: anka.warzybok@gmail.com

Artykuł otrzymano 13 września 2011 r.

Artykuł zaakceptowano 8 listopada 2011 r.

Słowa kluczowe: azotany, transportery azotanowe NRT1 i NRT2, białka PTR (POT), odżywianie mineralne, fosforylacja/defosforylacja

Wykaz skrótów: CBL (ang. *calcineurin B-like protein*) – kalcyneuryna typu B; CIPK (ang. *CBL-interacting protein kinase*) – kinaza białkowa oddziałująca z kalcyneuryną typu B; CLC (ang. *chloride channel*) – kanały chlorkowe; NRT (ang. *NitRate transporters*) – transportery azotanowe; POT (ang. *proton-dependent oligopeptide transporters*) – transportery oligopeptydów zależne od gradientu protonów; PTR (ang. *peptide transporters*) – transportery peptydowe

Podziękowania: Opracowanie i wydanie tej pracy było możliwe dzięki wsparciu finansowemu ze strony Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (projekt nr NN 303818740).

tonoplast, przy udziale szeregu specyficznych białek błonowych pełniących funkcję transporterów azotanowych. Dotychczasowe badania pokazały, że w skład obydwu systemów transporterowych typu HATS i LATS wchodzi białka konstytutywne (cHATS i cLATS), których synteza odbywa się niezależnie od obecności azotanów w środowisku, lub białka, których synteza jest indukowana (iHATS i iLATS) tylko w obecności NO_3^- w roztworze glebowym [2]. Ostatnie badania koncentrują się nad określeniem tożsamości białek uczestniczących w pobieraniu azotanów z podłoża, transportu anionów do różnych komórek i tkanek oraz akumulacji i remobilizacji NO_3^- z wakuoli. U roślin wyższych zidentyfikowano do tej pory trzy typy transporterów wykazujących specyficzne powinowactwo do NO_3^- , które warunkują utrzymanie stałego stężenia jonów w cytoplazmie [2-5]. Są to białka należące do rodzin NRT1 i NRT2 (ang. *Nitrate Transporter*) uczestniczące w selektywnym transporcie azotanów, a także kanały chlorkowe CLC (ang. *Chloride Channels*) o szerszym powinowactwie do anionów. W przeciwieństwie do transporterów NRT kanały chlorkowe zbadano i szeroko opisano u zwierząt i ludzi ze względu na kluczowy udział tych białek w utrzymaniu biologicznych właściwości błon komórkowych (potencjału błonowego i objętości komórek). Białka NRT1 i NRT2 występują tylko u roślin i niektórych grzybów, które asymilują azotany, wykorzystując je do syntezy aminokwasów i innych związków azotowych. Spośród trzech klas białek transportujących azotany, NRT1, NRT2 i CLC, fizjologiczna rola rodziny transporterów NRT1 została jak dotąd stosunkowo najslabiej poznana. Badania kilku ostatnich lat znacznie przybliżyły molekularną naturę oraz kinetykę transportu azotanów przez białka NRT1, a także określiły subkomórkową i tkankową lokalizację niektórych transporterów, dzięki czemu możemy ostrożnie wnioskować o potencjalnym znaczeniu rodziny NRT1 w rozwoju i funkcjonowaniu roślin. Prezentowana praca podsumowuje dotychczasowy stan wiedzy na temat transporterów NRT1, przedstawiając najnowsze wyniki badań otrzymane w toku doświadczeń prowadzonych przede wszystkim na modelowej roślinie *Arabidopsis thaliana*.

BUDOWA I FUNKCJA TRANSPORTERÓW NRT1 (PTR)

Transportery NRT1 należą do dużej rodziny białek błonowych PTR obejmującej też transportery specyficzne wobec aminokwasów oraz di- i tripeptydów. Białka PTR zidentyfikowano u tak różnych filogenetycznie organizmów jak bakterie, archebakterie, rośliny, zwierzęta i ludzie. Niemniej jednak u roślin rodzina genów kodujących transportery PTR jest dużo liczniejsza niż u pozostałych organizmów. U dwóch modelowych roślin: jednoliściennej *Oryza sativa* i dwuliściennej *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano odpowiednio 80 i 53 geny PTR, czyli znacznie więcej niż u człowieka (6), nicienia *Cenorhabditis elegans* (4), muszki owocowej (3) i drożdży (2) [2]. Liczebność i różnorodność roślinnych białek PTR sugeruje, że pełnią one szczególnie istotne funkcje we wzroście, rozwoju i metabolizmie organizmów roślinnych. Analizy sekwencji aminokwasowych transporterów sugerują, że białka posiadają od 12 do 13 alfa helis tworzących domeny transbłonowe i są zbudowane z 450–600 reszt aminokwasowych u bakterii i z 600–750 reszt aminokwasowych u organizmów eukariotycznych. Ponadto, między 6 i 7 domeną transbłonową białek wystę-

puje pętla hydrofilowa, której funkcja do tej pory pozostaje niejasna [2]. Coraz liczniejsze badania wskazują, że białka PTR funkcjonują w błonie jako symportery, przy czym stosunek jonów wodorowych do przenoszonych substratów jest bardzo zmienny i zależy przede wszystkim od ładunku tych ostatnich [6]. Wszystkie białka PTR zaliczono do jednej rodziny na podstawie kilku zachowanych w toku ewolucji motywów w obrębie sekwencji aminokwasowych. Wśród tych motywów szczególnie istotny jest tzw. motyw sygnowy, unikatowa sekwencja aminokwasowa FING (FYXXINXGSL), którą do tej pory znaleziono jedynie w rodzinie białek PTR. Pozostałe zachowane w ewolucji rejon transportery PTR (np. YKEVNKGSL) nie są już tak unikatowe i charakterystyczne tylko dla tej rodziny białek, ponieważ wykazują ponad 60% homologii do motywów aminokwasowych występujących w ponad 50 białkach należących do innych rodzin.

Badania prokariotycznych i zwierzęcych białek PTR wskazywały, że transportery należące do tej rodziny wykorzystują gradient elektrochemiczny protonów głównie do transportu di- i tripeptydów przez błony komórkowe [6], stąd też rodzinę tych białek określono dwoma skrótami: PTR (transportery peptydowe, ang. *Peptide Transporter*) lub POT (transportery oligopeptydów zależne od gradientu protonów, ang. *Proton-coupled Oligopeptide Transporters*). Następnie okazało się, że białka tej rodziny wykazują bardziej zróżnicowaną specyficzność substratową i niektóre z nich zamiast krótkich peptydów transportują aminokwas-y lub azotany. Transportery peptydów i aminokwasów *A. thaliana* scharakteryzowano funkcjonalnie w niewielkim stopniu [2]. Heterologiczna ekspresja *AtPTR1* w komórkach drożdży i oocytach *Xenopus laevis* sugeruje, że białko kodowane przez gen uczestniczy w transporcie di- i tripeptydów, ale nie przenosi przez błony aminokwasów czy większych peptydów [7]. W wyniku syntezy fuzyjnego białka *AtPDR1-GFP* w protoplastach izolowanych z tytoniu *Nicotiana tabacum* zaobserwowano, że transporter zlokalizowany jest w błonie plazmatycznej [7]. Z kolei analizy aktywności promotora *AtPDR1* z wykorzystaniem genu reporterowego β -glukuronidazy (GUS) wykazały, że gen *A. thaliana* ulega ekspresji przede wszystkim w naczyniach, co pozwala przypuszczać, że białko PDR1 pełni szczególną rolę w dalekim transporcie krótkich peptydów [7]. Specyficzność substratową kolejnego transportera PTR *A. thaliana*, *AtPTR2*, także określono wykorzystując oocyty *Xenopus laevis* i technikę *patch-clamp* wykazując, że białko uczestniczy w translokacji di- i tri-peptydów, ale nie transportuje azotanów [6]. Co ciekawe, w układach heterologicznych białko *AtPDR2* transportowało peptydy w bardzo szerokim zakresie stężeń: od 30 μM do 3 mM [6]. Podobnie jak białka PTR1 i PTR2 także transporter *AtPTR3* uczestniczy w transporcie dipeptydów do komórki, co wykazano w badaniach z użyciem odpowiednich mutantów drożdżowych [8]. Zaobserwowano również, że ekspresja genu *AtPTR3* jest indukowana w wyniku mechanicznego uszkodzenia tkanki roślinnej, ataku patogenów, w warunkach stresu solnego oraz pod wpływem aminokwasów, kwasu salicylowego, kwasu jasmonowego i ABA (ang. *abscisic acid*) [8,9]. Wydaje się zatem, że *AtPDR3* uczestniczy w odpowiedzi roślin na stresse biotyczne i abiotyczne.

Oprócz transporterów peptydowych *A. thaliana*, dość dobrze scharakteryzowano dipeptydowy transporter HvPTR1 syntetyzowany w kiełkujących ziarnach jęczmienia [10,11]. Ekspresja genu kodującego białko HvPTR1 jest wysoce specyficzna i zachodzi głównie w epidermalnych komórkach kiełkującego zarodka [10]. Prawdopodobnie HvPTR1 odpowiada za wychwytywanie małych peptydów powstających w wyniku hydrolizy białek zapasowych bielma i ich transport do rozwijającego się zarodka [10]. W odpowiedzi na wzrost poziomu aminokwasów, w późniejszych etapach rozwoju zarodka aktywność transportera dipeptydowego jest hamowana na drodze modyfikacji potranslacyjnych [12]. Przypuszcza się, że białko HvPTR1 może stanowić kluczowy element systemu regulującego poziom azotu organicznego w bielmie podczas kiełkowania nasion [2].

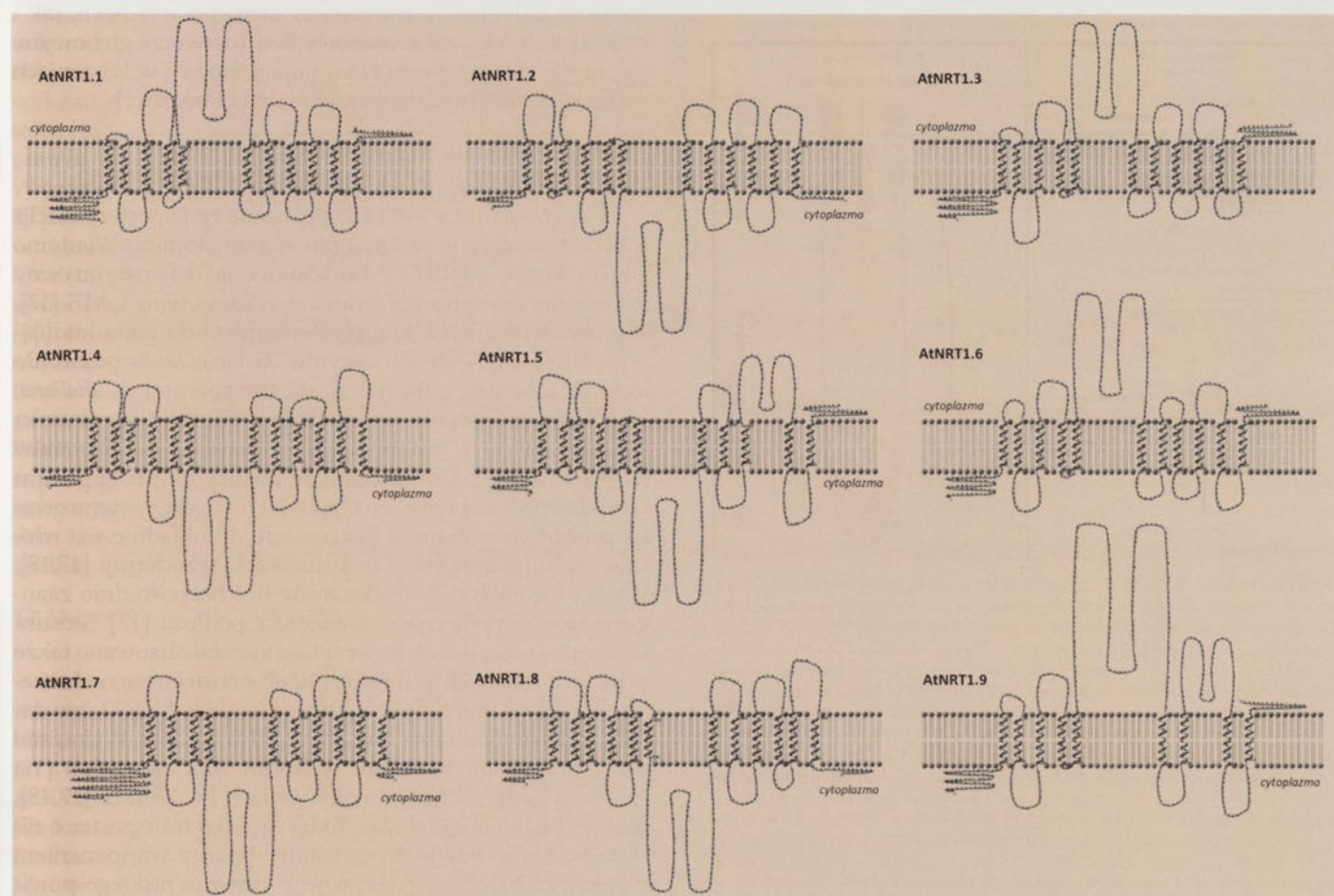
Wśród 53 białek PTR u *A. thaliana* do tej pory wyróżniono 9 białek, które prawdopodobnie transportują tylko azotany, natomiast nie uczestniczą w translokacji peptydów czy aminokwasów. Dla odróżnienia od pozostałych białek PTR grupę transporterów azotanowych nazwano NRT1. Przewidywaną topologię błonową białek NRT1 *A. thaliana* przedstawiono na rycinie 1. W zasadzie odpowiada ona schematowi typowego białka PTR: w obrębie sekwencji aminokwasowej transporterów występuje duża pętla cytoplazmatyczna dzieląca łańcuch na dwie części, z których każda składa

się z 5–6 hydrofobowych domen transbłonowych (Ryc. 1). Dzięki intensywnym badaniom prowadzonym w ostatnim dziesięcioleciu transportery azotanowe NRT1 *A. thaliana* to najlepiej do tej pory scharakteryzowane białka z rodziny PTR. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę poszczególnych białek NRT1 rzodkiewnika.

ROŚLINNE TRANSPORTERY NRT1

TRANSPORTER NRT1.1 (At1g12110)

Białko NRT1.1 to najlepiej poznany transporter azotanowy z rodziny NRT1. Gen kodujący to białko ulega najsilniejszej ekspresji w młodych częściach korzenia (szczególnie w czapeczce), w rozwijających się korzeniach bocznych oraz w tkankach przewodzących walca osiowego korzenia [13]. Liczne badania wykazały, że NRT1.1 uczestniczy w pobieraniu azotanów z roztworów glebowych i ich transporcie do innych części organizmu roślinnego. Jednak w przeciwieństwie do pozostałych białek z obydwu rodzin transporterów azotanowych (NRT1 i NRT2), NRT1.1 wykazuje zróżnicowane powinowactwo do azotanów z zależności od ich egzogennej stężenia. Mianowicie, przy wysokich stężeniach azotanów w środowisku białko wykazuje niskie powinowactwo ($K_m \sim 4$ mM) do tych jonów, natomiast przy niskich stężeniach egzogennej NO_3^- , NRT1.1 cechuje wysokie powinowactwo ($K_m \sim 50$ μM) do azotanów [13]. Dzięki



Rycina 1. Topologia transbłonowa transporterów NRT1 wykazujących powinowactwo do transportu azotanów. Przewidywane struktury drugorzędowe białek wygenerowano z użyciem sekwencji aminokwasowych transporterów dostępnych w bazie Aramemnon (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/index.ep>) oraz powszechnie dostępnych narzędzi bioinformatycznych: TMHMM 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) i TMRPres2D [28].

temu białko może funkcjonować jako transporter o niskim lub wysokim powinowactwie do azotanów, stanowiąc odpowiednio element jednego z dwóch systemów pobierania azotanów z roztworu glebowego: systemu LATS lub systemu HATS [13]. Transporter NRT1.1 może więc pełnić istotną funkcję w adaptacji roślin do środowiska o bardzo zmiennym poziomie azotanów w podłożu. Zmiana powinowactwa NRT1.1 następuje w wyniku modyfikacji potranslacyjnej białka: fosforylacji lub defosforylacji treoniny w pozycji 101 [2]. Wykazano, że AtNRT1.1 z ufosforylowaną Thr101 działa jako transporter azotanów wysokiego powinowactwa, podczas gdy defosforylacja reszty treoninowej zmienia powinowactwo transportera na niskie [14]. Fosforylacja białka NRT1.1, następująca w warunkach niskiego stężenia azotanów w podłożu, jest katalizowana przez kinazę CIPK8, aktywowaną przez wiążącą wapń kalcyneurynę typu B (CBL) [13]. Mechanizm potranslacyjnej modyfikacji aktywności NRT1.1 przedstawiono na rycinie 2A.

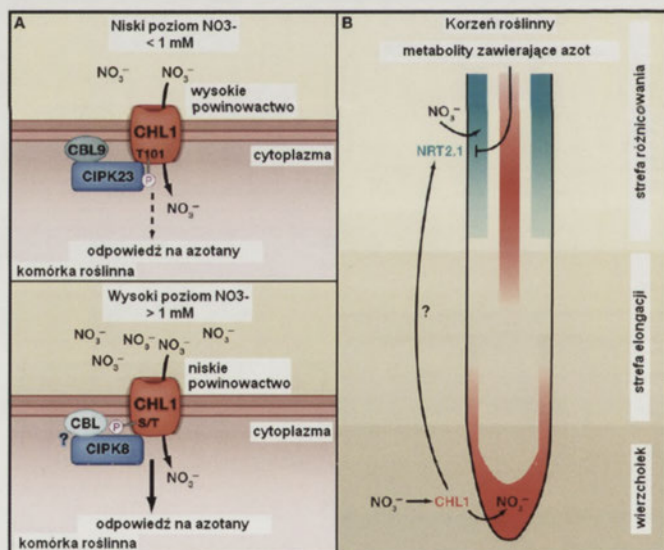
NRT1.1 może współdziałać z transporterami z rodziny NRT2: NRT2.1 i NRT2.2 w ramach systemu pobierania azotanów typu HATS [2] lub z innym białkiem z rodziny NRT1, NRT1.2, uczestnicząc w systemie pobierania NO_3^- typu LATS [15]. Przypuszcza się, że NRT1.1 pełni także rolę receptora odbierającego informację o poziomie azotanów w środowisku zewnętrznym [2]. Jako sensor egzogenne stężenia azotanów NRT1.1 reguluje syntezę i aktywność białka NRT2.1, które jest głównym transporterem zaopatrującym

rośliny w azotany w warunkach niskiego stężenia tych jonów w glebie (Ryc. 2B).

Niespodziewanym odkryciem ostatniego roku były wyniki badań, sugerujące udział NRT1.1 w transporcie auksyn. Wydaje się, że w warunkach niskiego stężenia azotanów w roztworze glebowym, NRT1.1 uczestniczy w translokacji auksyn do komórek epidermy korzeni bocznych *A. thaliana*, indukując bazypetalny transport hormonów w kierunku podstawy korzeni bocznych i zahamowanie ich wzrostu [16]. Z kolei wzrost stężenia azotanów w podłożu prawdopodobnie powoduje zahamowanie transportu auksyn przez NRT1.1 i, co za tym idzie, akumulację tych hormonów w merystemach wierzchołkowych korzeni bocznych i stymulację wzrostu tych organów [16]. Zatem NRT1.1 może wpływać na rozwój i architekturę korzeni bocznych poprzez regulację gradientu auksyn w tych organach. Jako receptor odbierający informację o stężeniu azotanów w środowisku zewnętrznym NRT1.1 już wcześniej postrzegany był jako element inicjujący rozmaite reakcje komórki roślinnej. Badania sugerują, że to właśnie z udziałem NRT1.1 azotany indukują ekspresję genów zaangażowanych w asymilację i pobieranie azotanów, wpływają na architekturę korzeni bocznych, a także na kiełkowanie nasion [16]. Reasumując, białko NRT1.1 pełni bardzo istotne funkcje w komórkach roślinnych jako: (i) receptor stężenia azotanów w roztworach glebowych, regulujący procesy pobierania, transportu i asymilacji NO_3^- w roślinach; (ii) transporter azotanów do komórki roślinnej w warunkach zarówno wysokich, jak i niskich stężeń jonów azotanowych w roztworze glebowym; (iii) regulator transportu i akumulacji auksyn w korzeniach roślin, a co za tym idzie wzrostu korzeni bocznych.

TRANSPORTER NRT1.2 (At1g69850)

W porównaniu z NRT1.1, pozostałe transportery NRT1 scharakteryzowano w dużo mniejszym stopniu. Wiadomo już, że białko AtNRT1.2 funkcjonuje jako konstytutywny transporter systemu pobierania azotanów typu LATS [17]. Wprowadzenie RNA komplementarnego do genu kodującego NRT1.2 (cRNA) do oocytów *Xenopus laevis* pozwoliło określić kinetykę i specyficzność transportera *A. thaliana*: białko syntetyzowane w oocytach cechowało się wysoką specyficznością i niskim powinowactwem do azotanów ($K_m = 6\text{mM}$) [17]. Dotychczasowe analizy ekspresji genu u rzodkiewnika sugerują, że białko NRT1.2 jest syntetyzowane przede wszystkim w korzeniach, a dokładnie we włóśnikach korzeniowych i w komórkach ryzodermy [17,18]. Wydaje się zatem, że białko może być bezpośrednio zaangażowane w pobieranie azotanów z podłoża [17]. Stosunkowo niewielką ilość transkryptu genu zlokalizowano także w pędach (około 10% transkryptu obserwowanego w korzeniach) [19], co mogłoby wskazywać na udział NRT1.2 w dalekim transporcie azotanów z korzeni do pędów. Wykazano także, że stężenie azotanów w środowisku nie wpływa na ekspresję genu *AtNRT1.2* w korzeniach i w pędach [17,18], dlatego białko NRT1.2 klasyfikuje się jako transporter o niskim powinowactwie do azotanów, będący komponentem systemu cLATS (konstytutywnego systemu niskiego powinowactwa).



Rycina 2. Funkcja NRT1.1 w korzeniach roślin (wg [13], zmodyfikowany). W warunkach niskiego stężenia azotanów w glebie NRT1.1 stymuluje aktywację kompleksu kinazy białkowej CIPK23 oddziałującej z kalcyneuryną typu B (CBL9), co prowadzi do fosforylacji reszty treoniny 101 (Thr101) w białku NRT1.1. Ufosforylowane białko NRT1.1 wykazuje wysokie powinowactwo do azotanów i pobiera do komórki nawet najmniejsze ilości azotanów obecne w środowisku (<math>< 1\text{ mM}</math>), zapewniając ciągłe zaopatrzenie roślin w NO_3^- . W obecności wyższych stężeń azotanów (> 1 mM) fosforylacja NRT1.1 nie zachodzi i białko pozostaje w błonie jako transporter azotanów o niskim powinowactwie, indukując aktywację pierwszorzędowej odpowiedzi roślin na azotany (stymulacja ekspresji genów pobierania i asymilacji azotanów). W przekazywaniu sygnału zależnego od nieufosforylowanego białka NRT1.1 uczestniczy kinaza białkowa CIPK8 aktywowana przez nieznaną kalcyneurynę typu B. CIPK8 fosforyluje NRT1.1 w miejscu innym niż Thr101. W korzeniach roślin, NRT1.1 odbiera sygnał o zewnętrznym stężeniu azotanów a także transportuje azotany do komórek korzeni, uczestnicząc w regulacji aktywności transportera NRT2.1 za pośrednictwem nieznanych cząsteczek sygnałowych. Ekspresja genu *NRT2.1* jest regulowana na drodze zależnej od NRT1.1 a także hamowana na drodze sprzężenia zwrotnego przez produkty asymilacji azotanów, np. aminokwasy.

TRANSPORTER NRT1.3 (At3g21670)

Białko NRT1.3 to najslabiej poznany transporter z rodziny NRT1. Jego funkcja właściwie do tej pory pozostaje niewyjaśniona. Analiza ekspresji genu w warunkach zróżnicowanego żywienia azotanowego sugeruje, że prawdopodobnie tak jak NRT1.2, NRT1.3 jest komponentem systemu transportowego o niskim powinowactwie do azotanów (LATS) [18,19]. Gen *AtNRT1.3* ulega ekspresji zarówno w korzeniach, jak i w pędach rzodkiewnika [19]. Jednak w odpowiedzi na zmiany stężenia azotanów zmiany poziomu transkryptu w obydwu organach przebiegają zupełnie inaczej. W pędach ekspresja *NRT1.3* jest wyraźnie stymulowana w ciągu 12–72 godzin wzrostu roślin na pożywkach wzbogaconych w azotany; w tych samych warunkach uprawy poziom transkryptu *NRT1.3* w korzeniach znacznie spada już po 3 godzinach traktowania roślin azotanami [19]. Takie wyniki sugerują, że funkcja fizjologiczna NRT1.3 może być zupełnie inna w korzeniach niż w liściach *A. thaliana*. W przeciwieństwie do pozostałych białek NRT1, nie analizowano dotąd funkcjonalnie białka NRT1.3 w oocytach *Xenopus laevis* czy drożdżach. Nie wiemy zatem, czy NRT1.3 to typowy transporter azotanowy, czy też jest to białko zbliżone funkcją do pozostałych białek PTR zdolnych do transportu krótkich peptydów.

TRANSPORTER NRT1.4 (At2g26690)

Kinetykę transportu z udziałem białka NRT1.4 określono w komórkach oocytów *Xenopus laevis* [20]. Transporter *Arabidopsis* funkcjonował w oocytach jako importer azotanów wykazując niskie powinowactwo do tych anionów ($K_m \sim 2,5$ mM) [20], stąd można przypuszczać, że jest to kolejny komponent systemu transportu azotanów typu LATS u roślin. W przeciwieństwie do pozostałych genów *NRT1*, gen kodujący transporter NRT1.4 ulega ekspresji przede wszystkim w ogonkach liściowych [20]. To właśnie z tą specyficzną lokalizacją białka wiąże się jego funkcja polegająca prawdopodobnie na akumulacji azotanów w ogonkach liściowych [20]. Przypuszcza się, że ogonek liściowy stanowi magazyn azotanów w organizmie roślinnym, ponieważ poziom azotanów w tym organie jest bardzo wysoki przy równoczesnej stosunkowo niskiej aktywności reduktazy azotanowej [20]. Badania prowadzone na ogonkach liściowych *Arabidopsis* sugerują, że organy te aktywnie uczestniczą w regulacji i utrzymaniu równowagi w stężeniu azotanów pomiędzy pędem i liściem [20]. Zakłada się, że to właśnie białko NRT1.4 spełnia kluczową funkcję w tym procesie [20].

TRANSPORTER NRT1.5 (At1g32450)

Kolejne białko NRT1 *Arabidopsis*, AtNRT1.5, jest zlokalizowane w błonie plazmatycznej, gdzie odpowiada za dwukierunkowy transport azotanów przez błonę komórkową [21]. Stosując metodę hybrydyzacji *in situ*, wykazano, że *AtNRT1.5* ulega ekspresji głównie w komórkach perycyklu korzenia przylegających bezpośrednio do ksylemu [21]. Stąd zakłada się, że transporter uczestniczy przede wszystkim w załadunku azotanów do ksylemu korzenia, umożliwiając daleki transport tych anionów do części nadziemnych rośliny [21]. Potwierdzeniem tej hipotezy jest fenotyp mutantów *Arabidopsis* z funkcjonalną delecją białka NRT1.5:

zmutowane rośliny wykazują znacznie ograniczony transport azotanów z korzeni do liści w porównaniu z roślinami niezmodyfikowanymi [21]. W badaniu z wykorzystaniem oocytów *Xenopus laevis* wykazano, że kierunek transportu jonów azotanowych przez NRT1.5 zależy od gradientu pH i potwierdzono, że transporter funkcjonuje jako symporter NO_3^-/H^+ o niskim powinowactwie ($K_m \sim 5\text{--}6$ mM) do azotanów [21]. Wydaje się zatem, że białko może odpowiadać za transport azotanów w dwóch kierunkach: do naczyń (załadunek ksylemu) i z naczyń (rozładunek ksylemu). Podobnej regulacji podlega transporter sacharozy SUT1, który odpowiada za import sacharozy do floemu w dojrzałych liściach i eksport sacharozy z floemu w tkankach docelowych [22].

Badania ekspresji genu *AtNRT1.5* pokazały, że poziom transkryptu jest regulowany przez azotany, cykl okołodobowy, pH oraz dostępność potasu [21]. Podobnie jak NRT1.1, transporter NRT1.5 można określić jako „indukowany przez azotany”, ponieważ ekspresja genu kodującego to białko jest indukowana obecnością jonów NO_3^- [21]. Najwyższy poziom ekspresji genu *AtNRT1.5* zaobserwowano u roślin uprawianych na podłożu o pH 5,5 [21]. Zmiana pH pożywki na 7,4 powodowała znaczne zahamowanie transkrypcji genu. Niedobór potasu, a także obecność sodu w środowisku zewnętrznym również prowadziły do obniżenia ekspresji *NRT1.5* [21]. Sugeruje się zatem, że daleki transport azotanów z korzeni do pędów podlega regulacji przez m.in. poziom potasu w komórkach. Ponadto zaobserwowano, że poziom mRNA *NRT1.5* jest regulowany przez cykl okołodobowy: obniża się stopniowo w ciągu dnia, natomiast wzrasta w ciągu nocy, osiągając maksimum tuż przed zakończeniem okresu ciemności [21]. Można zatem przypuszczać, że białko jest szczególnie aktywne w ciągu dnia, gdy najbardziej intensywne są procesy transpiracji i fotosyntezy.

TRANSPORTER NRT1.6 (At1g27080)

Funkcjonalne analizy białka AtNRT1.6 w oocytach *Xenopus laevis* wykazały, że jest to specyficzny transporter azotanowy o niskim powinowactwie do jonów NO_3^- ($K_m \sim 6$ mM) [23]. Szczególnie wysoki poziom ekspresji genu *NRT1.6* ma miejsce w kwiatach bezpośrednio po zapyleeniu, co sugeruje, że białko jest zaangażowane w dostarczanie azotanów do rozwijającego się zarodka [23]. Ekspresja genu reporternego kodującego β -glukuronidazę (GUS) pod promotorem genu *AtNRT1.6* wykazała największą aktywność transkrypcyjną promotora w tkance przewodzącej wieszadełka i łuszczyzny nasion [23]. Z kolei u mutantów *A. thaliana* pozbawionych transportera (*atnrt1.6*) obserwowano zaburzenia podziałów komórkowych w obrębie wieszadełka, utratę turgoru w komórkach tej struktury, a także obniżoną akumulację azotanów w nasionach i obumieranie nasion [23]. Wydaje się zatem, że NRT1.6 pełni bardzo ważną funkcję w rozwoju zarodków w nasionach.

TRANSPORTER NRT1.7 (At1g69870)

Analizy funkcjonalne AtNRT1.7 w oocytach *Xenopus laevis* sugerują, że w komórkach *A. thaliana* białko funkcjonuje jako specyficzny transporter azotanowy wykazujący nieco wyższe powinowactwo do NO_3^- ($K_m \sim 2,8$ mM) w porów-

naniu do NRT1.1-1.2 i NRT1.4-1.6, ale nadal klasyfikowany jako komponent systemu LATS [24]. Analiza ekspresji genu *AtNRT1.7* i rozmieszczenia białka kodowanego przez ten gen z użyciem specyficznych przeciwciał wykazała, że NRT1.7 występuje przede wszystkim w liściach, i że zawartość białka znacznie wzrasta (nawet 25-krotnie) w trakcie starzenia się tych organów [24]. W porównaniu do liści, poziom transkryptu *NRT1.7* w korzeniach był znacznie niższy [24]. Badanie z użyciem genu reporterowego β -glukuronidazy wykazało także, że aktywność transkrypcyjna promotora genu *AtNRT1.7* była zdecydowanie największa w dystalnych partiach liści, co może sugerować, że transporter odpowiada za wycofywanie azotanów ze starszych do młodszych części tych organów [24]. Co więcej, obserwacje mutantów pozbawionych niezdolnych do syntezy *AtNRT1.7* sugerują, że białko odpowiada także za kierunkowy transport jonów NO_3^- ze starszych do młodszych liści: w porównaniu z roślinami niezmodyfikowanymi, rośliny *atnrt1.7* akumulowały więcej azotanów w starszych niż w młodszych liściach [24]. Ponadto, w soku floemowym wiązek przewodzących liści mutantów stwierdzono znacznie obniżony poziom jonów NO_3^- [24]. Zatem u roślin pozbawionych transportera NRT1.7, procesy wycofywania azotanów z organów bogatych w te jony do organów o dużym zapotrzebowaniu na azotany były wyraźnie zredukowane [24]. Prawdopodobnie białko uczestniczy w załadunku azotanów do floemu wiązek przewodzących starszych, bogatych w azotany liści w celu dalszego transportu tych jonów do młodszych liści lub do innych organów akceptorowych.

TRANSPORTER NRT1.8 (At4g21680)

Badanie aktywności białka *AtNRT1.8* w oocytach *Xenopus laevis* wykazało, że transporter odpowiada za pobieranie azotanów do komórki i, w porównaniu do pozostałych białek NRT1, wykazuje dużo niższe ($K_m \sim 12$ mM) powinowactwo do jonów NO_3^- [25]. Zarówno metoda hybrydyzacji *in situ* jak i analiza aktywności promotora genu *AtNRT1.8* z użyciem genu reporterowego β -glukuronidazy wykazały, że poziom transkrypcji genu rzodkiewnika jest najwyższy w komórkach miękiszu ksylemu, przylegających bezpośrednio do naczyń [25]. Udział białka w transporcie azotanów do komórki roślinnej potwierdzono w badaniach na protoplastach *A. thaliana* syntetyzujących fuzyjne białko *AtNRT1.8*-GFP, które pokazały, że transporter kierowany jest do błony plazmatycznej [25]. W porównaniu z roślinami niezmodyfikowanymi, mutanty *Arabidopsis* pozbawione transportera (*atnrt1.8*) akumulowały znaczne ilości azotanów w ksylemie [25]. Wydaje się zatem, że to białko błony plazmatycznej uczestniczy w rozładunku ksylemu, transportując jony NO_3^- z naczyń do przylegających komórek miękiszu ksylemowego [25]. Pod względem budowy, *AtNRT1.8* wykazuje 64% homologii do transportera *AtNRT1.5*, który uczestniczy w transporcie azotanów do ksylemu. Podobieństwo strukturalne obydwu białek prawdopodobnie przekłada się na podobne własności funkcjonalne transporterów: obydwa białka odpowiadają za daleki transport (załadunek albo rozładunek) azotanów [26]. Co ciekawe, ekspresja genu *NRT1.8* jest stymulowana przez azotany, a także przez kadm [25]. Równocześnie mutanty *atnrt1.8* wykazują zwiększoną wrażliwość na kadm w obecności 25-50 mM azotanów w środowisku zewnętrznym [25].

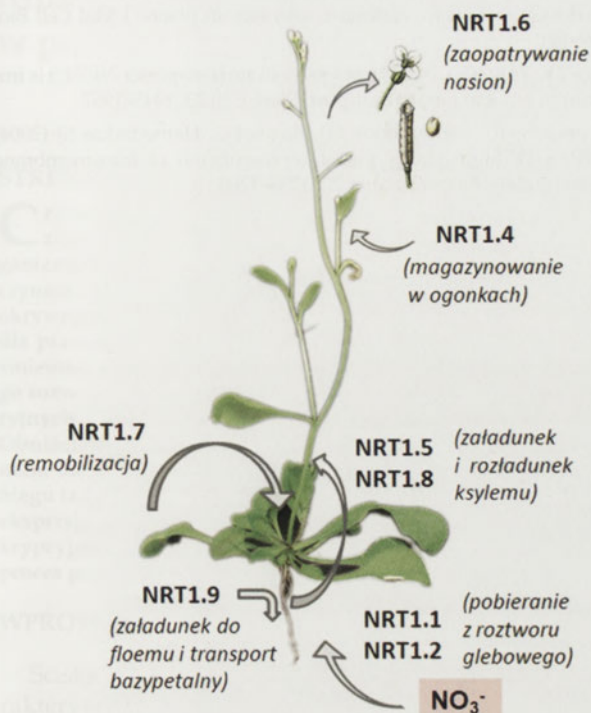
Zatem można przypuszczać, że białko NRT1.8 jest w jakiś sposób zaangażowane także w tolerancję roślin na obecność kadmu w środowisku. Zaobserwowano, że w obecności kadmu rośliny magazynują więcej azotanów w korzeniach niż w pędach. Zwiększona akumulacja jonów w korzeniach prawdopodobnie sprzyja utrzymaniu wysokiej aktywności reduktazy azotanowej i azotynowej (wrażliwych na kadm kluczowych enzymów szlaku asymilacji azotanów) i umożliwia prawidłowy wzrost oraz rozwój systemu korzeniowego w warunkach stresu [25,26]. Ponadto, związki syntetyzowane z azotanów w korzeniach (aminokwasy, peptydy, GSH, fitochelatyny) mogą uczestniczyć w wiązaniu i depozycji kadmu i tym samym chronić organy nadziemne (w tym fotosyntetyzujące liście) przed destrukcyjnym wpływem tego metalu [25,26]. W związku z tym wydaje się, że regulowany przez NRT1.8 poziom azotanów w korzeniach może mieć istotne znaczenie dla odporności roślin w środowisku zanieczyszczonym kadmem.

TRANSPORTER NRT1.9 (At1g18880)

Najnowsze badania nad funkcją transporterów NRT1 u roślin dotyczą białka NRT1.9. Wiadomo już, że produkt genu *AtNRT1.9* jest także elementem systemu niskiego powinowactwa do azotanów (LATS), którego synteza jest stymulowana podczas dłuższej ekspozycji roślin na azotany [27]. Funkcjonalna charakterystyka *AtNRT1.9* w oocytach *Xenopus laevis* potwierdziła, że jest to białko transportujące tylko azotany [27]. Analizy z użyciem białka zielonej fluorescencji (GFP) i β -glukuronidazy wykazały, że transporter występuje w błonie plazmatycznej komórek towarzyszących floemu korzeni [27]. Mutanty *Arabidopsis* pozbawione białka (*atnrt1.9*) wykazywały znacznie obniżony poziom azotanów we floemie korzeniowym oraz zredukowany transport azotanów z części nadziemnych do korzeni, co sugeruje, że *AtNRT1.9* uczestniczy w załadunku azotanów do floemu wiązek przewodzących korzeni i stymuluje bazypetalny transport tych jonów [27]. W obecności wysokich stężeń azotanów u tych samych mutantów obserwowano z kolei wzmożony ksylemowy transport azotanów z korzeni do pędów i stymulację wzrostu roślin, co wskazuje na wzajemną korelację ksylemowego i floemowego transportu azotanów [27]. Ksylem przewodzi ogromną większość azotanów między korzeniem i pędem, ale nie podlega wątpliwości, że procesy transportu jonów azotanowych floemem są także istotne w regulacji translokacji azotanów między części nadziemne i podziemne roślin [27].

PODSUMOWANIE

Intensywne w ostatnich latach badania nad roślinnymi transporterami NRT1 doprowadziły do częściowego wyjaśnienia molekularnych podstaw procesów istotnych z punktu widzenia wzrostu i rozwoju roślin: pobierania azotanów z roztworu glebowego, translokacji tych jonów w obrębie różnych komórek, tkanek i organów czy też akumulacji albo wycofywania azotanów z organów donorowych (starszych albo bogatych w azotany liści, ogonków, liścieni) do akceptorowych (młodszych, rozwijających się tkanek). Wśród licznych białek zaangażowanych w fizjologiczną adaptację roślin do zmiennej dostępności azotanów w środowisku, transportery NRT1 wydają się zajmować szczególną po-



Rycina 3. Lokalizacja i fizjologiczna funkcja transporterów azotanów NRT1 u *Arabidopsis thaliana*. Dokładniejszy opis funkcji poszczególnych białek znajduje się w tekście. Rysunek przedstawiający pokrój rośliny zaczerpnięto ze strony <http://www.ens-lyon.fr/RDP/SiCE/english/thaliana-uk.html> i zmodyfikowano.

zycję ze względu na swoją lokalizację i funkcję. Znaczenie fizjologiczne, a także funkcjonalne powiązanie białek NRT1 u *Arabidopsis* przedstawiono na rycinie 3. NRT1.1 i NRT1.2 razem z dwoma białkami z rodziny NRT2 (NRT2.1 i NRT2.2) odpowiadają za pobieranie azotanów przez włóśniki korzeniowe. Filogenetycznie blisko spokrewnione białka NRT1.5 i NRT1.8 odpowiadają za import azotanów do naczyń (załadunek) i eksport azotanów z ksylemu do tkanek docelowych (rozładunek). Natomiast białko NRT1.9 uczestniczy w transporcie jonów azotanowych do floemu, regulując jednocześnie transport NO_3^- naczyniami. NRT1.4 odgrywa istotną rolę w akumulacji azotanów w ogonkach liściowych, a NRT1.7 uczestniczy w remobilizacji azotanów i ich transporcie ze starych do młodych rozwijających się organów (np. ze starszych do młodszych liści). Wyjątkowa funkcja NRT1.6 polega na dostarczaniu azotanów do rozwijających się zarodków w nasionach. Wśród wszystkich białek NRT1 szczególnie wyróżnia się NRT1.1, który odpowiada nie tylko za transport azotanów w roślinach, ale również za percepcję informacji o stężeniu azotanów w środowisku zewnętrznym oraz prawdopodobnie za regulację transportu auksyn w komórkach korzeni bocznych. Mechanizm percepcji stężenia jonów azotanowych przez NRT1.1 i zmiany funkcji tego białka z receptorowej na transportową nie został jeszcze wyjaśniony.

PIŚMIENNICTWO

1. Crawford M, Glass A (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci* 10: 389-395
2. Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK (2007) Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett* 581: 2290-2300

3. Hechenberger M, Schwappach B, Fischer Wn, Frommer B, Jentsch J, Steinmeyer K (1996) A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional complementation of a yeast strain with a *CLC* gene disruption. *J Biol Chem* 271: 33632-33638
4. Forde G (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1465: 219-235
5. Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F (2002) Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiol* 129: 886-896
6. Chiang CS, Stacey G, Tsay YF (2004) Mechanisms and functional properties of two peptide transporters, AtPTR2 and fPTR2. *J Biol Chem* 279: 30150-30157
7. Dietrich D, Hammes U, Thor K, Suter-Grottemeyer M, Fluckiger R, Slusarenko AJ, Ward JM, Rentsch D (2004) AtPTR1, a plasma membrane peptide transporter expressed during seed germination and in vascular tissue of *Arabidopsis*. *Plant J* 40: 488-499
8. Karim S, Holmstrom KO, Mandal A, Dahl P, Hohmann S, Brader G, Palva ET, Pirhonen M (2007) AtPTR3, a wound-induced peptide transporter needed for defence against virulent bacterial pathogens in *Arabidopsis*. *Planta* 225: 1431-1445
9. Karim S, Lundh D, Holmstrom K, Mandal A, Pirhonen M (2005) Structural and functional characterization of AtPTR3, a stress-induced peptide transporter of *Arabidopsis*. *J Mol Model* 11: 226-236
10. West CE, Waterworth WM, Stephens SM, Smith CP, Bray CM (1998) Cloning and functional characterization of a peptide transporter expressed in the scutellum of barley grain during the early stages of germination. *Plant J* 15: 221-229
11. Schulze W, Frommer WB, Ward JM (1999) Transporters for ammonium, amino acids and peptides are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes*. *Plant J* 17: 637-646
12. Waterworth WM, Ashley MK, West CE, Sunderland PA, Bray CM (2005) A role for phosphorylation in the regulation of the barley scutellar peptide transporter HvPTR1 by amino acids. *J Exp Bot* 56: 1545-1552
13. Vert G, Chory J (2009) A toggle switch in plant nitrate uptake. *Cell* 138: 1064-1066
14. Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF (2009) CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* 138: 1184-1194
15. Krouk G, Crawford NM, Coruzzi GM, Tsay YF (2010) Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Curr Opin Plant Biol* 13: 266-273
16. Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, Hoyerova K, Tillard P, Leon S, Ljung K, Zazimalova E, Benkova E, Nacry P, Gojon A (2010) Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental Cell* 18: 927-937
17. Huang NC, Liu KH, Lo HJ, Tsay YF (1999) Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell* 11: 1381-1392
18. Plett D, Toubia J, Garnett T, Tester M, Kaiser BN, Baumann U (2010) Dichotomy in the *NRT* gene families of dicots and grass species. *PLoS One* 5: e15289
19. Okamoto M, Vidmar J, Glass A (2003) Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant Cell Physiol* 44: 304-317
20. Chiu CC, Lin CS, Hsia AP, Su RC, Lin HL, Tsay YF (2004) Mutation of a nitrate transporter, *AtNRT1.4*, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant Cell Physiol* 45: 1139-1148
21. Lin SH, Kuo HF, Canivenc G, Lin CS, Lepetit M, Hsu PK, Tillard P, Lin HL, Wang YY, Tsai CB, Gojon A, Tsay YF (2008) Mutation of the *Arabidopsis nrt1.5* nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell* 20: 2514-2628
22. Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R (2005) Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *J Biol Chem* 280: 21437-21443

23. Almagro A, Lin HS, Tsay YF (2008) Characterization of the *Arabidopsis* nitrate transporter *NRT1.6* reveals a role of nitrate in early embryo development. *Plant Cell* 20: 3289–3299
24. Fan SC, Lin CS, Hsu PK, Lin SH, Tsay YF (2009) The *Arabidopsis* nitrate transporter *NRT1.7*, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. *Plant Cell* 21: 2750–2761
25. Li JY, Fu YL, Pike S. M, Bao J, Tian W, Zhang Y, Chen CZ, Zhang Y, Li HM, Huang J, Li LG, Schroeder JI, Gassmann W, Gong JM (2010) The *Arabidopsis* nitrate transporter *NRT1.8* functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *Plant Cell* 22: 1633–1646
26. Gojon A, Gaymard F (2010) Keeping nitrate in the roots: an unexpected requirement for cadmium tolerance in plants. *J Mol Cell Biol* 2: 299–301
27. Wang YY, Tsay YF (2011) *Arabidopsis* nitrate transporter *NRT1.9* is important in phloem nitrate transport. *Plant Cell* 23: 1945–1957
28. Spyropoulos IC, Liakopoulos TD, Bagos PG, Hamodrakas SJ (2004) TMRPres2D: high quality visual representation of transmembrane protein models. *Bioinformatics* 20: 3258–3260

The function of nitrate transporters NRT1 in plants

Anna Warzybok[✉], Magdalena Migocka

Institute of Plant Physiology, Department of Plant Physiology, Wrocław University, 6/8 Kanonia St., 50-328 Wrocław, Poland

[✉]e-mail: anka.warzybok@gmail.com

Key words: nitrate, nitrate transporters NRT1 and NRT2, PTR (POT) proteins, mineral nutrition, phosphorylation/dephosphorylation

ABSTRACT

Nitrate is the main source of inorganic nitrogen for plants grown in aerobic soil conditions. The growth and development of many species, including cultivated crops is strictly dependent on the effective processes of nitrate uptake, its accumulation and remobilization within the plant tissues under frequent fluctuations of NO_3^- level in soil. The proteins engaged in nitrate translocation across cellular membranes are the key players governing nitrate distribution within the plant body. Two families of proton-coupled symporters, NRT1 and NRT2, and one type of proton-coupled antiporters, CIC, have been shown to be involved in nitrate transport in higher plants. The recent progress in research on NRT1 proteins has shed the light on the localization and physiological function of those nitrate transporters in the NO_3^- uptake, NO_3^- cell-to-cell and tissue-to-tissue distribution, nitrates accumulation and efflux within the model plant *Arabidopsis thaliana*. This review focuses on the recent findings of the new molecular mechanisms controlling NO_3^- transport and signaling which employ nine NRT1 proteins of *A. thaliana*, with the emphasis on the physiological function and relevance of these proteins for the proper plant growth and development.

Rola czynników transkrypcyjnych z rodziny LSF/Grainyhead w powstawaniu i funkcjonowaniu powłok ciała zwierząt

STRESZCZENIE

Czynniki transkrypcyjne z rodziny LSF/Grainyhead to białka, których struktura i funkcje zostały zachowane w toku ewolucji organizmów eukariotycznych, od prymitywnych organizmów jednokomórkowych po organizmy złożone. W organizmach wielokomórkowych czynniki te wykazują specyficzność tkankową i są aktywne przede wszystkim w nabłonku okrywającym. Funkcje czynników GRHL są związane z regulacją ekspresji genów istotnych dla prawidłowego różnicowania i funkcjonowania nabłonków, zaś profile ich ekspresji są zmienne, zwłaszcza podczas rozwoju embrionalnego. Białka te są istotne dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmu. Obecnie badania nad rolą czynników transkrypcyjnych GRHL prowadzone są zarówno na poziomie komórki jak i organizmu złożonego. Obniżenie ekspresji genów *Grhl* u zwierząt doświadczalnych prowadzi do wielu schorzeń, m.in. do zaburzeń w szlakach przekazywania sygnałów ważnych dla prawidłowego przebiegu takich procesów, jak gojenie się ran czy zamykanie cewy nerwowej. Zmiany poziomu ekspresji genów *GRHL* mają również znaczenie dla procesu nowotworzenia. Czynniki transkrypcyjne GRHL funkcjonują bowiem w szlakach przekazywania sygnałów regulujących proces proliferacji komórek i apoptozę.

WPROWADZENIE

Ścisła regulacja ekspresji genów pozwala na generowanie w komórce charakterystycznego zestawu transkryptów, transkryptomu, na matrycy którego powstaje specyficzny zestaw białek decydujących o biochemicznym charakterze komórek danego typu, proteom. W zależności od potrzeb, transkryptom oraz proteom ulegają ciągłym, kontrolowanym zmianom. Na poziomie organizmu zjawisko to jest obserwowane w komórkach danego typu m.in. podczas takich procesów, jak: rozwój embrionalny, różnicowanie komórek i powstawanie tkanek czy odpowiedź na sygnały zewnątrzkomórkowe (np. na stres). Kluczowym etapem regulującym proces transkrypcji danego genu jest powstanie charakterystycznego kompleksu inicjacyjnego. Kompleks ten tworzy się w wyniku oddziaływania między specyficznymi sekwencjami DNA, położonymi w pobliżu genu, a swoistymi białkami, tj. zależnej od DNA polimerazy RNA oraz specyficznymi czynnikami transkrypcyjnymi, które mogą inicjować lub hamować proces transkrypcji [1,2]. Kompozycja kompleksu inicjacyjnego zależy nie tylko od genu, którego ekspresja jest kontrolowana, ale także od etapu rozwoju czy rodzaju tkanki, dlatego bardzo często mówi się o czynnikach transkrypcyjnych tkankowo-specyficznych czy specyficznych dla danego procesu biologicznego lub etapu rozwoju.

Czynniki transkrypcyjne z rodziny LSF/Grainyhead powszechnie występują w organizmach należących do królestwa zwierząt *Metazoa* [3]. Te tkankowo-specyficzne białka są regulatorami takich procesów, jak: morfogeneza i histogeneza powłok ciała, zamykanie nabłonkowych struktur pochodzenia ektodermalnego, utrzymywanie funkcji i struktury nabłonka okrywającego oraz gojenie się ran. Funkcje te zapewniają utrzymanie integralności powłoki ciała oraz homeostazę całego organizmu i są zachowywane podczas ewolucji. Warto podkreślić, że ewolucyjne pojawienie się tych czynników poprzedziło (i być może spowodowało) wykształcenie się ektodermalnej tkanki nabłonkowej.

CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE Z RODZINY LSF/GRAINYHEAD

Rodzina czynników transkrypcyjnych LSF/Grainyhead składa się z dwóch podrodzin: LSF (ang. *Late SV40 Factor*, nazywanej również TFCP2) i GRH (ang. *Grainyhead*) (Ryc. 1). Białka należące do obu podrodzin wykryto u jednokomórkowego eukariotycznego organizmu ameboidalnego (należącego do starego ewolucyjnie rodzaju) *Capsaspora owczarzaki* [4], jak i u wielokomórkowców *Metazoa* (np. *Homo sapiens*, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*) [3].

Agnieszka Kikulska

Michał Młacki

Tomasz Wilanowski

Pracownia Przekazywania Sygnału, Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, Warszawa

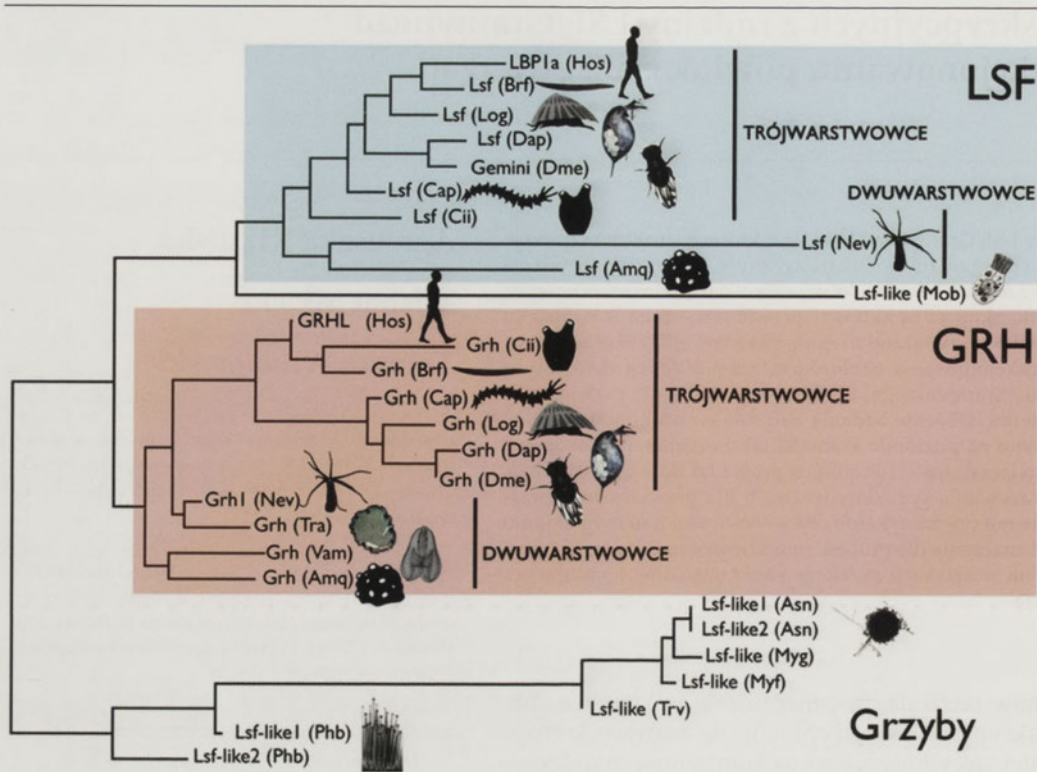
Pracownia Przekazywania Sygnału, Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: t.wilanowski@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 18 października 2011 r.
Artykuł zaakceptowano 5 stycznia 2012 r.

Słowa kluczowe: czynniki transkrypcyjne z rodziny Grainyhead, nabłonek, gojenie się ran, szlaki przekazywania sygnału

Wykaz skrótów: BMP (ang. *bone morphogenetic protein*) – białko morfogenetyczne kości; DDC (ang. *DOPA-decarboxylase, aromatic L-amino acid decarboxylase*) – dekarboksylaza aromatycznych L-aminokwasów, dekarboksylaza L-DOPA; EGF (ang. *epidermal growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu; EOB (ang. *eyes open at birth*) – syndrom otwartych oczu przy porodzie; ERK (ang. *extracellular-signal-regulated kinase*) – kinaza MAP regulowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi; FGF (ang. *fibroblast growth factor*) – czynniki wzrostu fibroblastów; GEF (ang. *guanine nucleotide exchange factor*) – czynnik wymiany nukleotydu guaniny; PLE (ang. *tyrosine hydroxylase, tyrosine 3-monoxygenase*) – hydroksylaza tyrozynowa, 3-monooksygenaza tyrozyny; PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog*) – homolog fosfatazy i tensyny; TGF (ang. *transforming growth factor*) – transformujący czynnik wzrostu

Podziękowania: Niniejszy artykuł przeglądowy został zrealizowany w ramach projektu badawczego "Funkcje czynnika transkrypcyjnego Grainyhead-like 1 (Grhl1)" finansowanego w ramach grantów: 1) European Molecular Biology Organization (EMBO) Installation Grant 2131: *Role of the Grhl1 gene in cancer and other disease*; 2) Marie Curie International Reintegration Grant 256096: *Grhl1 in skin cancer*. Projekt finansowany przez Unię Europejską w ramach 7 Programu Ramowego Badań, Rozwoju Technologicznego i Wdrożeń; 3) Project Grant 1031854: *Identification of critical factors for the establishment and maintenance of the epidermal barrier*. Projekt finansowany przez National Health and Medical Research Council, Australia.



Rycina 1. Filogeneza białek z rodziny LSF/Grainyhead. LSF – Late SV40 Factor; GRH – Grainyhead; Amq – *Amphimedon queenslandic*; Asn – *Aspergillus Niger*; Brf – *Branchiostoma floridae*; Cap – *Capitella* species; Cii – *Ciona intestinalis*; Dap – *Daphnia pulex*; Dme – *Drosophila melanogaster*; Hos – *Homo sapiens*; Log – *Lotia gigantea*; Myf – *Mycosphaerella fijiensis*; Myg – *Mycosphaerella graminicola*; Mob – *Monosiga brevicollis*; Nev – *Nematostella vectensis*; Phb – *Phycomyces blakesleeanus*; Tra – *Trichoplax adhaerens*; Trv – *Trichoderma virens*; Vam – *Vallidula multififormi*. Opracowano na podstawie [3] i wykorzystano za zgodą autorów i wydawcy, zmodyfikowane.

Ewolucyjne rozejście się podrodziny GRH i LSF/CP2 nastąpiło jeszcze przed rozdzieleniem się linii ewolucyjnych prowadzących do dzisiejszych *Metazoa* i *Capsaspora owczarzaki*, czyli około 1,6 mld lat temu. W gałęzi wiodącej do współcześnie żyjących wiciowców i grzybów doszło prawdopodobnie do utraty genów z podrodziny Grainyhead, gdyż znaleziono u nich wyłącznie białka z podrodziny LSF/TFCP2 [3]. Pierwsze geny *LSF* i *Grh* powstały prawdopodobnie w wyniku duplikacji genu protoplasty lub w następstwie powielenia całego genomu (WGD, ang. *whole genome duplication*). Początkowo te bliźniacze geny i kodowane przez nie czynniki transkrypcyjne mogły spełniać podobne funkcje, po czym uległy subfunkcjonalizacji (rozdział funkcji) lub neofunkcjonalizacji (pozyskanie nowych funkcji) [5,6]. WGD, powiązane ze zjawiskiem silnej selekcji i utraty genów, odegrało bardzo ważną rolę w rozwoju morfologicznej złożoności oraz specjacji tkankowców. Szczególną grupą genów, które ulegały specyficznemu zachowaniu po WGD, są geny regulatorowe, w tym geny kodujące czynniki transkrypcyjne. Liczba kopii takich genów jest istotna dla prawidłowego funkcjonowania komórek eukariotycznych i organizmów wielokomórkowych [7,8].

Historycznie pierwszym zidentyfikowanym członkiem podrodziny Grainyhead był występujący u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) czynnik transkrypcyjny GRH (Grainyhead) [9-13]. U ssaków zidentyfikowano do tej pory trzy ortologiczne do niego białka oraz trzy należące do podrodziny LSF/TFCP2 (Tab. 1). Te ostatnie są aktywne

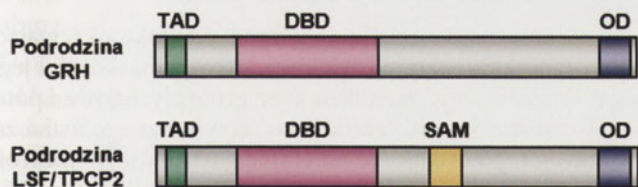
we wszystkich typach tkanek i kontrolują ekspresję genów niezbędnych dla prawidłowego przebiegu podstawowych procesów komórkowych (cykl komórkowy i funkcje przeżyciowe), procesów rozwojowych oraz procesów odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie wątroby, układu immunologicznego i nerwowego, rozwój oczu, erytropoezę (ekspresja genów globin), biosyntezę steroidów i wiele innych [14-18]. Z kolei białka z podrodziny Grainyhead wykazują ściśle regulowaną, tkankowo-specyficzną profil ekspresji. Są one aktywne głównie w tkance nabłonkowej wielu organów i odgrywają istotną rolę w procesie morfogenezy nabłonków, jak i w utrzymaniu ich integralności i zachowaniu prawidłowej struktury [19].

Wszystkie białka z rodziny LSF/Grainyhead mają podobną strukturę domenową (Ryc. 2) [25]. W ich budowie można wyróżnić trzy charakterystyczne części: N-kończącą

domenę transaktywacyjną (TAD), C-kończącą domenę oligomeryzacyjną (OD) i znajdującą się między nimi unikalną domenę wiążącą DNA (DBD). Sekwencja białkowa domeny DBD w czynnikach transkrypcyjnych z rodziny LSF/Grainyhead nie wykazuje podobieństwa do wcześniej zi-

Tabela 1. Homologi białek z rodziny LSF/Grainyhead u ssaków. Na podstawie: www.genenames.org, www.informatics.jax.org

	symbol	synonimy
<i>Mus musculus</i>	podrodzina LSF/TFCP2	
	Tcfcp2	CP2, CP-2, LSF, LBP-1c, LBP-1d, LBPI, LSF, UBPI
	Ubp1	LBP-1a, LBP-1b, NF2d9
	Tcfcp2l1	LBP-9, CRTR-1, Cp2l1
	podrodzina GRH	
	Grhl1	LBP-32, p61 MGR, p70 MGR, Tcfcp2l2
Grhl2	BOM, Tcfcp2l3, FLJ13782	
Grhl3	ct, Som, Get1, nmf231	
<i>Homo sapiens</i>	podrodzina LSF/TFCP2	
	TFCP2	CP2, LBP-1C, LSF, TFCP2C
	UBP1	LBP-1a
	TFCP2L1	LBP-9, CRTR-1
	podrodzina GRH	
	GRHL1	LBP-32, MGR
GRHL2	BOM, FLJ13782	
GRHL3	SOM	



Rycina 2. Schemat struktury genów z rodziny LSF/Grainyhead. TAD – domena transaktywacyjna; DBD – domena wiążąca DNA; OD – domena oligomeryzacyjna; SAM – motyw alfa. Opracowano na podstawie [20,24].

dentyfikowanych domen typowych dla innych czynników transkrypcyjnych. Natomiast jej trójwymiarowa struktura jest zbliżona do struktury domeny wiążącej DNA białek z rodziny p53, co sugeruje, że obie grupy tych regulatorów miały wspólnego przodka. Białka z podrodziny LSF/TFCP2 posiadają dodatkowo domenę SAM (motyw alfa), uczestniczącą w oddziaływaniach między białkami [20].

Wykazano, że pomiędzy białkami z podrodzin LSF/TFCP2 i GRH istnieją zasadnicze różnice w sposobie oligomeryzacji i w sekwencji DNA, do której się wiążą [21-23]: czynniki z podrodziny GRH wiążą się do pojedynczej sekwencji DNA jako homo- lub heterodimery, natomiast czynniki z podrodziny LSF/TFCP2 wiążą się do dwóch bezpośrednich powtórzonych sekwencji DNA jako homo- lub heterotetramery. Co ciekawe, mimo bliskiego pokrewieństwa, białka należące do podrodziny GRH nie są zdolne do tworzenia kompleksów z białkami należącymi do podrodziny LSF/TFCP2 [24-26]. Za specyficzność regulacji ekspresji genów przez czynniki transkrypcyjne z podrodziny GRH odpowiadają: (1) zależność od tkanki i etapu rozwoju profile ekspresji tych czynników, (2) ich współdziałanie z innymi czynnikami ulegającymi selektywnej ekspresji w tkance danego typu, (3) zmiany w strukturze chromatyny w obszarach regulowanych genów, (4) specyficzność sekwencji DNA, do której czynniki te się wiążą (sekwencja konsensusowa DNA, do której wiążą się czynniki transkrypcyjne z podrodziny GRH, to 5'-AACCGGTT-3' [12,23,27-29]) oraz (5) powstawanie w wyniku różnicowego składania mRNA specyficznych, zróżnicowanych pod względem aktywności izoform [24,26,30-32]. Dla przykładu, w przypadku ortologów białek człowieka z podrodziny GRH: GRHL1 występuje w 2 izoformach [25], zaś białko GRHL3 w 3 izoformach [32]; u muszki owocowej GRH ma przynajmniej 4 izoformy [27].

ROLA CZYNNIKÓW Z PODRODZINY GRAINYHEAD W POWSTAWANIU POWŁOK CIAŁA ZWIERZĄT

Od momentu, gdy na Ziemi pojawiły się zwierzęta wielokomórkowe, najbardziej zewnętrzna warstwa komórek pełniła funkcję granicy pomiędzy środowiskiem wewnętrznym organizmu a otoczeniem. Niezależnie od architektury i składu molekularnego powłoki ciała (jednowarstwowy naskórek u prostych organizmów wielokomórkowych, pancerz chitynowy u owadów, kolagenowy oskórek u pierścienic, wielowarstwowy naskórek kręgowców), pełni ona funkcję ochronną przed infekcją patogenów. Dzięki swojej strukturze zapobiega również nadmiernej utracie wody z organizmu, zabezpiecza przed uszkodzeniami mechanicznymi i szkodliwym działaniem czynników fizykochemicznych,

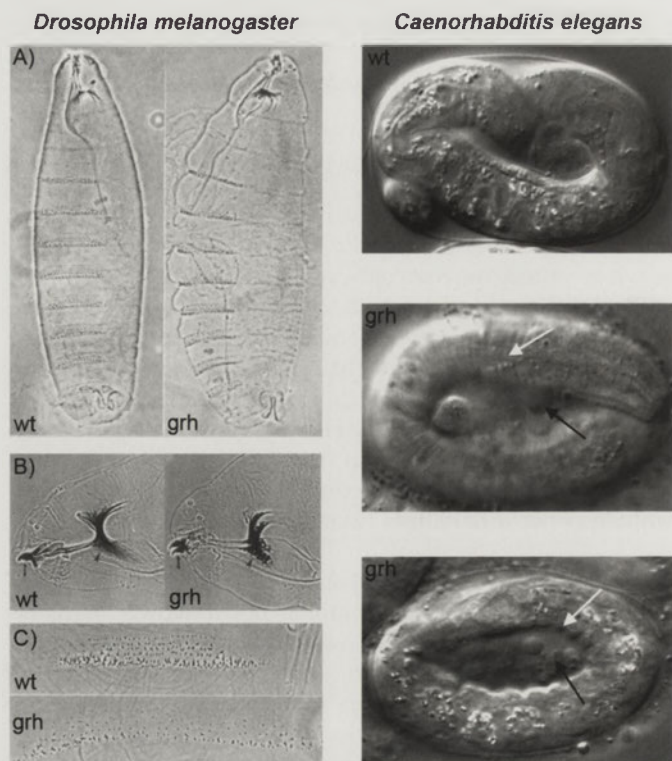
co pozwala na zachowanie homeostazy organizmu [33,34]. Do wytworzenia ochronnej i nieprzepuszczalnej powłoki, zarówno u bezkręgowców, jak i u kręgowców, niezbędne są czynniki transkrypcyjne z podrodziny GRH [35].

FUNKCJE BIAŁEK Z PODRODZINY GRAINYHEAD U BEZKRĘGOWCÓW

Funkcje białka GRH zostały najdokładniej zbadane u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*). GRH reguluje wiele procesów rozwojowych związanych z tkankami nabłonkowymi pochodzenia ektodermalnego, m.in. formowanie kutikuli, wydłużanie tchawek czy zamknięcie grzbietowe ciała embrionu [10,21]. W wyniku różnicowego składania pre-mRNA powstają transkrypty kodujące różne izoformy, między innymi GRH-N syntetyzowany w ośrodkowym układzie nerwowym oraz GRH-O syntetyzowany w epidermie, nabłonku przedniej i tylnej części jelita pierwotnego oraz w nabłonku tworzącym system tchawek [9].

Powłoka ciała owadów (pancerz) składa się z komórek nabłonkowych leżących na błonie podstawowej (*membrana basalis*) oraz jego tworów, oskórka (*cuticula*) złożonego z oskórka powierzchniowego (*epicuticula*), zewnętrznego (*exocuticula*) i wewnętrznego (*endocuticula*) [36]. Oskórek zawiera chitynę, lipidy i usieciowane białka, które razem tworzą warstwę twardej, nieprzepuszczalnej macierzy zewnątrzkomórkowej, pełniącej funkcję szkieletową i ochronną. Oskórek pokrywa całe ciało, wyściela także fragmenty jelita, tchawki i część układu rozrodczego [36]. Enzymami niezbędnymi do ztwardnienia kutikuli są dekarboksylaza L-DOPA i hydroksylaza tyrozynowa, kodowane odpowiednio przez geny *Ddc* i *ple*. Oba białka katalizują kolejne reakcje przekształcenia tyrozyny w chinony, które następnie łączą się kowalencyjnie z bocznymi resztami aminowymi histydyn, co prowadzi do kowalencyjnego wiązania białek i ztwardnienia kutikuli [36]. Poziom ekspresji jednego z tych genów, tj. *Ddc*, jest bezpośrednio regulowany przez czynnik transkrypcyjny GRH [37]. Ponadto przypuszcza się, że GRH reguluje ekspresję genu syntazy chityny *DmCHS1*, gdyż w pierwszym intronie tego genu, odpowiedzialnym za regulację procesu wytwarzania chityny podczas rozwoju, zlokalizowano sześć sekwencji DNA, do których może wiązać się ten czynnik transkrypcyjny [38]. Wiadomo natomiast, że GRH bezpośrednio reguluje ekspresję genów: *fasciclin 3* (*Fas3*) oraz *coracle* (*Cora*), kodujących białka, które są komponentami połączeń ścisłych w epidermie, odpowiadających za szczelność powłoki okrywającej ciało muszki owocowej [39].

Inaktywacja obu alleli genu *grh* jest letalna dla *Drosophila melanogaster* na etapie embriogenezy, muszki o genotypie *grh^{-/-}* nie przeżywają wykluwania się z jaj. Embryony są nieprawidłowo ukształtowane, mimo prawidłowej segmentacji, a ich kutikula jest cienka, nabrzmiąta i łatwo ulega uszkodzeniu (tzw. fenotyp „blimp”) [37]. Charakterystycznym zaburzeniem rozwojowym larw jest granularna i nieciągła struktura puszki głowowej (stąd nazwa genu: *grainyhead*) oraz słabo rozwinięty aparat gębowy (Ryc. 3). Ponadto, stwierdzono przerost drzewa tchawkowego (będącego tworem epidermy) pod względem długości i ilości odnóg oraz zaobserwowano, że rurki tchawkowe są pofał-



Rycina 3. Fenotyp larw *Drosophila melanogaster* oraz *Caenorhabditis elegans* wjętych z otoczki witelinowej. *Drosophila melanogaster*: obraz z mikroskopu kontrastowo-fazowego larw z nieaktywnym białkiem GRH ($grh^{-/-}$) oraz typu dzikiego (wt). (A) boczny widok na ciała larw, kutikula w embrionach mutantów ($grh^{-/-}$) jest pękata i rozdęta w porównaniu do larw typu dzikiego (wt) (B) puszcza głowowa: szkielet głowy larw $grh^{-/-}$ ma nietypową, granularną strukturę; przednią część głowy wskazują groty strzałek; mniejsze strzałki wskazują haki gębowe, które u larw $grh^{-/-}$ są mniejsze niż u larw wt. (C) ząbki znajdujące się na powierzchni ciała larwy grh są mniejsze i nieuporządkowane. *Caenorhabditis elegans*: trójwymiarowy obraz uzyskany za pomocą mikroskopu z kontrastem interferencyjnym Nomarskiego. Wt – larwa nicienia typu dzikiego, grh – larwy nicieni z wyciszonym za pomocą RNAi genem *Ce-grh-1*; u mutantów grh otoczka nabłonkowa jest nieprawidłowo pofalowana (biała strzałka), a z wnętrza ciała wystają skupiska komórek (czarna strzałka). Opracowano na podstawie [11, 25] i wykorzystano za zgodą autorów i wydawcy, zmodyfikowane.

dowane. Fenotyp ten jest związany z zaburzeniem prawidłowego formowania się szczytowej powierzchni komórek podczas wzrostu tchawek, regulowanego przez szlak przekazywania sygnału zapoczątkowany przez receptor Breathless aktywowany przez Branchless (białko z rodziny FGF). Czynn timeranskrypcyjny GRH pełni funkcję negatywnego regulatora przekazywania sygnału w tym szlaku, w sposób zależny od kinazy ERK, prowadząc do kontrolowanego zahamowania wzrostu tchawek [40,41]. Stąd, u mutantów muszki pozbawionych białka GRH wzrost tchawek wydaje się nadmierny i niekontrolowany.

Zaburzenia w rozwoju nabłonka okrywającego zaobserwowano również u nicieni *Caenorhabditis elegans* pozbawionych funkcjonalnego białka *Ce-GRH-1*, będącego ortologiem GRH. Wyciszenie genu kodującego to białko za pomocą RNAi prowadzi do letalnego fenotypu, podobnie jak u muszki owocowej, nieprawidłowo uformowany oskórek uniemożliwia poruszanie się i wyklucie. U ok. 8% embrionów nicieni z wyciszonym genem *Ce-grh-1* zaobserwowano w nabłonku okrywającym pęknięcia oraz wystające z nich skupiska komórek (Ryc. 3) [23].

U ssaków najbardziej zewnętrzną powłokę okrywającą ciało organizmu stanowi wielowarstwowy naskórek i jego tworzą (m.in. włosy, paznokcie oraz gruczoły: łojowe i potowe). Wywodzi się on z ektodermy, zewnętrznego listka zarodkowego, powstającego na etapie gastrulacji. W rozwoju płodowym myszy bariera epidermalna pojawia się ok. 16,5 dnia rozwoju embrionalnego (E) w części grzbietowej i fałowo rozbudowuje się w kierunku brzusznej, aż do dnia E18,5 [42].

Z procesem morfogenezy nabłonka okrywającego oraz z utrzymaniem prawidłowej struktury i funkcji bariery epidermalnej związane są ssacze czynn timeranskrypcyjne z podrodziny GRHL (ang. *Grainyhead-like*), tj. GRHL1, GRHL2 i GRHL3. Ich ekspresja u myszy pojawia się w ektodermie w dniach E8,5-E10,5 i utrzymuje się przez całe życie zwierzęcia [43]. Powstawanie bariery skórnej to proces bardzo złożony, o czym świadczą defekty u mutantów zwierząt doświadczalnych. Mutacje u tych organizmów występują m.in. w genach kodujących białka odpowiedzialne za strukturę nabłonka (enzymy uczestniczące w biosyntezie lipidów oraz kowalencyjnym wiązaniu białek i lipidów, białka wchodzące w skład kompleksów połączeń międzykomórkowych) oraz czynn timeranskrypcyjne charakterystyczne dla tej tkanki [44-46]. U myszy z mutacjami w genach *Grhl* również dochodzi do zaburzeń w powstawaniu bariery skórnej. Funkcja GRHL3 w tym procesie (ale również w procesie gojenia się ran, patrz dalej) jest związana z bezpośrednią kontrolą ekspresji genu transglutaminazy I (*Tgm1*) [19,47]. Enzym ten katalizuje reakcję kowalencyjnego wiązania białek w macierzy zewnątrzkomórkowej zrogowaciałej warstwy naskórka, analogicznie jak DDC katalizuje sieciowanie białek w kutikuli u muszki owocowej. U myszy pozbawionych funkcjonalnego genu *Grhl3* ($Grhl3^{-/-}$) poziom transglutaminazy I, jak również białek wchodzących w skład połączeń międzykomórkowych, okludyny i kładyny, jest obniżony [19,47]. W tworzącym się u mutantów $Grhl3^{-/-}$ naskórku zaobserwowano morfologiczne zmiany, tj. nadmierną proliferację keratynocytów oraz zaburzenia procesu ich różnicowania w korneocyty. W warstwie zrogowaciałej nie dochodzi do utworzenia szczelnej, hydrofobowej bariery, noworodki rodzą się, lecz umierają z powodu odwodnienia od razu po urodzeniu [19]. Co ciekawe, czynnik transkrypcyjny GRHL3 pełni istotną funkcję w powstawaniu i utrzymaniu funkcjonalności innego nabłonka tj., ulega on ekspresji na wysokim poziomie w różnicujących się komórkach baldaszkowatych nabłonka wyścielającego światło pęcherza moczowego, gdzie bezpośrednio reguluje poziom syntezy uroplakiny II [30].

Z prawidłowym funkcjonowaniem bariery skórnej związany jest również czynnik transkrypcyjny GRHL1. Mutacja *Grhl1^Δ* nie jest letalna dla myszy, ale powoduje rogowacenie podszewy łapek (PPK, palmoplantar keratoderma) oraz szybką utratę włosów, spowodowaną słabym zakotwiczeniem trzonów włosów w cebulkach. Cechy te związane są z zaburzeniem ekspresji genu desmogleiny 1 (*Dsg1*), bezpośrednio regulowanego przez czynnik transkrypcyjny GRHL1 [48]. Desmogleina 1 jest komponentem desmosomów i u myszy *Grhl1^Δ* jej poziom jest obniżony o około

70%. Z tego powodu desmosomy są krótsze, a ich struktura zaburzona, co prowadzi do powstawania opisanego powyżej fenotypu [48].

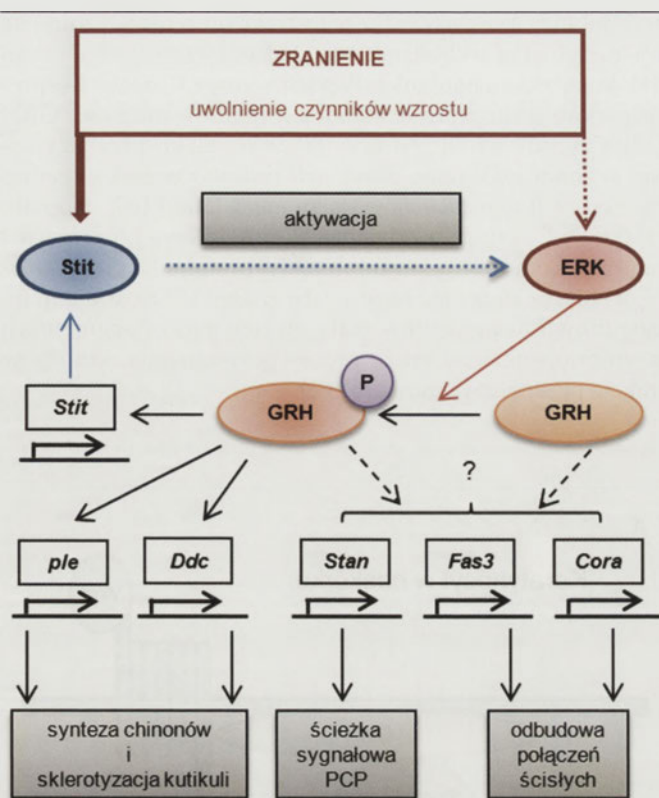
U embrionów myszy *Grhl2*^{-/-} dochodzi natomiast do wielu defektów związanych z nieprawidłowym łączeniem się tkanek, m.in. wady cewy nerwowej (WCN) w obrębie czaszki (bezczaszkowie i rozszczep twarzy), defekty zamknięcia powłok brzusznych oraz rozszczep nerwu wzrokowego. Ponadto, wykazują one wady serca i płuc, syndaktylię oraz molekularne zmiany w naskórku i mieszkach włosowych [49]. Do ich śmierci dochodzi około dnia E11,5 [50]. Badania *in vivo*, jak i *in vitro*, pozwoliły wykazać, że czynnik transkrypcyjny GRHL2 (oraz prawdopodobnie GRHL3) reguluje ekspresję genów kodujących białka wchodzące w skład połączeń międzykomórkowych, tj. E-kadheriney oraz kładyny 4 [51]. Z kolei, u myszy *Axd* ze zwiększonym poziomem ekspresji *Grhl2* występuje, oprócz wad cewy nerwowej, syndrom otwartej powieki [52].

U płazów zaburzenia w ekspresji ortologów GRH prowadzą, podobnie jak w przypadku muszki owocowej i myszy, do zaburzeń w rozwoju powłoki ciała. Kluczowym szlakiem przekazywania sygnałów w rozwoju epidermy u płazów jest szlak związany z BMP4 (białkiem należącym do rodziny TGFβ). Badania pokazały, że w skórze żaby szlak ten reguluje również ekspresję genów *XGrhl1* oraz *XGrhl3*. Czynniki transkrypcyjne XGRHL1 oraz XGRHL3 regulują następnie ekspresję genu keratyny 8 (*XK81A1*) [53,54]. Z kolei w modelu rybit (*Danio rerio*) gen *grhl1* ulega ekspresji w perydermie oraz w komórkach progenitorowych jonocytów epidermalnych. Kodowany przez niego czynnik transkrypcyjny pełni funkcję represora własnej transkrypcji podczas różnicowania jonocytów. W przeciwieństwie do innych kręgowców, nie jest on niezbędny dla prawidłowego rozwoju powłoki ciała ryb [55].

UDZIAŁ CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH GRH W PROCESIE GOJENIA SIĘ RAN

Czynniki transkrypcyjne z podrodziny Grainyhead, poza udziałem w procesie rozwoju powłok nabłonkowych kręgowców i bezkręgowców, odgrywają ważną rolę w procesie gojenia się ran. Utrzymanie ciągłości powłoki okrywającej, stanowiącej barierę między środowiskiem wewnętrznym a otoczeniem, jest kluczowe dla zachowania homeostazy i prawidłowego funkcjonowania organizmów. Mechanizmy gojenia się ran są ewolucyjnie stare, stąd istnieje wiele podobieństw w tych procesach u tak odległych ewolucyjnie i morfologicznie organizmów jak ssaki i owady. Po pierwsze, powstaje czop sklejaący brzegi rany, który zapobiega wypływowi płynów ustrojowych oraz uniemożliwia wnikanie do wnętrza ciała obcych organizmów, bakterii, wirusów i pasożytów. Po drugie, napływające do rany komórki układu odpornościowego oczyszczają ranę z patogenów i uszkodzonych tkanek. Po trzecie, podczas gojenia się ran dochodzi do lokalnej reorganizacji architektury uszkodzonej tkanki w celu odtworzenia jej prawidłowej struktury.

Nieco inaczej przebiega proces gojenia się ran u ssaków w okresie płodowym. W środowisku aseptycznym, jakie panuje podczas rozwoju embrionalnego ssaków w owodni,



Rycina 4. Drogi przekazywania sygnałów w procesie gojenia się ran u muszki owocowej. Wyjaśnienia w tekście. Opracowano na podstawie informacji zawartych w [58,59].

tworzenie czopu i aktywacja komórek układu odpornościowego nie występują. Pod błoną komórkową, w części szczytowej komórek znajdujących się na brzegu rany, tworzy się aktywno-miozyny pierścień, który zacieśniając się powoduje wspólną migrację komórek nabłonka z brzegów rany do jej środka.

FUNKCJE CZYNNIKA GRH W PROCESIE GOJENIA SIĘ RAN U MUSZKI OWOCOWEJ

W procesie gojenia się ran u muszki owocowej *Drosophila melanogaster* w komórkach nabłonka wokół rany tworzy się pierścień aktywno-miozyny (podobnie jak u ssaków w okresie płodowym). Za jego powstanie odpowiedzialne są sygnały w szlaku kinazy MAP [56]. Szlak ten jest aktywowany po uszkodzeniu oskórka przez sygnały pobudzające receptor wykazujący aktywność kinazy tyrozynowej z rodziny Ret, kodowany przez gen *stit* (*stitcher*). Dodatkowo zaobserwowano aktywację kinazy ERK, która m.in. prowadzi do fosforylacji reszty Ser91 w białku GRH [57]. Fosforylacja ta jest specyficzna tylko dla procesu gojenia się ran, nie ma natomiast znaczenia dla rozwoju embrionalnego (Ryc. 4). Dopiero tak zmodyfikowane białko GRH bezpośrednio (i we współpracy z innym czynnikiem, tj. AP-1) aktywuje ekspresję *Ddc* i *ple*, genów kodujących enzymy konieczne do odbudowy architektury naskórka owada [38,58], oraz genu *stit*, tworząc sprzężenie zwrotne w regulacji procesu gojenia się ran [57]. U mutantów muszki owocowej *grh*^{-/-} proces gojenia się ran jest zaburzony, gdyż nie dochodzi do zależnego od zranienia wzrostu ekspresji genów *Ddc* i *ple* [59]. Zaburzone jest także powstawanie włóknistego czopu tworzącego się chwilę po zranieniu [58]. Dla procesu odbudowy

architektury powłoki ciała u muszki owocowej istotne są również białka wchodzące w skład połączeń ścisłych między komórkami nabłonka, Fasciclin 3 oraz Coracle. Ekspresja genów kodujących te białka jest regulowana przez GRH [39]. Czynniki te uczestniczą także w szlaku przekazywania sygnału PCP (ang. *planar cell polarity*) poprzez regulację ekspresji genu *flamingo/starry night* (*Stan*) [60]. Sygnały szlaku PCP są odpowiedzialne za prawidłową polaryzację i migrację komórek, w tym architekturę nabłonka produkującego chitynę oraz jego tworów. Sygnały PCP regulują m.in. biegunowość segmentów ciała owada, proces segmentacji w embriogenezie, a także proces powstawania odnóży w trakcie przepoczwarzania [61,62].

FUNKCJE CZYNNIKÓW GRHL W PROCESIE GOJENIA SIĘ RAN U KRĘGOWCÓW NA PRZYKŁADZIE SSAKÓW

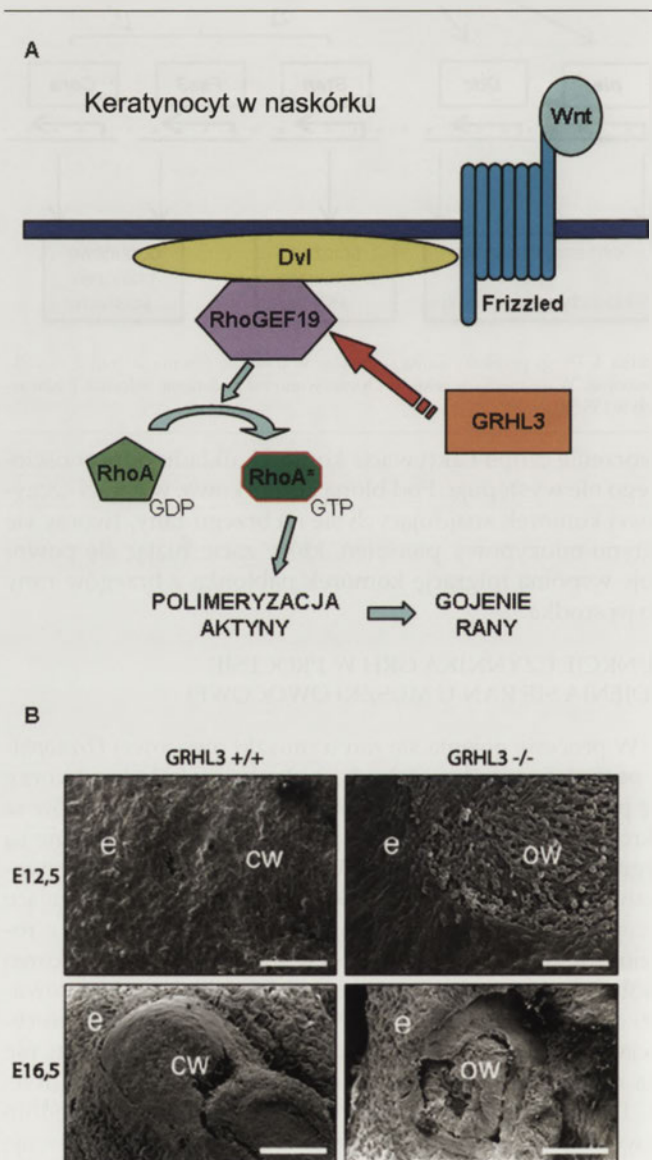
Spośród ssaczych czynników z podrodziny Grainyhead, ulegających ekspresji w naskórku, z procesem gojenia się ran związany jest GRHL3 [19]. Gojenie się ran u myszy pozbawionych genu *Grhl1* (*Grhl1^{-/-}*) nie jest zaburzone [48]. Z kolei myszy *Grhl2^{-/-}* umierają w dniu E11,5 po zapłodnieniu i nie dożywają etapu rozwoju naskórka [42,50].

Badania nad procesem gojenia się ran wykazały, że istnieje analogia między udziałem białek z podrodziny Grainyhead w procesie gojenia się ran u myszy i u muszki owocowej. Po pierwsze, zaobserwowano w komórkach na brzegach rany zależny od GRHL3 wzrost ekspresji genu kodującego enzym sieciujący białka w naskórku (*Tgm1*). Obecność tego enzymu (podobnie jak obecność enzymów DDC i PLE u muszki) jest niezbędna do odtworzenia struktury bariery skórnej po zasklepieniu się rany, a jego brak, jak również brak czynnika GRHL3, powoduje, że rany nie goją się (Ryc. 5B) [19]. Po drugie, GRHL3 wydaje się funkcjonować w szlaku, w którym TGF α prowadzi do aktywacji kinazy MAP i w następstwie do pobudzenia keratynocytów, tj. zmiany ich kształtu, wytworzenia filopodiów i utworzenia pierścienia aktyno-miozynowego w linii brzegowej migrujących komórek [63]. Możliwe, że GRHL3 jest pośrednio związany z fosforylacją kinazy ERK1/2 [64] lub jest białkiem ulegającym fosforylacji przez tę kinazę [63], podobnie jak ma to miejsce w przypadku gojenia się ran u muszki owocowej [56].

U myszy pozbawionych genu *Grhl3* (*Grhl3^{-/-}*) zaobserwowano zaburzenia w przebiegu wielu procesów embrionalnych wymagających skoordynowanego ruchu komórek, występuje również nieprawidłowe zamykanie cewy nerwowej [65,66] czy syndrom otwartej powieki EOB (ang. *Eyes Open at Birth*), na który ma wpływ tło genetyczne i/lub równoczesna delecja LMO4, białkowego partnera dla GRHL3 [47,64]. Fenotyp ten spowodowany jest prawdopodobnie zaburzeniem regulacji ścieżki sygnałowej TGF α /EGFR/ERK (podobnie jak w przypadku procesu gojenia się ran) i procesu polimeryzacji aktyny oraz formowania filopodiów w keratynocytach linii brzegowej rozwijającej się powieki [67-69]. Po trzecie, wykazano funkcję czynnika GRHL3 w szlaku przekazywania sygnału PCP [70]. Szlak PCP u ssaków, podobnie jak u owadów, reguluje wiele komórkowych i rozwojowych procesów, które wymagają polaryzacji komórek w płaszczyźnie oraz skoordynowanego i ukierunkowanego ruchu [70]. GRHL3 aktywuje w keratynocytach syntezę RhoGEF19, regulatora jednego z białek szlaku PCP, RhoA (Ryc. 5A). Ta mała GTPaza jest niezbędna do reorganizacji cytoszkieletu aktynowego podczas migracji komórek nabłonkowych. Brak GRHL3 lub RhoGEF19 powoduje nieprawidłową polimeryzację aktyny oraz zaburzenia w polaryzacji komórek [71]. Ponadto wykazano, że w procesie gojenia się ran u myszy gen *Grhl3* genetycznie oddziałuje z innym genem szlaku PCP, *Vangl2* (homolog genu *Vang/Stbm* u muszki owocowej) [70].

GENY Z PODRODZINY GRAINYHEAD A NOWOTWORY

Gen *GRHL3* jest zlokalizowany u człowieka na chromosomie 1p36.11 (www.ensembl.org). Delecja obszaru 1p36



Rycina 5. Gojenie się ran u myszy. (A) Schemat funkcjonowania czynnika transkrypcyjnego GRHL3 w szlaku przekazywania sygnału PCP. GRHL3 reguluje ekspresję genu aktywatora małej GTPazy RhoA (RhoGEF19). (B) Obraz w mikroskopie elektronowym gojących się ran myszy *Grhl3^{-/-}* w porównaniu do myszy typu dzikiego (*Grhl3^{+/+}*) w dniach E12,5 oraz E16,5 (e – epiderma; OW – ang. *open wound*, otwarta rana; CW – ang. *closed wound*, zagojona rana). Opracowano na podstawie informacji zawartych w [19,70]; zdjęcie zamieszczone za zgodą autorów i wydawcy.

prowadzi do specyficznego syndromu charakteryzującego się niedorozwojem umysłowym, bez występowania wad cewy nerwowej [72]. Proksymalna delecja obszaru 1p36 jest zjawiskiem bardzo rzadkim, a pacjenci pozbawieni obu alleli genu *GRHL3* nie zostali jak dotąd zidentyfikowani, zatem skutki zredukowanej ekspresji tego genu u ludzi nie są znane [73]. Wiadomo jednak, że w genomowym regionie 1p36 często zachodzą rearanżacje specyficzne dla nowotworów, co wskazuje na obecność genów w tym regionie, które są ważne dla rozwoju i progresji nowotworów. Nowotwory charakteryzujące się wysokim stopniem utraty ramienia 1p u heterozygot, to m.in. glejak (*oligodendroglioma*), nowotwór pęcherzyka żółciowego, nerwiak (*neuroblastoma*) i struniak (*chordoma*) [74,75]. Badania na komórkach raka kolczystokomórkowego u myszy i ludzi pokazały, że *GRHL3* funkcjonuje jako supresor nowotworzenia poprzez bezpośrednią regulację ekspresji genu kodującego białko PTEN [76].

Czynnik transkrypcyjny *GRHL3* może mieć związek z procesami naciekania i przerzutowania nowotworów zależnymi od prozapalnego czynnika TNF α . Cytokina ta, wzmagając ekspresję *Grhl3*, prowadzi do silnej stymulacji migracji komórek śródbłonna *in vitro* [77]. Proces angiogenezy warunkuje progresję i agresywność nowotworów *in vivo* [78].

GRHL2 wykazuje aktywność onkogeną, gdyż pozytywnie reguluje proliferację niektórych komórek nowotworowych i hamuje apoptozę. Gen *GRHL2* zlokalizowano w okolicach regionu 8q22, wysoce amplifikowanego w wielu nowotworach człowieka. Badania wykazały, że czynnik transkrypcyjny *GRHL2* może funkcjonować jako represor apoptozy zależnej od sygnałów zewnątrzkomórkowych poprzez hamowanie ekspresji genów kodujących receptory śmierci (FAS, DR5) [79]. Apoptoza jest zaprogramowanym mechanizmem komórkowym, który pozwala organizmowi wielokomórkowemu na utrzymanie integralnej struktury tkanek oraz ich funkcji poprzez eliminowanie komórek uszkodzonych lub zbędnych. Przypuszcza się, że komórki nowotworowe tracą zdolność do apoptozy zależnej od FASL w wyniku nadekspresji m.in. genu *GRHL2*, która prowadzi do obniżenia poziomu receptorów śmierci. Badania wykazały również, że w komórkach raka wątroby HCC (*hepatocellular carcinoma*) podwyższony poziom ekspresji genu *GRHL2* przyczynia się do wczesnego nawrotu raka (remisja 1-3 lata po leczeniu). Podwyższenie poziomu jest na tyle duże i powtarzalne, że białko *GRHL2* stało się kandydatem na marker choroby nowotworowej wątroby. Wyciszenie ekspresji genu *GRHL2* prowadzi do zahamowania wzrostu komórek HCC, co sugeruje, że czynnik transkrypcyjny *GRHL2* ma znaczenie w procesie proliferacji komórek [80]. Czynnik ten jest również związany z procesem uniesmiertelniania keratynocytów podczas transformacji nowotworowej, prowadzącej do powstania raka kolczystokomórkowego jamy ustnej (OSCC, ang. *oral squamous cell carcinoma*). W nowotworach tego typu zaobserwowano podwyższony poziom syntezy białkowej podjednostki telomerazy, hTERT [31]. Badania prowadzone na linii normalnych keratynocytów człowieka (NHK) pokazały, że *GRHL2* hamuje metylację wysepek CpG m.in. w promotorze genu *hTERT*, przez co pozytywnie reguluje jego transkrypcję. Podwyższenie ekspresji *GRHL2* w keratynocytach prowadzi do podwyższonego poziomu telomerazy i przez to do nadmiernej pro-

lifracji tych komórek oraz zahamowania ich różnicowania [81]. Niekontrolowana proliferacja i zahamowane różnicowanie komórek jest jedną z oznak nowotworzenia [82]. Co ciekawe, nadmierną proliferację oraz zaburzony proces różnicowania keratynocytów zaobserwowano również u myszy *Grhl3^{-/-}* [19].

Przypuszcza się również, że *GRHL2* jest genem supresorowym, bowiem mutacje inaktywujące w tym genie mają związek z migracją komórek nowotworowych poprzez obniżenie poziomu syntezy E-kadheryny. E-kadheryna jest jednym z białek tworzących połączenia przylegające (ang. *adherens junctions*) między komórkami. Białko to jest kluczowym supresorem ruchów komórek, w tym również naciekania i przerzutowania nowotworów, gdyż utrudnia odrywanie się komórek nowotworowych i ich migrację [83,84]. Obecnie wiadomo, że czynnik transkrypcyjny *GRHL2* bezpośrednio reguluje poziom syntezy E-kadheryny u myszy [51], nie zostało to zbadane u ludzi.

GENY Z PODRODZINY GRAINYHEAD A CHOROBY CZŁOWIEKA

Zaburzenie aktywności czynników transkrypcyjnych, będących regulatorami ekspresji genów na różnych etapach rozwoju, może prowadzić do zaburzenia homeostazy organizmu i do stanu chorobowego, czy nawet śmierci. W przypadku czynników tkankowo-specyficznych zaburzenia te mogą dotyczyć jednej tkanki lub organu, a powikłania mogą wpływać na funkcjonowanie całego organizmu. Wyniki wielu badań wykazały, że zaburzenia w syntezy czy funkcjonowaniu białek z podrodziny Grainyhead mogą być powiązane z wieloma chorobami. U ludzi mutacje w genie *GRHL2* są związane z uszkodzeniami słuchu. Zmiana ramki odczytu prowadząca do pojawienia się przedwczesnego kodonu „stop” jest odpowiedzialna za autosomalną dominującą formę progresywnej utraty słuchu [85]. Niezależne badania asocjacyjne u pacjentów z utratą słuchu zależną od wieku również wskazują na związek z *GRHL2* [86]. Biorąc pod uwagę, że *Grhl2* i *Grhl3* są związane z WCN u myszy, interesujące byłoby zbadanie ich znaczenia dla WCN u ludzi, gdyż relatywnie mało wiadomo o genetycznych czynnikach ryzyka występowania wad cewy nerwowej.

PODSUMOWANIE

Czynniki transkrypcyjne z rodziny Grainyhead są starą ewolucyjnie grupą regulatorów transkrypcji, które pojawiły się już u jednokomórkowych organizmów eukariotycznych. Prawdopodobnie miały one duży wpływ na powstanie i wyspecjalizowanie się nabłonka okrywającego u wielokomórkowców. Poprzez regulację transkrypcji odpowiednich genów czynniki GRHL wpływają na prawidłowe powstawanie ektodermy podczas embriogenezy oraz wywodzących się z niej struktur, takich jak kutikula i tchawki u muszki owocowej czy naskórek, cewa nerwowa, płuca i mieszki włosowe u myszy. Zaburzenia w ekspresji genów *Grhl* lub w aktywności kodowanych przez nie czynników prowadzą, zarówno u zwierząt laboratoryjnych, jak i u ludzi, do poważnych chorób – występują problemy z gojeniem się ran, wady cewy nerwowej czy rogowacenie podeszwy dłoni i

stóp. Istnieją również dowody na związek zaburzenia poziomu ekspresji genów *GRHL* z procesem nowotworzenia.

Geny z rodziny Grainyhead zostały zidentyfikowane stonkowo niedawno więc prace badawcze nad udziału czynników *GRHL* w różnych szlakach sygnałowych oraz nad ich znaczeniem dla prawidłowego funkcjonowania organizmu są obecnie na etapie realizacji. Mają one charakter zarówno poznawczy, jak i praktyczny, bowiem opracowanie w przyszłości skutecznej farmakoterapii chorób związanych z zaburzeniami funkcjonowania białek z rodziny Grainyhead może się opierać na zdobyciu wiedzy dotyczącej udziału tych białek w szlakach przekazywania sygnału w komórce.

PIŚMIENNICTWO

1. Chen JL, Attardi LD, Verrijzer CP, Yokomori K, Tjian R (1994) Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell* 79: 93-105
2. Tuckfield A, Clouston DR, Wilanowski TM, Zhao LL, Cunningham JM, Jane SM (2002) Binding of the RING polycomb proteins to specific target genes in complex with the grainyhead-like family of developmental transcription factors. *Mol Cell Biol* 22: 1936-1946
3. Traylor-Knowles N, Hansen U, Dubuc TQ, Martindale MQ, Kaufman L, Finnerty JR (2010) The evolutionary diversification of LSF and Grainyhead transcription factors preceded the radiation of basal animal lineages. *BMC Evol Biol* 10: 101
4. Sebe-Pedros A, de Mendoza A, Lang BF, Degnan BM, Ruiz-Trillo I (2011) Unexpected Repertoire of Metazoan Transcription Factors in the Unicellular Holozoan *Capsaspora owczarzaki*. *Mol Biol Evol* 28: 1241-1254
5. Lynch M, Force A (2000) The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154: 459-473
6. Rastogi S, Liberles DA (2005) Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. *BMC Evol Biol* 5: 28
7. Qian W, Liao BY, Chang AY, Zhang J (2010) Maintenance of duplicate genes and their functional redundancy by reduced expression. *Trends Genet* 26: 425-430
8. Edger PP, Pires JC (2009) Gene and genome duplications: the impact of dosage-sensitivity on the fate of nuclear genes. *Chromosome Res* 17: 699-717
9. Bray SJ, Burke B, Brown NH, Hirsh J (1989) Embryonic expression pattern of a family of *Drosophila* proteins that interact with a central nervous system regulatory element. *Genes Dev* 3: 1130-1145
10. Bray SJ, Kafatos FC (1991) Developmental function of *Elf-1*: an essential transcription factor during embryogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev* 5: 1672-1683
11. Dynlacht BD, Attardi LD, Admon A, Freeman M, Tjian R (1989) Functional analysis of NTF-1, a developmentally regulated *Drosophila* transcription factor that binds neuronal cis elements. *Genes Dev* 3: 1677-1688
12. Johnson WA, McCormick CA, Bray SJ, Hirsh J (1989) A neuron-specific enhancer of the *Drosophila* dopa decarboxylase gene. *Genes Dev* 3: 676-686
13. Nussleinvolhard C, Wieschaus E, Kluding H (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. 1. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux's Arch Dev Biol* 193: 267-282
14. Veljkovic J, Hansen U (2004) Lineage-specific and ubiquitous biological roles of the mammalian transcription factor LSF. *Gene* 343: 23-40
15. Jane SM, Nienhuis AW, Cunningham JM (1995) Hemoglobin switching in man and chicken is mediated by a heteromeric complex between the ubiquitous transcription factor CP2 and a developmentally specific protein. *EMBO J* 14: 97-105
16. Zhou W, Clouston DR, Wang X, Cerruti L, Cunningham JM, Jane SM (2000) Induction of human fetal globin gene expression by a novel erythroid factor, NF-E4. *Mol Cell Biol* 20: 7662-7672
17. Volker JL, Rameh LE, Zhu Q, DeCaprio J, Hansen U (1997) Mitogenic stimulation of resting T cells causes rapid phosphorylation of the transcription factor LSF and increased DNA-binding activity. *Genes Dev* 11: 1435-1446
18. Sueyoshi T, Kobayashi R, Nishio K, Aida K, Moore R, Wada T, Handa H, Negishi M (1995) A nuclear factor (NF2d9) that binds to the male-specific P450 (Cyp 2d-9) gene in mouse liver. *Mol Cell Biol* 15: 4158-4166
19. Ting SB, Caddy J, Hislop N, Wilanowski T, Auden A, Zhao LL, Ellis S, Kaur P, Uchida Y, Holleran WM, Elias PM, Cunningham JM, Jane SM (2005) A homolog of *Drosophila* grainy head is essential for epidermal integrity in mice. *Science* 308: 411-413
20. Kokoszynska K, Ostrowski J, Rychlewski L, Wyrwicz LS (2008) The fold recognition of CP2 transcription factors gives new insights into the function and evolution of tumor suppressor protein p53. *Cell Cycle* 7: 2907-2915
21. Attardi LD, Von Seggern D, Tjian R (1993) Ectopic expression of wild-type or a dominant-negative mutant of transcription factor NTF-1 disrupts normal *Drosophila* development. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10563-10567
22. Shirra MK, Hansen U (1998) LSF and NTF-1 share a conserved DNA recognition motif yet require different oligomerization states to form a stable protein-DNA complex. *J Biol Chem* 273: 19260-19268
23. Venkatesan K, McManus HR, Mello CC, Smith TF, Hansen U (2003) Functional conservation between members of an ancient duplicated transcription factor family, LSF/Grainyhead. *Nucleic Acids Res* 31: 4304-4316
24. Wilanowski T, Tuckfield A, Cerruti L, O'Connell S, Saint R, Parekh V, Tao J, Cunningham JM, Jane SM (2002) A highly conserved novel family of mammalian developmental transcription factors related to *Drosophila* grainyhead. *Mech Dev* 114: 37-50
25. Uv AE, Thompson CR, Bray SJ (1994) The *Drosophila* tissue-specific factor Grainyhead contains novel DNA-binding and dimerization domains which are conserved in the human protein CP2. *Mol Cell Biol* 14: 4020-4031
26. Wilanowski T, Tuckfield A, Cerruti L, O'Connell S, Saint R, Parekh V, Tao J, Cunningham JM, Jane SM (2002) A highly conserved novel family of mammalian developmental transcription factors related to *Drosophila* grainyhead. *Mech Dev* 114: 37-50
27. Uv AE, Harrison EJ, Bray SJ (1997) Tissue-specific splicing and functions of the *Drosophila* transcription factor Grainyhead. *Mol Cell Biol* 17: 6727-6735
28. Almeida MS, Bray SJ (2005) Regulation of post-embryonic neuroblasts by *Drosophila* Grainyhead. *Mech Dev* 122: 1282-1293
29. Wilanowski T, Caddy J, Ting SB, Hislop NR, Cerruti L, Auden A, Zhao LL, Asquith S, Ellis S, Sinclair R, Cunningham JM, Jane SM (2008) Perturbed desmosomal cadherin expression in grainy head-like 1-null mice. *EMBO J* 27: 886-897
30. Yu Z, Mannik J, Soto A, Lin KK, Andersen B (2009) The epidermal differentiation-associated Grainyhead gene *Get1/Grhl3* also regulates urothelial differentiation. *EMBO J* 28: 1890-1903
31. Kang X, Chen W, Kim RH, Kang MK, Park NH (2009) Regulation of the hTERT promoter activity by MSH2, the hnRNPs K and D, and GRHL2 in human oral squamous cell carcinoma cells. *Oncogene* 28: 565-574
32. Ting SB, Wilanowski T, Cerruti L, Zhao LL, Cunningham JM, Jane SM (2003) The identification and characterization of human Sister-of-Mammalian Grainyhead (SOM) expands the grainyhead-like family of developmental transcription factors. *Biochem J* 370: 953-962
33. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM (2008) The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17: 1063-1072
34. Segre JA (2006) Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest* 116: 1150-1158
35. Moussian B, Uv AE (2005) An ancient control of epithelial barrier formation and wound healing. *Bioessays* 27: 987-990
36. Moussian B (2010) Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 363-375

37. Ostrowski S, Dierick HA, Bejsovec A (2002) Genetic control of cuticle formation during embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 161: 171-182
38. Pearson JC, Juarez MT, Kim M, Drivenes O, McGinnis W (2009) Multiple transcription factor codes activate epidermal wound-response genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 2224-2229
39. Narasimha M, Uv A, Krejci A, Brown NH, Bray SJ (2008) Grainy head promotes expression of septate junction proteins and influences epithelial morphogenesis. *J Cell Sci* 121: 747-752
40. Hemphala J, Uv A, Cantera R, Bray S, Samakovlis C (2003) Grainy head controls apical membrane growth and tube elongation in response to Branchless/FGF signalling. *Development* 130: 249-258
41. Liaw GJ, Rudolph KM, Huang JD, Dubnicoff T, Courey AJ, Lengyel JA (1995) The torso response element binds GAGA and NTF-1/Elf-1, and regulates tailless by relief of repression. *Genes Dev* 9: 3163-3176
42. Hardman MJ, Sisi P, Banbury DN, Byrne C (1998) Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development* 125: 1541-1552
43. Auden A, Caddy J, Wilanowski T, Ting SB, Cunningham JM, Jane SM (2006) Spatial and temporal expression of the Grainyhead-like transcription factor family during murine development. *Gene Expr Patterns* 6: 964-970
44. Jane SM, Ting SB, Cunningham JM (2005) Epidermal impermeable barriers in mouse and fly. *Curr Opin Genet Dev* 15: 447-453
45. Madison KC (2003) Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol* 121: 231-241
46. Segre J (2003) Complex redundancy to build a simple epidermal permeability barrier. *Curr Opin Cell Biol* 15: 776-782
47. Yu Z, Lin KK, Bhandari A, Spencer JA, Xu X, Wang N, Lu Z, Gill GN, Roop DR, Wertz P, Andersen B (2006) The Grainyhead-like epithelial transactivator Get-1/Grhl3 regulates epidermal terminal differentiation and interacts functionally with LMO4. *Dev Biol* 299: 122-136
48. Wilanowski T, Caddy J, Ting SB, Hislop NR, Cerruti L, Auden A, Zhao LL, Asquith S, Ellis S, Sinclair R, Cunningham JM, Jane SM (2008) Perturbed desmosomal cadherin expression in grainy head-like 1-null mice. *EMBO J* 27: 886-897
49. Pyrgaki C, Liu A, Niswander L (2011) Grainyhead-like 2 regulates neural tube closure and adhesion molecule expression during neural fold fusion. *Dev Biol* 353: 38-49
50. Rifat Y, Parekh V, Wilanowski T, Hislop NR, Auden A, Ting SB, Cunningham JM, Jane SM (2010) Regional neural tube closure defined by the Grainy head-like transcription factors. *Dev Biol* 345: 237-245
51. Werth M, Walentin K, Aue A, Schonheit J, Wuebken A, Pode-Shakked N, Vilianovitch L, Erdmann B, Dekel B, Bader M, Barasch J, Rosenbauer F, Luft FC, Schmidt-Ott KM (2010) The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex. *Development* 137: 3835-3845
52. Brouns MR, De Castro SC, Terwindt-Rouwenhorst EA, Massa V, Hekking JW, Hirst CS, Savery D, Munts C, Partridge D, Lamers W, Kohler E, van Straaten HW, Copp AJ, Greene ND (2011) Over-expression of Grhl2 causes spina bifida in the Axial defects mutant mouse. *Hum Mol Genet* 20: 1536-1546
53. Tao J, Kuliyeve E, Wang X, Li X, Wilanowski T, Jane SM, Mead PE, Cunningham JM (2005) BMP4-dependent expression of *Xenopus* Grainyhead-like 1 is essential for epidermal differentiation. *Development* 132: 1021-1034
54. Chalmers AD, Lachani K, Shin Y, Sherwood V, Cho KW, Papalopulu N (2006) Grainyhead-like 3, a transcription factor identified in a microarray screen, promotes the specification of the superficial layer of the embryonic epidermis. *Mech Dev* 123: 702-718
55. Janicke M, Renisch B, Hammerschmidt M (2010) Zebrafish grainyhead-like1 is a common marker of different non-keratinocyte epidermal cell lineages, which segregate from each other in a Foxi3-dependent manner. *Int J Dev Biol* 54: 837-850.
56. Wang S, Tsarouhas V, Xylourgidis N, Sabri N, Tiklova K, Nautiyal N, Gallio M, Samakovlis C (2009) The tyrosine kinase Stitcher activates Grainy head and epidermal wound healing in *Drosophila*. *Nature Cell Biol* 11: 890-895
57. Kim M, McGinnis W (2011) Phosphorylation of Grainy head by ERK is essential for wound-dependent regeneration but not for development of an epidermal barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 650-655
58. Mace KA, Pearson JC, McGinnis W (2005) An epidermal barrier wound repair pathway in *Drosophila* is mediated by grainy head. *Science* 308: 381-385
59. Harden N (2005) Cell biology. Of grainy heads and broken skins. *Science* 308: 364-365.
60. Lee H, Adler PN (2004) The grainy head transcription factor is essential for the function of the frizzled pathway in the *Drosophila* wing. *Mech Dev* 121: 37-49
61. Nussleinvolhard C, Wieschaus E (1980) Mutations Affecting Segment Number and Polarity in *Drosophila*. *Nature* 287: 795-801
62. Wu J, Cohen SM (2002) Repression of Teashirt marks the initiation of wing development. *Development* 129: 2411-2418
63. Yu Z, Bhandari A, Mannik J, Pham T, Xu X, Andersen B (2008) Grainyhead-like factor Get1/Grhl3 regulates formation of the epidermal leading edge during eyelid closure. *Dev Biol* 319: 56-67
64. Hislop NR, Caddy J, Ting SB, Auden A, Vasudevan S, King SL, Lindeman GJ, Visvader JE, Cunningham JM, Jane SM (2008) Grhl3 and Lmo4 play coordinate roles in epidermal migration. *Dev Biol* 321: 263-272
65. Colas JF, Schoenwolf GC (2001) Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn* 221: 117-145
66. Ting SB, Wilanowski T, Auden A, Hall M, Voss AK, Thomas T, Parekh V, Cunningham JM, Jane SM (2003) Inositol- and folate-resistant neural tube defects in mice lacking the epithelial-specific factor Grhl-3. *Nat Med* 9: 1513-1519
67. Xia Y, Kao WW (2004) The signaling pathways in tissue morphogenesis: a lesson from mice with eye-open at birth phenotype. *Biochemical Pharmacology* 68: 997-1001
68. Xia Y, Karin M (2004) The control of cell motility and epithelial morphogenesis by Jun kinases. *Trends Cell Biol* 14: 94-101
69. Grose R (2003) Epithelial migration: open your eyes to c-Jun. *Curr Biol* 13: R678-680
70. Caddy J, Wilanowski T, Darido C, Dworkin S, Ting SB, Zhao Q, Rank G, Auden A, Srivastava S, Papenfuss TA, Murdoch JN, Humbert PO, Parekh V, Boulos N, Weber T, Zuo J, Cunningham JM, Jane SM (2010) Epidermal wound repair is regulated by the planar cell polarity signaling pathway. *Dev Cell* 19: 138-147
71. Darido C, Jane SM (2010) Grhl3 and GEF19 in the front rho. *Small Gtpases* 1: 104-107
72. Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FF, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer LG (1997) Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet* 61: 642-650
73. Kang SH, Scheffer A, Ou Z, Li J, Scaglia F, Belmont J, Lalani SR, Roeder E, Enciso V, Braddock S, Buchholz J, Vacha S, Chinault AC, Cheung SW, Bacino CA (2007) Identification of proximal 1p36 deletions using array-CGH: a possible new syndrome. *Clinical Genetics* 72: 329-338
74. Attiyeh EF, London WB, Mosse YP, Wang Q, Winter C, Khazi D, McGrady PW, Seeger RC, Look AT, Shimada H, Brodeur GM, Cohn SL, Matthay KK, Maris JM (2005) Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* 353: 2243-2253
75. Longoni M, Orzan F, Stroppi M, Boari N, Mortini P, Riva P (2008) Evaluation of 1p36 markers and clinical outcome in a skull base chordoma study. *Neuro Oncol* 10: 52-60
76. Darido C, Georgy SR, Wilanowski T, Dworkin S, Auden A, Zhao Q, Rank G, Srivastava S, Finlay MJ, Papenfuss AT, Pandolfi PP, Pearson RB, Jane SM (2011) Targeting of the tumor suppressor GRHL3 by a miR-21-dependent proto-oncogenic network results in PTEN loss and tumorigenesis. *Cancer Cell* 20: 635-648.
77. Guardiola-Serrano F, Haendeler J, Lukosz M, Sturm K, Melchner H, Altschmid J (2008) Gene trapping identifies a putative tumor sup-

- pressor and a new inducer of cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* 376: 748-752
78. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N (1987) Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor- α . *Nature* 329: 630-632
79. Dompe N, Rivers CS, Li L, Cordes S, Schwickart M, Punnoose EA, Amler L, Seshagiri S, Tang J, Modrusan Z, Davis DP (2011) A whole-genome RNAi screen identifies an 8q22 gene cluster that inhibits death receptor-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: E943-951
80. Tanaka Y, Kanai F, Tada M, Tateishi R, Sanada M, Nannya Y, Ohta M, Asaoka Y, Seto M, Shiina S, Yoshida H, Kawabe T, Yokosuka O, Ogawa S, Omata M (2008) Gain of GRHL2 is associated with early recurrence of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 49: 746-757
81. Chen W, Dong Q, Shin KH, Kim RH, Oh JE, Park NH, Kang MK (2010) Grainyhead-like 2 enhances the human telomerase reverse transcriptase gene expression by inhibiting DNA methylation at the 5'-CpG island in normal human keratinocytes. *J Biol Chem* 285: 40852-40863
82. Ridky TW, Khavari PA (2004) Pathways sufficient to induce epidermal carcinogenesis. *Cell Cycle* 3: 621-624
83. Halbleib JM, Nelson WJ (2006) Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* 20: 3199-3214
84. Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W (1989) Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 108: 2435-2447
85. Peters LM, Anderson DW, Griffith AJ, Grundfast KM, San Agustin TB, Madeo AC, Friedman TB, Morell RJ (2002) Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28. *Hum Mol Genet* 11: 2877-2885
86. Van Laer L, Van Eyken E, Franssen E, Huyghe JR, Topsakal V, Hendrickx JJ, Hannula S, Maki-Torkko E, Jensen M, Demeester K, Baur M, Bonaconsa A, Mazzoli M, Espeso A, Verbruggen K, Huyghe J, Huygen P, Kunst S, Manninen M, Konings A, Diaz-Lacava AN, Steffens M, Wienker TF, Pyrkko I, Cremers CW, Kremer H, Dhooze I, Stephens D, Orzan E, Pfister M, Bille M, Parving A, Sorri M, Van de Heyning PH, Van Camp G (2008) The grainyhead like 2 gene (GRHL2), alias TFCP2L3, is associated with age-related hearing impairment. *Hum Mol Genet* 17: 159-169

The role of LSF/Grainyhead transcription factors in development and function of epidermal barrier in animals

Agnieszka Kikulska, Michał Młacki, Tomasz Wilanowski✉

Laboratory of Signal Transduction, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, 3 Pasteur St. 02-093 Warsaw, Poland,

✉e-mail: t.wilanowski@nencki.gov.pl

Key words: LSF/Grainyhead family of transcription factors, epidermis, wound healing, signaling pathways

ABSTRACT

The LSF/Grainyhead family of transcription factors consists of proteins whose structure and functions have been preserved in the course of eukaryotic evolution - from primitive unicellular life forms to complex multicellular organisms. In the latter, these factors display tissue specificity and are active mainly in the covering epithelium. The roles of GRH factors are associated with regulation of expression of genes essential for correct differentiation and functioning of the epithelia of ectodermal origin. The *Grh* gene expression profiles are diverse and variable, especially during embryonic development. Research on the role of GRHL transcription factors is carried out on cellular and organismal level. In experimental animals, aberrant *Grh* gene expression leads to many diseases, including failure of epidermal wound healing and neural tube defects. Changes of these genes' expression levels are also linked to carcinogenesis. GRHL transcription factors participate in signaling pathways involved in cellular proliferation and apoptosis.

Szlaki kinaz białkowych MAP - ewolucja i rola w przebiegu wybranych chorób neurozwyrodnieniowych

STRESZCZENIE

Literatura naukowa obfituje w doniesienia dotyczące udziału kinaz białkowych MAP w wielu aspektach fizjologii poszczególnych organizmów. Niewiele jest natomiast prac, poświęconych ewolucji tych szlaków. W niniejszym artykule dokonano przeglądu literatury naukowej, opisującej jak w toku ewolucji zmieniały się szlaki przekazywania sygnałów komórkowych. Dlaczego fosforylacja reszt serynowych, treoninowych i tyrozynowych w białkach oraz kaskadowy system odwracalnej fosforylacji białek okazały się dla Eukaryota bardziej korzystne niż dwuskładnikowy system regulacyjny, oparty na fosforylacji reszt histydyliny i kwasu asparaginowego, jaki dominuje u bakterii? Jak według danych literaturowych powstały i ewoluowały szlaki kinaz białkowych MAP? W końcu, jak ważną rolę enzymy te odgrywają w prawidłowym funkcjonowaniu naszego organizmu? Zaburzenia w aktywności szlaków kinaz białkowych MAP prowadzą do niekontrolowanej proliferacji komórek i rozwoju m. in. chorób nowotworowych. W związku ze wzrostem średniej długości życia ludzi coraz częściej spotykamy się również z chorobami neurozwyrodnieniowymi, które prowadzą do demencji lub paralizu. W niniejszej pracy opisano obecny stan wiedzy o zaburzeniach tych szlaków w trzech chorobach: Alzheimerera, Parkinsona oraz w stwardnieniu zanikowym bocznym (ALS).

WPROWADZENIE

FOSFORYLACJA BIAŁEK JAKO MECHANIZM PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW KOMÓRKOWYCH U BAKTERII I EUCARYOTA

Każdy żywy organizm posiada system przekazywania sygnałów, umożliwiający właściwą reakcję na zmieniające się warunki otoczenia. Rodzaj tego systemu jest zdeterminowany przez takie czynniki jak: budowa komórek, metabolizm oraz środowisko życia. Komórki bakteryjne nie mają przedziałów komórkowych, a ich materiał genetyczny znajduje się w cytoplazmie. Z kolei komórki eukariotyczne, mające wiele przedziałów, takich jak: jądro komórkowe, siateczka śródplazmatyczna, mitochondria, aparat Golgiego, potrzebują rozbudowanego systemu przekazywania sygnałów, który zapewni im należyłą koordynację metabolizmu w całej komórce. Jak wiadomo, w komórkach bakteryjnych dominują tzw. dwuskładnikowe systemy regulacyjne (TCS, ang. *two-component systems*). W skład takiego systemu wchodzi kinaza histydylowa, która jest enzymem wielofunkcyjnym. Posiada bowiem domenę receptorową, odbierającą dany sygnał oraz wykazuje aktywność kinazy i fosfatazy [1]. Po zadziałaniu odpowiedniego bodźca ulega ona autofosforylacji w reszcie histydylowej, korzystając z ATP jako donora reszty fosforanowej. Następnie ten sam fosforan jest przenoszony na drugi składnik systemu, resztę kwasu asparaginowego w tzw. białku regulatorowym. Regulator odpowiedzi może bezpośrednio wpływać na ekspresję odpowiednich genów. W odróżnieniu od bakterii, u organizmów eukariotycznych dominują tzw. wieloskładnikowe systemy regulacyjne (MCS, ang. *multi-component systems*). Są one oparte na fosforylacji białek w resztach serynowych (S), treoninowych (T) i tyrozynowych (Y) (system kinaz STY, STYK). Doskonałym przykładem są tu szlaki kinaz białkowych MAP. W ich skład wchodzi m.in. trzy enzymy, kolejno aktywowane przez fosforylację. Białka MAPKKK, usytuowane „najwyżej”, po odebraniu sygnału fosforylują reszty serynowe w kinazach kinaz MAP (MAPKK). Te z kolei katalizują fosforylację reszt treoniny i tyrozyny w ściśle zachowanych domenach aktywacyjnych kinaz MAP (MAPK), które mogą regulować aktywność wielu czynników transkrypcyjnych [2].

Różnica w obu typach przekazywania sygnałów jest istotna. W systemie dwuskładnikowym, kinazy histydylowe przenoszą „własną” resztę fosforanową (z reszty histydyliny) na białko akceptorowe (regulatorowe). W systemie STYK, fosforylacja jednego enzymu powoduje zmianę jego aktywności. Nie „oddaje” on własnej reszty fosforanowej, ale korzystając z ATP jako donora, może katalizować fosforylację kolejnego białka. Warto zaznaczyć, że ten typ fosforylacji jest szybszy, chociaż bardziej energochłonny. Nie jest to przeszkodą, jako że ze względu na obecność mitochondriów, komórki eukariotyczne mają wystarczającą ilość ATP. Porównanie obydwu typów systemów ilustruje rycina

Iwona Wojda[✉]

Zakład Immunobiologii, Instytut Biologii i Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

[✉]Zakład Immunobiologii, Instytut Biologii i Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; e-mail:wojda@hektor.umcs.lublin.pl

Artykuł otrzymano 5 grudnia 2011 r.
Artykuł zaakceptowano 17 stycznia 2012 r.

Słowa kluczowe: kinazy MAP, ewolucja, choroba Parkinsona, choroba Alzheimerera, stwardnienie zanikowe boczne (ALS)

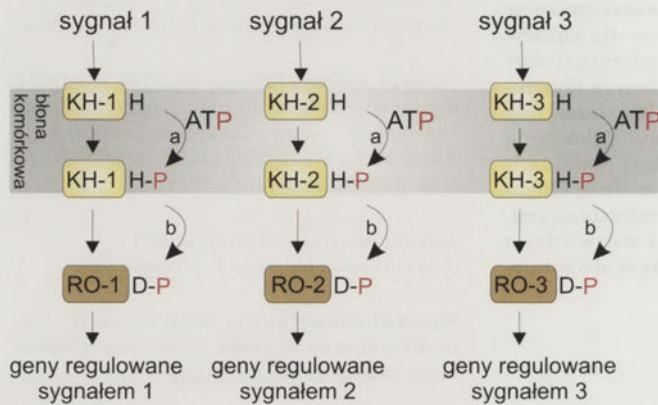
Wykaz skrótów: A β 42 – amyloid beta, składający się z 42 reszt aminokwasowych; ALS (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*) – stwardnienie zanikowe boczne; APP (ang. *amyloid precursor protein*) – białko prekursorowe amyloidu β ; ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase*) – kinaza MAP regulowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi; IL-1, 6 – interleukina 1, 6; kinazy MAP (MAPK, ang. *mitogen-activated protein kinases*) – kinazy aktywowane mitogenami; kinazy SAP (SAPK, ang. *stress-activated protein kinases*) – kinazy aktywowane w warunkach stresowych; RAGE – receptor produktów zaawansowanej glikacji; Tau – białko zasocjowane z mikrotubulami; TNF α – czynnik martwicy nowotworu α

Podziękowania: Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2011/01/B/NZ6/00286. Dziękuję prof. dr hab. Teresie Jakubowicz za krytyczną lekturę manuskryptu oraz mgr. Pawłowi Czubli za uwagi językowe.

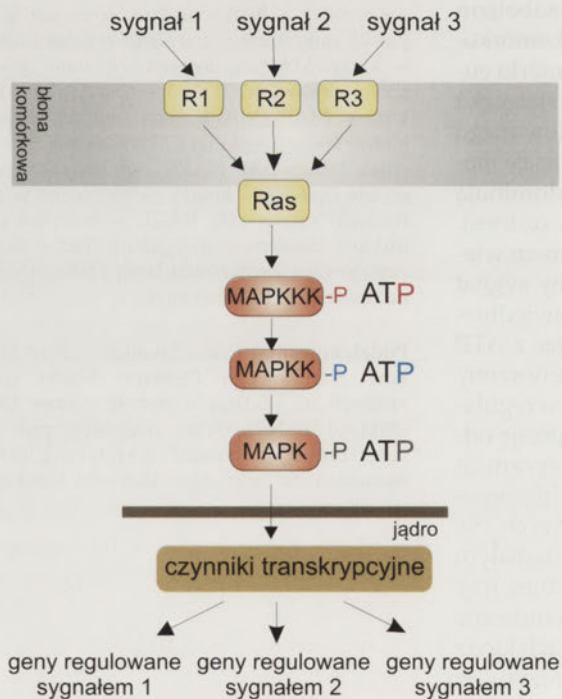
1. Intrigującym wydaje się więc być pytanie, dlaczego komórki eukariotyczne rozwinęły wieloskładnikowy system regulacyjny, oparty na kinazach serynowych, treoninowych i tyrozynowych tak, że stał się on dominujący? Okazuje się, że z fizykochemicznego punktu widzenia jest on dla komórek eukariotycznych korzystniejszy [3]. Po pierwsze, obecność jądra komórkowego wymusiła konieczność regulacji importu białek do tego organelum. Tylko niewielka liczba

białek ma „prawo wstępu” do jądra i to w określonych warunkach. Wieloskładnikowy system regulacyjny umożliwia konwergencję kilku impulsów w jednym miejscu, przy zachowaniu specyficzności odpowiedzi na dany bodziec (Ryc. 1). Na przykład kinaza ERK jest aktywowana w cytoplazmie w odpowiedzi na różne sygnały. Reguluje ona ekspresję genów, których produkty białkowe biorą udział w takich procesach jak różnicowanie i proliferacja. Reakcja komórki zależy od czasu aktywacji ERK. Krótki czas aktywacji tego enzymu skutkuje proliferacją komórek, podczas gdy długotrwała aktywacja prowadzi do zatrzymania wzrostu i różnicowania [4]. MCS umożliwia sprawną, wydajną regulację czasu trwania sygnału w danym punkcie. Po drugie kaskadowy system jest szybszy, umożliwia amplifikację sygnału, „ignorowanie” nieistotnych lub zbyt słabych impulsów oraz możliwość dodatkowej stymulacji poszczególnych komponentów szlaków pochodząca od innych sygnałów [3].

A. Dwuskładnikowy system regulacyjny



B. Wieloskładnikowy system regulacyjny u Eucaryota



Rycina 1 Porównanie dwu- (A) i wieloskładnikowego (B) systemu regulatorowego. (A) Kinaza historydylowa (KH) po odebraniu danego sygnału ulega autofosforylacji w reszcie historydylowej – H (a). Następnie fosforan jest przenoszony na resztę kwasu asparaginowego – D, w tzw. regulatorze odpowiedzi – RO (b), który może pełnić rolę czynnika transkrypcyjnego. (B) W systemie wieloskładnikowym (np. szlaki kinaz MAP) sygnały odbierane z receptorów powodują aktywację (np. za pośrednictwem białek Ras) kaskady enzymów (MAPKKK, MAPKK i MAPK). Aktywowany w wyniku fosforylacji enzym, katalizuje modyfikację kolejnego, korzystając z ATP jako źródła reszty fosforanowej. Białka znajdujące się na dole szlaku mogą ulegać translokacji do jądra komórkowego, gdzie modyfikują czynniki transkrypcyjne, które regulują ekspresję odpowiednich genów. Różnice pomiędzy tymi systemami regulatorowymi opisane są w tekście. Na podstawie [3], zmodyfikowano i uzupełniono.

BAKTERYJNE KINAZY „TYPU EUKARIOTYCZNEGO”

Eukariotyczne kinazy białkowe zawierają ściśle zachowaną, obejmującą około 300 reszt aminokwasowych sekwencję, tworzącą ich centra katalityczne. W obrębie tego katalitycznego rdzenia Steven Hanks wyodrębnił 12 subdomen o najwyższym stopniu homologii, dlatego w piśmiennictwie naukowym przyjęło się określenie „kinazy białkowe typu Hanksa” [5]. To właśnie sekwencja reszt aminokwasowych w obrębie katalitycznego rdzenia stanowi punkt odniesienia w poszukiwaniu nowych członków rodziny kinaz MAP.

Przez wiele lat uważano, że obecność kinaz serynowo-treoninowych typu Hanksa cechuje tylko organizmy eukariotyczne, natomiast fosforylacja w komórkach prokariotycznych oparta jest jedynie na opisanym powyżej modelu dwuskładnikowego systemu regulacyjnego. Jak wcześniej wspomniano dominuje on w tych komórkach, okazuje się jednak, że nie jest jedyny. Początkowo badania biochemiczne prowadzone na modelach bakteryjnych wskazywały na obecność kinaz serynowo-treoninowych oraz tyrozynowych w komórkach *Escherichia coli* [6,7]. Kamieniem milowym w odkryciu białek zbliżonych do kinaz typu Hanksa w komórkach bakteryjnych było sklonowanie w 1991 roku genu *pkn1*, kodującego kinazę serynowo-treoninową „typu eukariotycznego” z glebowej bakterii gram-ujemnej *Mycobacterium xanthus* [8]. Okazało się, że ekspresja tego genu jest regulowana w zależności od stopnia zróżnicowania komórek. Usunięcie genu powodowało przedwczesne różnicowanie oraz produkcję spor. W wyniku dalszych badań, u w/w bakterii, zidentyfikowano więcej genów kodujących kinazy zbliżone do eukariotycznych. Należą do nich *pkn2*, *pkn5*, *pkn6*, *pkn9*. Co ważne, wykazano regulacyjną rolę kinazy Pkn9 w syntezie pięciu białek błonowych (nazwanych białkami KREP9). Fakt, że kinaza Pkn9 jest białkiem błonowym, sugeruje jej rolę jako receptora odbierającego sygnały zewnątrzkomórkowe w celu regulacji ekspresji odpowiednich genów [9]. Ponadto kinazy „typu eukariotycznego” znaleziono u *Anabaena sp. Yershinia pseudotuberculosis*, *Yershinia pestis* i *Streptomyces coelicolor* [10].

Interesujący przykład bakteryjnej kinazy białkowej, zawierającej w swojej części domenę kinazy historydylowej oraz serynowo-treoninowej „typu eukariotycznego” znaleziono u cyjanobakterii *Anabaena sp. PCC7120*. *Anabaena* może wykorzystywać jako źródło azotu NO_3^- lub NH_4^+ .

Przy niedoborze tych źródeł niektóre komórki wchodzące w skład filamentów różnicują się w heterocysty, wyspecjalizowane w wiązaniu azotu atmosferycznego. W procesach metabolicznych zachodzących w heterocystach bierze udział kinaza HstK. Posiada ona N-kończącą domenę kinazy serynowo-treoninowej oraz C-kończącą domenę kinazy histydylowej. Ta niezwykła aranżacja dwóch funkcjonalnych domen katalitycznych w jednej cząsteczce dowodzi udziału kinaz białkowych zbliżonych do typu Hanksa oraz kinaz histydylowych w regulacji tych samych procesów metabolicznych cyjanobakterii. Ponadto okazało się, że „eukariotyczna” domena katalityczna bakteryjnej kinazy HstK (podobnie jak w przypadku PknB, o czym będzie mowa poniżej) może funkcjonalnie zastępować domenę katalityczną drożdżowej kinazy MAP, Hog1 [11].

Co ciekawe, odkrycia ostatnich lat wskazują na obecność kinaz, przypominających kinazy MAP u bakterii! U gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) znaleziono serynowo-treoninową kinazę PknB, która jest wydzielana na zewnątrz komórek, do organizmu gospodarza, co powoduje fosforylację białek człowieka, zaburzając tym samym przekazywanie sygnałów komórkowych. Umożliwia to przebieg patogenezy. Dokładna analiza miejsc fosforylowanych przez PknB wskazuje, że akceptor reszty fosforanowej znajduje się zawsze w pobliżu proliny. Obecność reszty proliny w motywie rozpoznawanym przez enzym jako miejsce fosforylacji upodabnia go do grupy kinaz CMGC, do której należą kinazy MAP. Podobnie jak kinazy MAP człowieka, PknB ma zdolność fosforylacji czynnika transkrypcyjnego ATF-2 *in vitro*. PknB odgrywa istotną rolę w regulacji metabolizmu *S. aureus*, w tym metabolizmu ściany komórkowej i jest uznawana za pierwszy prokariotyczny enzym podobny do kinaz białkowych MAP [12].

EWOLUCJA SZLAKÓW KINAZ BIAŁKOWYCH MAP

Powstanie komórki eukariotycznej datuje się na około 2.5 biliona lat temu. Istnieje kilka hipotez, próbujących opisać to zjawisko [13]. Ważnym etapem było wykształcenie mitochondrium. Według jednej z teorii, organellum to powstało w wyniku endocytozy α -proteobakterii przez archebakterię (Archeona). Endocytoza ta okazała się korzystna dla obu typów komórek. Większość genów powstałego endosymbionta została skopiowana, a następnie przeniesiona do genomu gospodarza, uzależniając go całkowicie od Archebakterii. Z czasem endosymbiont przekształcił się w mitochondrium. Materiał genetyczny gospodarza został otoczony błoną jądrową, co między innymi zabezpieczało jego DNA przed „bombardowaniem” ruchomymi elementami genetycznymi. Wykształciły się również inne organella komórkowe, m.in. siateczka śródplazmatyczna oraz aparat Golgiego. Więcej informacji dotyczących teorii powstawania komórek eukariotycznych znajdzie czytelnik w następujących pracach [14-17]. Tak więc w wyniku ewolucji z prostych komórek prokariotycznych powstała duża komórka eukariotyczna, zawierająca liczne przedziały komórkowe i posiadająca zdolność syntetyzowania dużej ilości ATP. Zrodziło to zapotrzebowanie na taki system przekazywania sygnałów komórkowych, który zintegrowałby przepływ informacji w obrębie całej komórki. Biorąc pod uwagę korzyści wypływające z kaskadowego przekazywania sygnałów w komórkach eukariotycznych oraz fakt, że

bakterie posiadały w swoich genomach sekwencje kodujące proste formy kinaz zbliżonych do typu Hanksa, wysunęto przypuszczenia, że z czasem zaczęły one ewoluować i rozwijać się, dając początek eukariotycznej rodzinie kinaz białkowych MAP. Jednocześnie na znaczeniu zaczęły nieocierać kinazy histydylowe.

Ewolucja szlaków przekazywania sygnałów komórkowych jest długotrwałym i skomplikowanym procesem. Towarzyszy ona specjacji, czyli powstawaniu nowych gatunków. Składają się na nią duplikacje jednych genów oraz delecje tych, których produkty białkowe stają się coraz mniej potrzebne w zmieniających się organizmach. W ewolucji istnieje tendencja do duplikacji całych zespołów genów, których produkty białkowe oddziałują ze sobą, co umożliwia wykształcanie się nowych kaskad enzymatycznych. Geny występujące u różnych gatunków, rozdzielone w wyniku specjacji, powstałe w wyniku duplikacji wspólnego genu, przodka, nazywamy genami ortologicznymi. Natomiast geny występujące u danego gatunku, powstałe w wyniku duplikacji jednego genu nazywamy paralogami. Jeśli duplikacja genu miała miejsce przed specjacją, geny paralogiczne można wówczas znaleźć u osobników różnych gatunków.

Rodzina kinaz białkowych MAP, należy do grupy eukariotycznych kinaz CMGC [5]. Grupa ta składa się z 4 rodzin o dużym stopniu podobieństwa: kinazy zależne od cyklin (ang. *Cyclin-dependent kinases*), kinazy MAP (ang. *MAP-kinases*), kinazy syntazy glikogenu 3 (ang. *Glycogen synthase kinases 3*) oraz kinazy podobne do zależnych od cyklin-*Cdk* (ang. *Cdc-like kinases*). Cechą wyróżniającą kinazy MAP jest obecność w domenie katalitycznej charakterystycznego motywu [LIVM][TS]XX[LIVM]XT[RK][WY]YRXPX[LIVM][LIVM] (dopuszczona jest zmienność w jednej pozycji, w sekwencjach ujętych w nawias) [18]. Kinazy MAP rozpoznają motyw Ψ X[S/T]P (gdzie Ψ oznacza prolinę lub aminokwas alifatyczny, X – dowolny aminokwas) jako miejsce fosforylacji w łańcuchu polipeptydowym. W pozycji +1 miejsca fosforylacji zawsze znajduje się prolina dlatego kinazy MAP określa się jako „prolinolubne” [19].

Na podstawie analizy filogenetycznej kinazy MAP z różnych organizmów (pierwotniaki, śluzowce, drożdże, rośliny, bezkręgowce, kręgowce) można podzielić na 3 duże podgrupy: ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinases*), SAPK (ang. *stress-activated protein kinases*) oraz MAPK3 (Tab. 1). Większość kinaz MAP charakteryzuje się zachowaniem w ewolucji motywem TXY (fosforylowana reszta treoniny oraz tyrozyny, przedzielona innym aminokwasem) w pętli aktywacyjnej. Fosforylacja reszt treoniny i tyrozyny wewnątrz tego motywu powoduje aktywację enzymatyczną kinazy. Wszystkie podrodziny podgrupy ERK posiadają motyw TEY (kwas glutaminowy pomiędzy treoniną a tyroziną). Wyjątek stanowi drożdżowa kinaza Smk1p, najbardziej ewolucyjnie odległa od pozostałych. W podrodzynie SAPK występuje motyw TPY (grupa SAPK1, czyli kinazy JNK) oraz TGY (grupa SAPK2, czyli p38 oraz Hog1p). Wiele kinaz, spośród grupy MAPK3 posiada motyw TEY, część kinaz MAP u pierwotniaków, motyw TDY. Niektóre podrodziny MAPK3, w pętli aktywacyjnej są fosforylowane tylko w jednej pozycji, w motywie SEG lub THE [18,20].

Jak wcześniej wspomniano, kinazy podgrupy ERK oraz liczni przedstawiciele podgrupy MAPK3, w pętli aktywa-

Tabela 1. Klasyfikacja kinaz MAP, sporządzona na podstawie analizy filogenetycznej dokonanej przez Dietmara Kultz i wsp. [18,20] z zaznaczeniem motywów w pętli aktywacyjnej. W większości kinaz MAP są to miejsca podwójnie fosforylowane w resztach treoninowych i tyrozynowych (motyw TXY), oddzielonych charakterystycznym dla danej podrodziny aminokwasem tj. glicyną, proliną lub kwasem asparaginowym. Wyjątek stanowią motywy TNY i TDY. Niektóre kinazy MAP podgrupy MAPK3 posiadają motywy z jednym miejscem fosforylacji, np. SEG czy THE. Jednoliterowe oznaczenia aminokwasów wg. formatu FASTA.

Kinazy MAP		
SAPK	ERK	MAPK3
SAPK1 (zwierzęta) T-P-Y	PERK (rośliny) T-E-Y	MAPK3 (zwierzęta) S-E-G
SAPK2 (zwierzęta) T-G-Y	ERK1 (zwierzęta) T-E-Y	Inne MAPK T-E-Y (pierwotniaki)
YSAPK (drożdże/ grzyby) T-G-Y	ERK5 (zwierzęta) T-E-Y	T-D-Y (pierwotniaki) T-H-E (<i>C. elegans</i>)
	YERK1 (drożdże/ grzyby) T-E-Y	
	YERK1 (drożdże/ grzyby) T-E-Y	
	SMK1 (<i>S. cerevisiae</i>) T-N-Y	

cyjnej posiadają motyw TEY. Wszystkie znane kinazy MAP pierwotniaków należą do podgrupy MAPK3. Na podstawie analizy filogenetycznej przypuszcza się, że kinazy ERK oraz MAPK3 wywodzą się od wspólnego genu-przodka, zawierającego motyw TEY, który powstał jeszcze przed wyodrębnieniem linii pierwotniaków i śluzowców od linii, która później dała początek zwierzętom i grzybom. Wynika z tego, że kinazy MAP miałyby już około 1-1,5 biliona lat i pojawiły się stosunkowo szybko po powstaniu komórek eukariotycznych. Jako najstarsze filogenetycznie, kinazy MAP zawierające motyw TEY, znajdują się u wszystkich Eukaryota. Z kolei kinazy SAPK znajdują się jedynie u zwierząt i grzybów, brak ich u roślin. Ta podgrupa kinaz MAP wydaje się być najmłodsza filogenetycznie i powstała w wyniku duplikacji i zmian w genach kodujących kinazy ERK, w linii prowadzącej do wyodrębnienia się tkankowców i grzybów już po oddzieleniu się linii roślin. Co ciekawe liczba członków podgrupy SAPK wzrasta u coraz to wyższych ewolucyjnie organizmów, o czym będzie mowa poniżej [18,20,21].

Rycina 2. Szlaki kinaz białkowych MAP u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i człowieka (*Homo sapiens*). Analizując ewolucję tych szlaków na poziomie MAPK, MAPKK i MAPKKK można stwierdzić, że w toku ewolucji cały drożdżowy szlak HOG uległ duplikacji, dając początek szlakom aktywowanym stresem tj. p38 i JNK. Powiązania filogenetyczne pomiędzy poszczególnymi składnikami szlaków opisane są w tekście.

U prostych organizmów eukariotycznych, jakimi są drożdże pączkujące *Saccharomyces cerevisiae*, kinazy ERK ewoluowały dalej, wyodrębniając kinazy Kss1p, Fus3p (należące do podrodziny YERK1, patrz Tab.1) oraz bardziej filogenetycznie odległą Mpk1p (Slt2p), zawierające motyw TEY (podrodzina YERK2) (Ryc. 2) Geny prowadzące do powstania kinaz Kss1p i Fus3p zostały zduplikowane w linii prowadzącej do powstania grzybów (ale jeszcze przed specjacją grzybów) po oddzieleniu jej od linii prowadzącej do powstania zwierząt. Dlatego u ssaków nie ma odpowiednika kinaz Kss1p i Fus3p (ich funkcja jest ściśle związana z fizjologią grzybów tj. z regulacją wzrostu filamentacyjnego i koniugacją), niemniej jednak kinazy te oraz kinazy ERK człowieka pochodzą od wspólnego genu-przodka [21].

Stosunkowo mało poznane jest pochodzenie drożdżowych kinaz Mpk1p (Slt2p) oraz Smk1p. Jak wcześniej wspomniano, Mpk1p, mimo że zawiera motyw TEY wydaje się być ewolucyjnie odległa od Kss1p czy Fus3p. Istnieją przypuszczenia, że Smk1p powstała w wyniku duplikacji genu kodującego kinazę Slt2p w linii grzybów, ale nie ma na to przekonujących dowodów. Ssaczy ortolog tej kinazy prawdopodobnie uległ delecji. U ludzi w wyniku duplikacji ERK powstały kinazy ERK1 i ERK2 (obie należące do podgrupy zwierzęcych kinaz ERK1, patrz Tab. 1 oraz Ryc. 2). Ludzka kinaza ERK5 nie ma odpowiednika u drożdży, co może świadczyć o delecji ortologa tego genu. Pochodzenie ludzkich kinaz ERK3, ERK4 i ERK7 nie jest znane. Sekwencje genów kodujących te kinazy nie tworzą filogenetycznej grupy z jakimikolwiek kinazami MAP drożdżowymi czy zwierzę-

Saccharomyces cerevisiae

feromony	niedobór azotu	stres osmotyczny	uszkodzenie ściany komórkowej	głód	sygnał
Ste11	Ste11	Ste11 Ssk2/22	Bck1	?	MAPKKK
Ste7	Ste7	Pbs2	Mkk1/2	?	MAPKK
Fus3 T-E-Y	Kss1 T-E-Y	Hog1 T-G-Y	Mpk1 T-E-Y	Smk1 T-N-Y	MAPK
koniugacja	wzrost inwazyjny/ pseudotrzępkowy	synteza glicerolu	metabolizm ściany komórkowej	sporulacja	odpowiedź

Homo sapiens

klasyczne kinazy MAP				"nietypowe" kinazy MAP		
czynniki wzrostu, mitogeny	stres, cytokiny zapalne		czynniki wzrostu, stres	?	stres oksydacyjny, cytokiny	mitogeny
Raf-1 c-Mos	TAK1, ASK1, MEKK1-4, TAO1/2	MEKK1-4, MLKs, ASK1/2, MLKs, LZK, TAK1, TPL2, DLK, MLTK	MEKK2/3, TPL2	?	TAK1, ?	?
MEK1/2	MKK3/4/6	MKK4/7	MEK5	ERK3K?	HIPK2?	?
ERK1/2 T-E-Y	p38 T-G-Y	JNK T-P-Y	ERK5 T-E-Y	ERK3/4 S-E-G	NLK T-Q-E	ERK7 T-EY
proliferaacja różnicowanie	adaptacja, stan zapalny, apoptoza		proliferaacja, adaptacja	różnicowanie? inne ?	?	zahamowanie proliferacji?

cymi. W piśmiennictwie naukowym określane są one jako „nietypowe kinazy MAP” [22] (Ryc. 2).

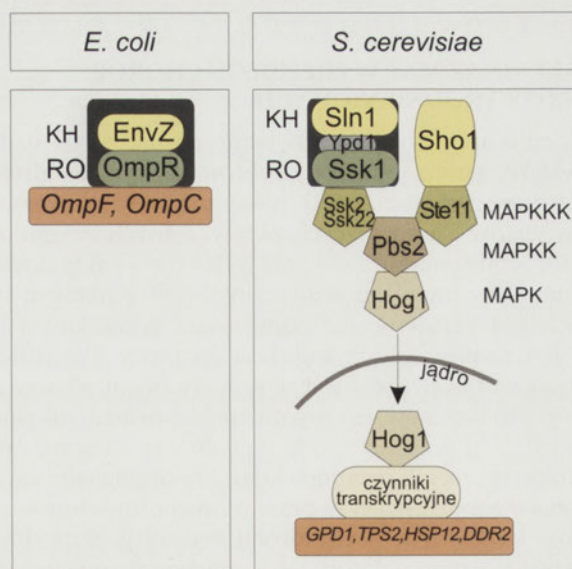
Warto wspomnieć, że roślinne kinazy MAP, ze względu na brak kinaz aktywowanych stresem (SAPK), nabyły z czasem zdolność przekazywania sygnałów w odpowiedzi na zmieniające się warunki abiotyczne środowiska zewnętrznego. W ten sposób spełniają u roślin te funkcje, które u zwierząt pełni kinazy SAPK.

Jak wcześniej zaznaczono, kinazy podgrupy SAPK są filogenetycznie młodsze od kinaz ERK. U drożdży pączkujących *S. cerevisiae* jest tylko jedna kinaza SAPK, a mianowicie kinaza Hog1p. Zawiera ona motyw TGY w pętli aktywacyjnej i wchodzi w skład szlaku HOG aktywowanego w stresie osmotycznym (Ryc. 2). Porównując odpowiedź drożdży *S. cerevisiae* i bakterii *E. coli* na stres osmotyczny, można zaobserwować zależność między budową komórki, a pojawieniem się kaskadowego typu przekazywania sygnałów komórkowych. U obu organizmów w detekcji ciśnienia osmotycznego bierze udział dwuskładnikowy system regulacyjny (Ryc. 3), tj. kinaza histydylowa, EnvZ u *E. coli* oraz Sln1p u *S. cerevisiae* oraz regulatory odpowiedzi, odpowiednio OmpR i Ssk1p. W przypadku bakterii regulator odpowiedzi bezpośrednio wpływa na ekspresję genów kodujących poryny (OmpF i OmpC). W przypadku drożdży białko Ssk1p reguluje aktywność szlaku kinaz białkowych MAP (szlaku HOG), którego aktywna kinaza Hog1p, po przemieszczeniu do jądra komórkowego, reguluje aktywność odpowiednich czynników transkrypcyjnych. Można więc zaobserwować „wstawienie” szlaków kinaz MAP między dwuskładnikowy system przekazywania sygnałów a czynniki transkrypcyjne. Jest to przykład ilustrujący, jak budowa komórki determinuje sposób przekazywania sygnałów komórkowych, o czym wspomniano w pierwszej części niniejszego artykułu.

Z czasem kinazy SAPK, reprezentowane przez jedną kinazę Hog1p u *S. cerevisiae*, uległy dywersyfikacji. U gąbek (Porifera) obserwuje się rozdział tych enzymów na SAPK1 (JNK) oraz SAPK2 (p38). Wykształcenie się tych prostych form organizmów wielokomórkowych datuje się na około 600 milionów lat temu. Kinazy p38 oraz JNK gąbek w pętli aktywacyjnej zawierają odpowiednio motywy TGY oraz TPY, charakterystyczne dla kinaz SAPK Metazoa. Wykazano, że obydwa enzymy mogą komplementować kinazę Hog1p w odpowiedzi drożdży *S. cerevisiae* na stres osmotyczny [23]. Genom prosteo organizmu bezkręgowego, nicienia *C. elegans* posiada po jednym genie kodującym kinazy SAPK1, SAPK2 oraz SAPK3. Ze wzrostem złożoności organizmów eukariotycznych obserwuje się coraz większą dywersyfikację kinaz SAPK. Genom człowieka zawiera co najmniej 3 geny kodujące kinazy SAPK1 (JNK1, JNK2, JNK3) oraz cztery, kodujące kinazy SAPK2 (p38 α , p38 β , p38 γ i p38 δ). Ponadto w wyniku alternatywnego składania transkryptów powstają dodatkowe formy kinaz SAPK. Dywersyfikacja kinaz SAPK u wyższych organizmów eukariotycznych, wiąże się m.in. z rozwojem układu immunologicznego, w tym z wykształceniem odporności nabytej. Kinazy tej podgrupy są silnie aktywowane cytokinami i odgrywają niezwykle istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej związanej z limfocytami T oraz powstawaniem stanów zapalnych. Ponadto, są one, podobnie jak

u innych organizmów eukariotycznych, aktywowane w stresie osmotycznym. Wykazano, że kinazy SAPK1 i SAPK2 człowieka komplementują funkcjonalnie kinazę Hog1p z drożdży [24,25]. Większą homologię sekwencji obserwuje się wśród izoform p38 (SAPK2) w porównaniu z kinazami JNK (SAPK1). Te drugie ulegały bowiem znacznie szybszym zmianom w toku ewolucji. To przyspieszenie zmian ewolucyjnych kinaz JNK obserwuje się w linii zwierząt po oddzieleniu od linii drożdży, ale jeszcze przed wyodrębnieniem się bezkręgowców. Najnowsze informacje dotyczące kinaz MAP u ludzi znajdzie czytelnik w pracy przeglądowej [26].

U człowieka wyróżnia się klasyczne oraz tzw. „nietypowe” kinazy MAP. Aktywowane są one różnymi czynnikami i biorą udział w regulacji wielu aspektów naszej fizjologii. Obrazuje je dolna część ryciny 2. Analiza filogenetyczna kinaz MAP wykazuje wysokie pokrewieństwo ludzkich kinaz p38 z drożdżową kinazą Hog1p. Na poziomie analizy sekwencji genów kodujących kinazy MAPKK wykazano wyraźne pokrewieństwo drożdżowej kinazy Pbs2p (składnik szlaku HOG) ze ssaczymi kinazami MKK4, MKK7, MKK3 i MKK6. Wynika z tego, że gen *PBS2* uległ w toku ewolucji duplikacjom wylaniając geny kodujące w/w enzymy i jest ich ortologicznym protoplastą. Pochodzenie pozostałych genów kodujących ludzkie kinazy MAPKK tj. MEK1, MEK2, MEK5 nie jest jasne. Analiza ich sekwencji nie wykazuje istotnego podobieństwa do znanych, drożdżowych kinaz MAPKK. Z drugiej strony, jak do tej pory nie udało się zidentyfikować ludzkiego ortologa genów drożdżowych kinaz MAP: *Mkk1p* i *Mkk2p*; być może w toku ewolucji uległ on delecji [18,20,21]. Na podstawie analizy filogenetycznej wnioskuje się, że spośród kinaz fosforylujących kinazy



Rycina 3. Szlaki przekazywania sygnałów w odpowiedzi na stres osmotyczny u *E. coli* i *S. cerevisiae*. U obu organizmów w odbiorze i przekazaniu sygnału bierze udział dwuskładnikowy system regulacyjny tj. kinaza histydylowa (KH): odpowiednio EnvZ i Sln1 oraz regulator odpowiedzi (RO): odpowiednio OmpR i Ssk1p. W przypadku bakterii RO jest jednocześnie czynnikiem transkrypcyjnym regulującym ekspresję genów poryn: OmpF, OmpC w zależności od ciśnienia osmotycznego środowiska. U drożdży RO aktywuje szlak kinaz MAP-HOG. Aktywna kinaza MAP ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie reguluje ekspresję genów m.in. dehydrogenazy glicerolo-3 fosforanu (*GPD1*), fosfatazy trehalozo-6-fosforanu (*TPS2*), białek aktywowanych stresem (*HSP12*, *DDR2*). Na podstawie [20], zmodyfikowano.

MAPKK (MAPKKK) ortologami są ludzka kinaza MEKK4, i kinazy Ssk2/22p (również szlaku HOG) drożdży *S. cerevisiae*. Istnieje także przypuszczenie o homologii ludzkich kinaz MEKK1, MEKK2, MEKK3 z drożdżową Ste11p, jednak analiza drzewa filogenetycznego dokonana przez Caffrey i wsp. [21] nie daje podstaw do jednoznacznego stwierdzenia, że są one ortologami. Ponadto nie znaleziono homologa kinazy Ask1. Może to oznaczać, że uległ on delecji, lub daleko idącym zmianom ewolucyjnym. Podobnie pochodzenie pozostałych ssaczych kinaz MAPKKK nie jest znane. Analiza ich sekwencji nie upoważnia do jakichkolwiek jednoznacznych stwierdzeń. U drożdży nie zidentyfikowano kinaz Raf, obecnych u zwierząt i roślin. Sugeruje to, że w toku ewolucji, po rozdzieleniu zwierząt, roślin i grzybów, w tej ostatniej linii miała miejsce delecja genu *RAF*.

Podsumowując: wyniki badań filogenetycznych szlaków kinaz białkowych MAP na poziomie MAPK, MAPKK i MAPKKK, wskazują na to, że w toku ewolucji drożdżowy szlak HOG uległ duplikacji i dał początek szlakom kinaz MAP aktywowanych stresem bardziej złożonych organizmów eukariotycznych. Według Pertseva i Shpakov, ewolucja eukariotycznych szlaków przekazywania sygnałów komórkowych dokonała się najprawdopodobniej poprzez modyfikację dwuskładnikowego systemu regulacyjnego oraz wykształcenie z prokariotycznych prekursorów kinaz serynowo-treoninowych eukariotycznej rodziny kinaz białkowych. W toku dalszej ewolucji, kiedy powstawały organizmy wielokomórkowe, kinazy MAP zaczęły odgrywać rolę w przekazywaniu sygnałów komórkowych pochodzących nie tylko ze środowiska zewnętrznego organizmu, ale również w komunikacji między poszczególnymi komórkami tego samego organizmu. Wiązało się to z rozwojem m.in. układu immunologicznego, nerwowego oraz dokrewnego [27].

SZLAKI KINAZ MAP W PRZEBIEGU CHORÓB NEUROZWYRODNIENIOWYCH

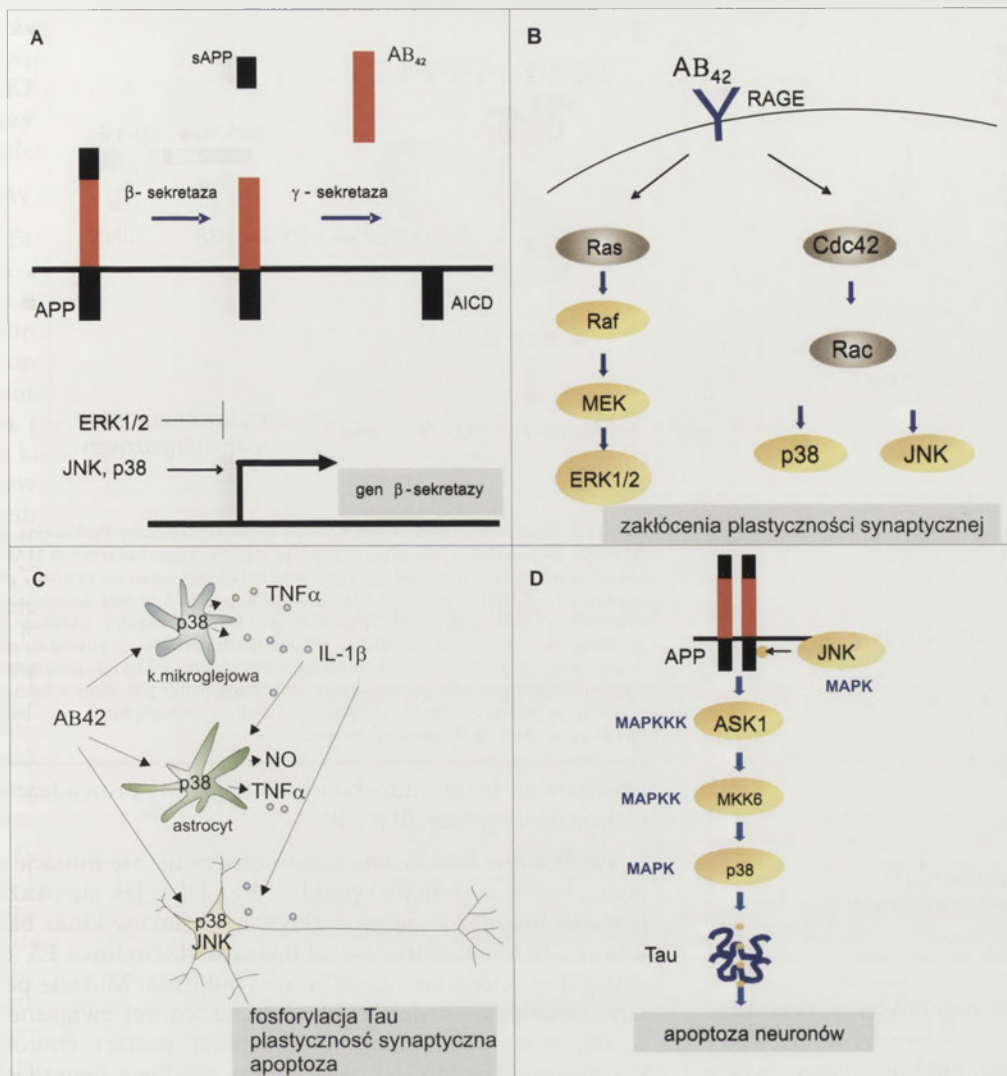
Jak napisano wyżej u ludzi istnieją szlaki kinaz białkowych MAP, regulujące wiele aspektów naszej fizjologii (Ryc. 2). W uproszczeniu szlak ERK bierze udział w przekazywaniu sygnałów komórkowych aktywowanych czynnikami wzrostu i mitogenami, zaś szlaki JNK i p38 są aktywowane stresem biotycznym lub abiotycznym [26]. Zadaniem tych drugich jest przywrócenie homeostazy komórkowej lub, jeżeli jest to niemożliwe, indukcja apoptozy. Prawidłowe funkcjonowanie szlaków jest więc warunkiem właściwego rozwoju i funkcjonowania organizmu człowieka, zaś skutki zaburzeń dróg przekazywania sygnałów w komórce mogą być dramatyczne. W ostatnich kilku latach pojawiły się doniesienia o zaburzeniach w prawidłowym funkcjonowaniu szlaków kinaz MAP w chorobach neurodegeneracyjnych, co będzie tematem dalszej części niniejszego opracowania. Przyczyny oraz molekularne mechanizmy przebiegu tych chorób nie są szczegółowo poznane, dlatego ich leczenie ciągle nie jest skuteczne. Być może badania nad przekazywaniem sygnałów komórkowych przyczynią się do odkrycia sposobu ich skutecznej terapii.

CHOROBA ALZHEIMERA

Choroba Alzheimerera jest to choroba neurodegeneracyjna, charakteryzująca się nieprawidłowym funkcjonowaniem

ośrodkowego układu nerwowego, w tym zakłóceniami w tej części mózgu, która jest odpowiedzialna za czynności poznawcze oraz pamięć. Rozwój choroby prowadzi do demencji (otępienia). Nazwa schorzenia pochodzi od nazwiska niemieckiego psychiatry Aloiza Alzheimerera, który w latach 1901-1906 monitorował przebieg rozwoju otępienia u swojej pacjentki Augusty D, a poczynione obserwacje przedstawił na forum medycznym. Zapadalność na chorobę Alzheimerera wzrasta z wiekiem. Szacuje się, że dotyka ona około 8-12% ludzi po 65 roku życia oraz 40-50% po 85 roku życia [28-30]. W mózgu osób chorych obserwuje się tzw. blaszki starcze oraz splątki białkowe. Głównym składnikiem blaszek starczych jest amyloid A β 42. Powstaje on z transbłonowego białka prekursorowego APP (ang. *amyloid precursor protein*), będącego glikoproteiną o dotychczas nieznannej funkcji. APP jest intensywnie syntetyzowane w synapsach nerwowych. Większość białka APP ulega proteolitycznemu cięciu przez α -sekretazę, a następnie γ -sekretazę, prowadząc do powstania nieamyloidogennych peptydów. Alternatywnie, białko APP może być trawione przez β -sekretazę i γ -sekretazę, powodując powstanie amyloidogennego fragmentu A β 42 oraz fragmentu C-końcowego białka APP, AICD (Ryc.4A). Mogą także powstawać peptydy nieznacznie różniące się długością: A β 40, A β 42, A β 36. Większość A β 40 i A β 42 jest wydzielana na zewnątrz komórek, zaś wewnątrzkomórkowe A β 42 powodują mitochondrialny stres oksydacyjny. W regulacji ekspresji genów kodujących sekretazy biorą udział szlaki kinaz białkowych MAP [31-34]. Szlak kinazy ERK stymuluje ekspresję genu α -sekretazy, promując wytwarzanie niefibrynowych peptydów, zaś aktywacja szlaków stresu tj. p38 i JNK stymuluje ekspresję genu β -sekretazy, odpowiedzialnej za powstawanie neurotoksycznego amyloidu A β 42.

Peptydy A β mogą występować w formie rozpuszczalnych mono- lub oligomerów, jak również włókien składających się z dużych agregatów białkowych, które precypitują tworząc wspomniane blaszki starcze. Najbardziej fibrynowy a zarazem neurotoksyczny jest peptyd A β 42. Wykazano jednak, że również rozpuszczalne formy amyloidu A β 42 mogą prowadzić do zaburzeń w przekaźnictwie neuronalnym. Mianowicie peptyd ten może wiązać się do receptora RAGE (ang. *receptor for advanced glycation end produkt*) [35]. Należy on do rodziny immunoglobulin i jest zdolny do wiązania różnych ligandów, regulując m.in. migrację i różnicowanie komórek nerwowych w czasie ontogenezy czy procesy powstawania stanów zapalnych [36,37]. Wewnątrzkomórkowa domena receptora RAGE bierze udział w aktywowaniu szlaków przekazywania sygnałów, w tym szlaków kinaz białkowych MAP [38,39]. W tym miejscu warto wspomnieć, że w komórkach człowieka szlaki MAP: ERK, p38 oraz JNK odgrywają istotną rolę w regulacji tzw. plastyczności synaptycznej, czyli zdolności układu nerwowego do zmiany napięcia synaptycznego. Na plastyczność składa się m.in. długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP, ang. *long-term potentiation*), polegające na wzmocnieniu komunikacji między dwoma neuronami pre- i postsynaptycznym. Może ono polegać na zwiększeniu wrażliwości neuronu postsynaptycznego na neuroprzekaźniki, wysyłane przez komórkę presynaptyczną. Zwiększona wrażliwość może być skutkiem podwyższonej aktywności lub liczby receptorów na powierzchni neuronu postsynaptycznego. Procesem



Rycina 4. Szlaki kinaz białkowych MAP w przebiegu choroby Alzheimera. (A) Fibrynowy amyloid Aβ₄₂, główny składnik blaszek starczych, powstaje w wyniku protolitycznego cięcia białka prekursorowego APP przez β- i γ-sekretazy. Ekspresja genu β-sekretazy jest regulowana przez szlaki kinaz białkowych MAP: pozytywnie-przez szlak JNK i p38, zaś negatywnie przez szlak ERK. (B) Aβ₄₂ wiąże się do receptora RAGE, który aktywuje szlaki kinaz białkowych MAP w komórkach nerwowych. Szlaki te biorą udział w regulacji plastyczności synaptycznej, która jest podstawą uczenia się i pamięci. Zaburzenia prawidłowej regulacji szlaków kinaz białkowych MAP powodują zaburzenia przekazywania sygnałów. Dlatego jednym z pierwszych objawów choroby Alzheimera są zaburzenia czynności poznawczych i pamięci krótkoterminowej. (C) Amyloid Aβ₄₂ powoduje aktywację szlaku p38 w komórkach mikrogleju, które w odpowiedzi wydzielają czynnik martwicy nowotworu TNFα oraz interleukinę 1. Powoduje to aktywację szlaku p38 w astrocytach. Komórki te wydzielają tlenek azotu (NO) oraz interleukinę 1β. Cytokiny prozapalne aktywują szlaki kinaz MAP w komórkach nerwowych, co przyczynia się do indukcji apoptozy. (D) Dimeryzacja białka APP aktywuje szlak kinaz MAP, przyczyniając się do powstawania splotków neurofibrilarnych. Na podstawie [42,43], zmodyfikowano.

przeciwstawnym jest długotrwałe osłabienie synaptyczne (ang. *long-term depression*). Plastyczność synaptyczna jest podstawą procesów uczenia się i pamięci [40,41]. Związanie Aβ₄₂ do receptora RAGE prowadzi do zaburzeń prawidłowego funkcjonowania szlaków kinaz białkowych MAP w neuronach i, konsekwentnie, do zaburzeń w plastyczności synaptycznej. Dlatego właśnie zaburzenia czynności poznawczych i pamięci krótkoterminowej są pierwszymi objawami choroby Alzheimera (Ryc. 4B) [42].

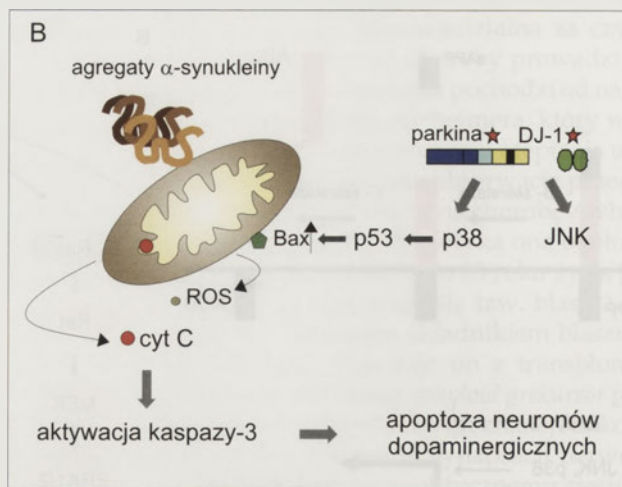
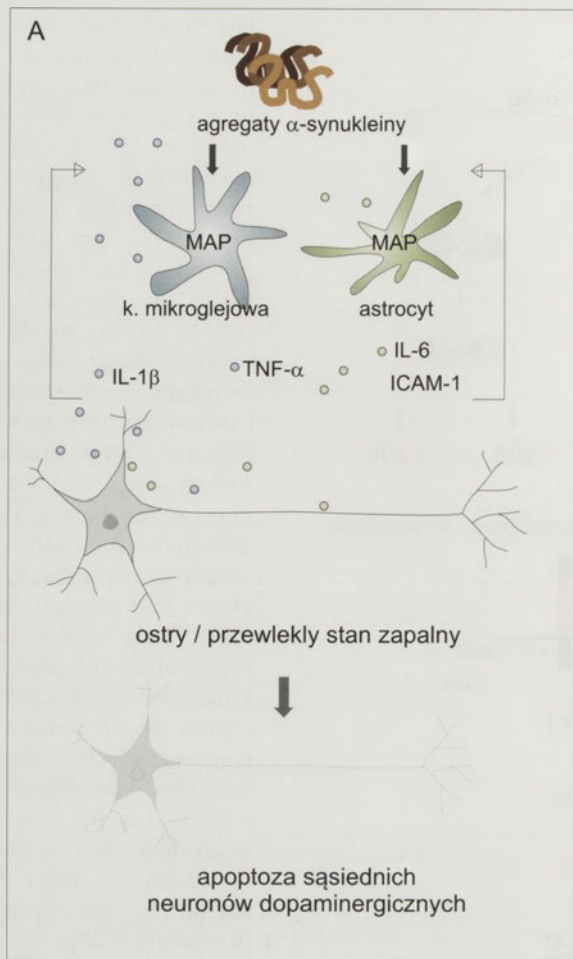
W chorobach neurozwyrodnieniowych, w tym w chorobie Alzheimera, obserwuje się przewlekły stan zapalny mózgu. Wiąże się to z aktywacją przez Aβ₄₂ komórek mikrogleju. Wskutek aktywacji szlaku kinaz MAP, p38, komórki te wydzielają czynnik martwicy nowotworu TNF oraz interleukinę 1. Cytokiny te aktywują następnie szlak p38 w

astrocytach, które wydzielają tlenek azotu oraz interleukinę 1, przyczyniając się do rozwoju stanu zapalnego w mózgu. Cytokiny prozapalne działają na komórki nerwowe w mózgu, w których stymulują szlaki p38 oraz JNK. Ich aktywacja powoduje hiperfosforylację białka Tau. (Ryc. 4C) [42-44]. Jest to białko występujące w komórkach nerwowych, związane z mikrotubulami i odpowiadające za ich stabilizację. Jego nadmierną fosforylację, katalizowaną m.in. przez kinazę syntazy glikogenu (GSK-3β) obserwuje się w chorobach neurozwyrodnieniowych. Hiperfosforylacja białka Tau, w której biorą również udział kinazy ERK, JNK i p38 przyczynia się do powstawania wspomnianych wcześniej splotków białkowych (neurofibrilarnych) wewnątrz neuronów. Ich liczba jest związana ze stopniem nasilenia choroby Alzheimera [Ryc. 4D) [45,46].

CHOROBA PARKINSONA

Choroba Parkinsona, zwana dawniej drżączką porażną, dotyka 1% ludzi w wieku 40-60 lat. Jest to powoli postępująca, zwyrodnieniowa choroba ośrodkowego układu nerwowego. Jej nazwa pochodzi od nazwiska londyńskiego lekarza, Jamesa Parkinsona, który jako pierwszy w 1817 roku opisał jej przebieg. W patogenezie tego schorzenia

dochodzi do zmian zwyrodnieniowych neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej mózgu. Jak nazwa wskazuje, wytwarzają one neuroprzekaźnik, dopaminę, która jest odpowiedzialna za przekazywanie impulsu do mięśni, koordynację oraz napięcie mięśni. Dzięki temu ruchy zależne od naszej woli są płynne. Kiedy komórki, produkujące dopaminę ulegają zniszczeniu, wówczas tracimy kontrolę nad ruchami. W początkowym etapie chorych cechuje spowolnienie oraz niezgrabność ruchowa. Po pewnym czasie dochodzą zaburzenia równowagi, wreszcie trudności z wykonywaniem nawet prostych czynności. Przyczyną utraty neuronów dopaminergicznych jest kumulacja tzw. ciała Lewiego, zawierających zmienione formy białka zwanego α-synukleiną [47].



Rycina 5. Szlaki kinaz białkowych MAP w przebiegu choroby Parkinsona. (A) Agregaty α -synukleiny powodują aktywację szlaków kinaz białkowych MAP w komórkach mikrogleju i w astrocytach. Wydzielają one wówczas cytokiny prozapalne (IL-1 β , TNF- α i IL-6, ICAM-1), oddziałujące na komórki sąsiadujących neuronów dopaminergicznych. Przedłużający się stan zapalny indukuje ich apoptozę. (B) Agregaty α -synukleiny w komórkach nerwowych powodują stres oksydacyjny. Skutkiem tego jest uwolnienie cytochromu c i indukcja apoptozy. Ponadto, aktywna kinaza p38 katalizuje fosforylację białka p53, które z kolei jest czynnikiem transkrypcyjnym, indukującym syntezę proapoptotycznego białka Bax. Na podstawie [43], zmodyfikowano.

zewnętrznej błony mitochondrialnej [53,54] prowadząc w efekcie do apoptozy (Ryc.5B).

W chorobie Parkinsona często obserwuje się mutacje w genie, kodującym białko parkinę oraz DJ-1. Jak się okazuje ma to również związek z aktywacją szlaków kinaz białkowych MAP. Parkina jest to ligaza ubikwitylowa E3, do substratów której należą m.in. α -synukleina. Mutacje parkiny powodują spadek jej aktywności, co jest związane z wystąpieniem rodzinnej, młodzieńczej postaci choroby Parkinsona. Trudno jest określić, czy wadliwa degradacja białek w systemie zależnym od ubikwityny spowodowana mutacjami w genie parkiny jest przyczyną czy skutkiem choroby Parkinsona. Ogólnie, można powiedzieć, że neuroprotekcja parkiny polega na udziale w degradacji białek toksycznych dla neuronów oraz w usuwaniu uszkodzonych mitochondriów przez autofagię. Parkina ma działanie antyapoptyczne dla komórek nerwowych, dzięki hamowaniu szlaku kinaz MAP-JNK. Mutacje w genie kodującym to białko powodują zaburzenia tej funkcji i aktywację kinazy JNK, co przyczynia się do wywołania apoptozy neuronów dopaminergicznych [55,56]. DJ-1 jest to neuroprotekcjne białko o aktywności peroksydazy oraz koaktywatora transkrypcyjnego. Przypuszcza się, że chroni ono mitochondria przed stresem oksydacyjnym, bowiem wyłączenie genu kodującego DJ-1 powoduje produkcję dziesięciokrotnie większej ilości tlenu azotu w astrocytach w odpowiedzi na LPS. Ekspresja genu syntazy tlenu azotu jest stymulowana przez szlak p38 w odpowiedzi na LPS, a DJ-1 hamuje aktywność tego szlaku. Podobnie jak parkina, DJ-1 hamuje aktywność szlaku JNK. Białko to oddziałuje bezpośrednio z kinazą MEKK1. Zmutowane formy obu białek tj. parkiny i DJ-1 powodują aktywację szlaku JNK i mają działanie proapoptotyczne [43,57,58]

Poza mutacjami w genach kodujących w/w białka, w chorobie Parkinsona obserwuje się również mutacje w ge-

W warunkach fizjologicznych α -synukleina uczestniczy w szeroko pojętym metabolizmie dopaminy, reguluje bowiem jej biosyntezę, magazynowanie, uwalnianie z pęcherzyków synaptycznych oraz wychwytywanie zwróte z przestrzeni synaptycznej. Utrata fizjologicznej funkcji α -synukleiny może zachodzić wskutek mutacji w genie kodującym to białko. Ma to często miejsce właśnie w chorobie Parkinsona [48]. W wyniku powstania nieprawidłowych form tego białka dochodzi do jego oligomeryzacji i agregacji. Odkładanie się α -synukleiny w ciałach Lewiego powoduje apoptozę komórek nerwowych. Zachodzi ona na skutek stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego oraz zaburzeń prawidłowego funkcjonowania szlaków kinaz białkowych MAP [49-51]. Agregaty α -synukleiny powodują aktywację szlaków p38, ERK oraz JNK w komórkach mikrogleju [52]. Produkują one wówczas cytokiny, takie jak: IL-1 β , TNF α , oraz IL-6, które działając na sąsiadujące neurony dopaminergiczne wywołują ostry stan zapalny. W astrocytach z kolei agregaty α -synukleiny indukują ekspresję genów kodujących IL-6 oraz ICAM-1, co wywołuje ostry stan zapalny mózgu. Wszystko to sprzyja wywołaniu apoptozy komórek nerwowych (Ryc. 5A). Ponadto agregaty α -synukleiny nagromadzone w cytoplazmie powodują wytwarzanie wolnych rodników przez mitochondria neuronów oraz uwolnienie cytochromu c. Aktywuje to szlak wewnętrzny apoptozy. Poza tym aktywna kinaza p38 powoduje fosforylację białka p53, które z kolei indukuje ekspresję genów proapoptotycznego białka Bax, co sprzyja permeabilizacji

nach kodujących białka: LRRK2 oraz PINK-1. LRRK2 jest dużym białkiem, około 280kDa, które *in vitro* posiada aktywność kinazy MAPKKK w stosunku do kinaz MKK3/6 i MKK4/7. Pink-1 z kolei jest to białko o aktywności m.in. kinazy serynowo-treoninowej. Pełni funkcję ochronną wobec białek w czasie stresu oksydacyjnego [43].

STWARDNIENIE ZANIKOWE BOCZNE

Stwardnienie zanikowe boczne (ALS, ang. *amyotrophic lateral sclerosis*), nazywane jest także chorobą Leu Gehringa. Był to znany amerykański bejsbolista, który zmarł na tę chorobę w 1941 roku, w wieku 37 lat. Jest to postępująca choroba prowadząca m.in. do zaniku neuronów ruchowych (motorycznych). Uszkodzeniu ulega również kora mózgowa, pień mózgu i rogi przednie rdzenia kręgowego. W ciągu kilku lat postępujące ALS prowadzi do śmierci wskutek niewydolności układu oddechowego. Choroba pojawia się średnio około 50 roku życia u 1-2 osób na 100 000 rocznie. Większość przypadków ALS określa się jako sporadyczne (SALS, ang. *sporadic ALS*), zaś część, tj. około 10% jako rodzinne (FALS, ang. *familial ALS*) [59,60]. Około 20% chorych na FALS posiada mutacje w genie kodującym dysmutazę nadadtlenkową (SOD1). Jest to enzym, katalizujący reakcję: $2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ Istnieje ścisła zależność między istnieniem zmutowanych form dysmutazy a aktywacją szlaków kinaz białkowych MAP prowadzącą do apoptozy neuronów motorycznych. Wykazano, że nieprawidłowe formy SOD1 powodują powstanie warunków stresowych w siateczce śródplazmatycznej i aktywację odpowiedzi na nadmiar niesfałdowanych białek (UPR, ang. *unfolded protein response*). Powoduje to aktywację szlaków kinaz p38 i JNK, które z kolei powodują indukcję apoptozy [61]. Jak to się dzieje? Jak wiadomo, siateczka śródplazmatyczna jest miejscem gdzie trafiają nowosyntetyzowane białka przeznaczone do sekrecji lub wbudowania w błony komórkowe. W jej świetle znajdują się białka opiekuńcze, takie jak BiP/GRP78, GRP94, które nadają białkom właściwą konformację. Niesfałdowane lub nieprawidłowo zwinięte białka są z powrotem kierowane do cytoplazmy (retrotranslokacja), gdzie po ubikwitylacji ulegają degradacji w proteasomie (ERAD, ang. *ER-associated degradation*). Jeśli ilość nieprawidłowo sfałdowanych białek przewyższa zdolności kontrolne siateczki śródplazmatycznej, mówimy o warunkach stresowych. Nagromadzone w siateczce śródplazmatycznej nieprawidłowo zwinięte białka powodują oddysocjowanie od wewnętrznej powierzchni błony, białka GRP78, a tym samym od znajdujących się w niej białek ATF6, PERK oraz IRE1, powodując ich aktywację. Białko ATF6 jako czynnik transkrypcyjny powoduje zwiększoną ekspresję genów niektórych białek opiekuńczych, np. GRP78. PERK z kolei jest kinazą serynowo-treoninową, która fosforyluje podjednostkę α czynnika inicjacji translacji eIF2, co skutkuje zahamowaniem syntezy większości białek. W wyniku aktywności ATR1 i PERK ma więc miejsce zmniejszenie zawartości nieprawidłowo zwiniętych białek w świetle siateczki śródplazmatycznej. Aktywacja IRE-1 ma także wpływ na zahamowanie translacji białek. Ponadto IRE1 powoduje aktywację szlaku: TRAF2-ASK1-MKK4/7-JNK, a więc szlaku kinaz białkowych MAP, który indukuje apoptozę [62-64]. Tak więc aktywacja UPR prowadzi do redukcji stresu w RE, co sprzyja przeżyciu. Jednak przedłużający się stres może prowadzić do apoptozy, poprzez indukcję CHOP, aktywację

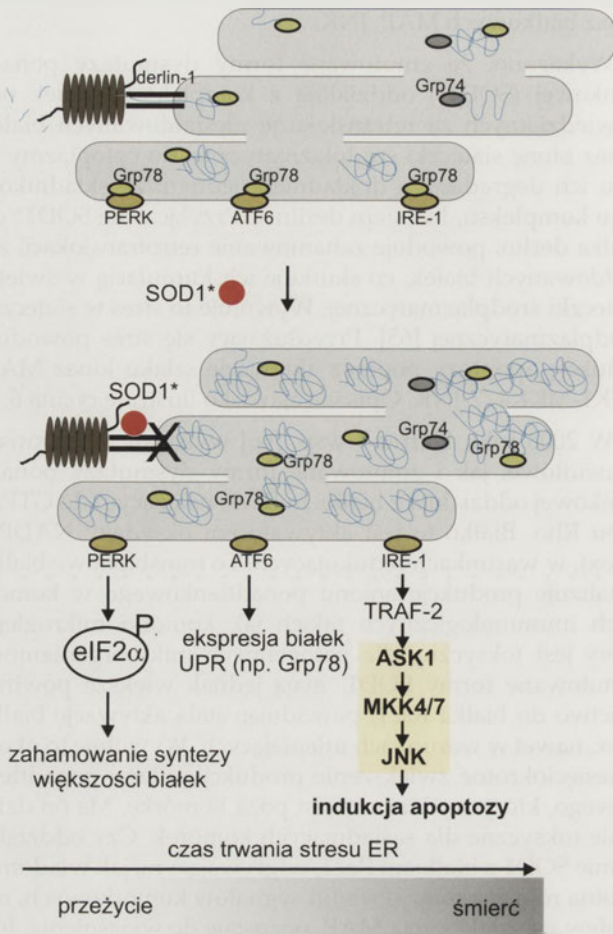
kinazy białkowych MAP, JNK.

Wykazano, że zmutowane formy dysmutazy nadadtlenkowej (SOD1*) oddziałują z kompleksem białek odpowiedzialnych za retranslokację niesfałdowanych białek przez błonę siateczki śródplazmatycznej do cytoplazmy w celu ich degradacji, a dokładnie z jednym ze składników tego kompleksu, białkiem derlin-1. Przyłączenie SOD1* do białka derlin, powoduje zahamowanie retrotranslokacji źle sfałdowanych białek, co skutkuje ich kumulacją w świetle siateczki śródplazmatycznej. Wywołuje to stres w siateczce śródplazmatycznej [65]. Przedłużający się stres powoduje indukcję apoptozy poprzez aktywację szlaku kinaz MAP: ASK1-MKK4/7-JNK. Opisane zjawisko ilustruje rycina 6.

W 2008 roku Harraz i wsp. [66] wykazali, że zarówno prawidłowe, jak i zmutowane formy dysmutazy nadadtlenkowej oddziałują z białkiem Rac1, należącym do GTPazy typu Rho. Białko to jest aktywatorem oksydazy NADPH (Nox), w warunkach redukujących. To transbłonowe białko katalizuje produkcję anionu nadadtlenkowego w komórkach immunologicznych takich jak komórki mikrogleju, który jest toksyczny dla patogennych mikroorganizmów. Zmutowane formy SOD1, mają jednak większe powinowactwo do białka Rac1, powodując stałą aktywację białka Nox, nawet w warunkach utleniających. Wywołuje to około dziesięciokrotne zwiększenie produkcji anionu nadadtlenkowego, który wydzielany jest poza komórkę. Ma on działanie toksyczne dla sąsiadujących komórek. Czy oddziaływanie SOD1 z białkiem Rac1, odgrywającym, jak wiadomo, istotną rolę w przekazywaniu sygnałów komórkowych, ma wpływ na szlaki kinaz MAP, pozostaje do wyjaśnienia. Jest to prawdopodobne, wykazano bowiem ścisłą korelację pomiędzy obecnością zmutowanych form SOD1, a aktywnością szlaku p38 oraz JNK w neuronach motorycznych i komórkach mikrogleju. Wykazano, że kinazy te powodują nieprawidłową fosforylację neurofilamentów, co prowadzi do ich agregacji i zaburzenia funkcji cytoszkieletu neuronów motorycznych rdzenia kręgowego, przyczyniając się do ich degradacji [67,68]. Ponadto aktywna forma kinazy p38, powoduje aktywację proapoptotycznego szlaku związanego z receptorem Fas w neuronach motorycznych. Ta kinaza MAP aktywuje czynnik transkrypcyjny genu syntazy tlenu azotu, który z kolei indukuje syntezę ligandu receptora Fas (FasL). Przyłączenie FasL do Fas prowadzi do powstania kompleksu Disc (ang. *Death-inducing signaling complex*), indukując apoptozę (Ryc. 7) [43,69,70].

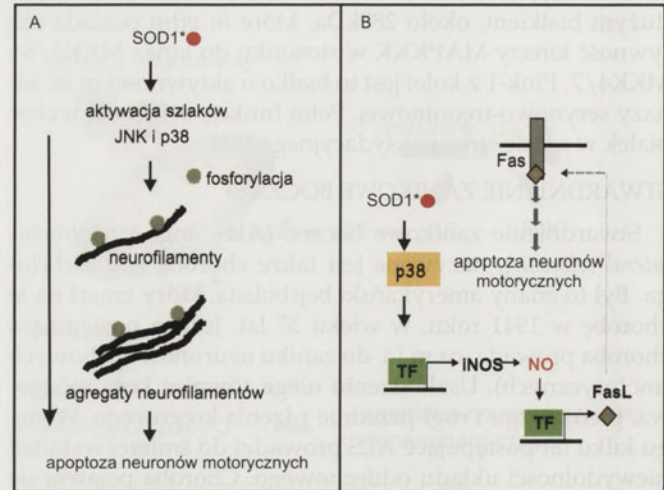
PODSUMOWANIE

Przekazywanie sygnałów jest niezbędnym elementem utrzymania homeostazy organizmów w zmieniających się warunkach środowiska. Rodzaj i mechanizm tego procesu zależy od stopnia złożoności danego organizmu. Jednym z istotnych elementów regulującym aktywność białek jest ich odwracalna fosforylacja katalizowana przez kinazy białkowe. U bakterii dominują dwuskładnikowe systemy regulacyjne związane z fosforylacją reszt histydyny i kwasu asparaginowego, choć posiadają one również enzymy modyfikujące łańcuchy białkowe w resztach serynowych, treoninowych, a nawet tyrozynowych. Komórki eukariotyczne wykształciły niezwykle bogatą rodzinę kinaz serynowo-treoninowych oraz tyrozynowych, które są w stanie



Rycina 6. Zmutowane formy SOD1 indukują stres siateczki śródplazmatycznej. Przyłączają się do białka derlin-1, składnika kompleksu, przez który transportowane są nieprawidłowe białka przeznaczone do degradacji. Nagromadzenie nieprawidłowo sfaldowanych białek powoduje tzw. stres siateczki śródplazmatycznej i indukuje mechanizmy odpowiedzi. Jednym z mechanizmów aktywowanych w odpowiedzi na przedłużający się stres siateczki śródplazmatycznej jest aktywacja szlaku kinaz białkowych MAP, JNK. W wyniku tego indukowana jest apoptoza. Więcej szczegółów znajduje się w tekście. Na podstawie [61,64], zmodyfikowane.

sprościć ich zapotrzebowaniu na komunikację, nie tylko ze środowiskiem zewnętrznym, ale z innymi komórkami tego samego organizmu. Dlatego wraz ze wzrostem stopnia złożoności danego organizmu eukariotycznego obserwuje się coraz większą liczbę genów kodujących białka szlaków sygnałowych. O istotnej roli, jaką te szlaki sygnałowe odgrywają u ludzi, świadczy liczba i powaga chorób związanych z nieprawidłowym funkcjonowaniem szlaków kinaz MAP. Niekontrolowana proliferacja komórek prowadzi do nowotworzenia, zaś dysfunkcje szlaków odpowiedzialnych za reakcje na warunki stresowe – do powstania toksycznych warunków indukujących apoptozę. W przypadku obumierania komórek nerwowych mamy do czynienia z tzw. chorobami neurozwyrodnieniowymi jak ALS, choroba Alzheimera czy Parkinsona. Wszystkie wymienione choroby charakteryzuje obecność białek o niewłaściwej konformacji oraz stan zapalny mózgu [71]. Stan ten wyraża się aktywacją komórek mikrogleju, syntezą mediatorów stanu zapalnego i tworzeniem wolnych rodników, szkodliwych dla komórek nerwowych. Stan zapalny to odpowiedź organizmu na uszkodzenie lub infekcję, mająca na celu ochronę tkanki lub narządu. Przedłużający się stan zapalny mózgu



Rycina 7. (A) Szlaki kinaz białkowych MAP w przebiegu ALS. Aktywacja kinazy p38 i JNK powoduje fosforylację neurofilamentów, które tworząc agregaty, powodują dysfunkcję cytoszkieletu, zmniejszając szansę komórki na przeżycie. (B) Kinaza MAP, p38 aktywuje ekspresję genu syntazy tlenku azotu, który z kolei indukuje syntezę białka FasL. Związanie tego białka do receptora indukuje apoptozę. Na podstawie [43].

może jednak być szkodliwy i prowadzić do neurodegeneracji. Być może zastosowanie kliniczne inhibitorów szlaków przekazywania sygnałów komórkowych, w tym szlaków kinaz białkowych MAP dałoby nadzieję na zahamowanie stanu zapalnego mózgu. Chroniłoby to przed postępującą neurodegeneracją. Jednak z uwagi na udział szlaków kinaz białkowych MAP w regulacji wielu procesów w różnych narządach nie jest to proste. Inhibitory te powinny bowiem hamować izoformy kinaz, specyficzne dla danego organu, nie zakłócając innych procesów niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Jak choćby można przywołać próby zastosowania inhibitorów szlaku JNK np. związek o nazwie CEP-1347. Jest to inhibitor kompetycyjny kinaz MLK (kinazy MAPKKK w szlaku JNK), tj. współzawodniczy z ATP o miejsce wiązania do MLK. Wykazano, że u myszy i małp, związek ten ma działanie neuroprotektoryjne. Obecnie trwają badania kliniczne III fazy nad zastosowaniem tego związku w terapii choroby Alzheimera i Parkinsona [73]. Kolejny związek hamujący aktywność szlaku JNK to SP600125, mający także działanie neuroprotektoryjne, co wykazano na modelach zwierzęcych. Prowadzone są również próby z zastosowaniem inhibitorów peptydowych, zawierających motywy JBD (ang. *JNK-binding domains*). Motywy te zawierają białka, które wiążą się do kinazy JNK np. c-Jun czy JIP-1. Istota działania tych inhibitorów polega na blokowaniu dostępu substratów do kinazy JNK, co uniemożliwia ich fosforylację. Więcej informacji na temat pierwszych prób zastosowania inhibitorów znajdzie czytelnik w pracach [72-74].

PIŚMIENICTWO

1. Marina A, Waldburger CD, Hendrickson WA (2005) Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *EMBO J* 24: 4247-4259
2. Boutros T, Chevet E, Metrakos P (2008) Mitogen-activated protein (MAP) kinase/ MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev* 60: 261-310

3. Choi H-S, Kim J-R, Lee S-W, Cho K-H (2008) Why have serine/threonine/tyrosine kinases been evolutionarily selected in eukaryotic signaling cascades? *Comp Biol Chem* 32: 218-221
4. Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L (2000) Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif* 33: 341-365
5. Hanks SK, Hunter T (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9:576-596
6. Freestone P, Grant S, Toth I, Norris V (1995) Identification of phosphoproteins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 15: 573-580
7. Cozzzone AJ (1988) Protein phosphorylation in prokaryotes. *Ann Rev Microbiol* 42: 97-125
8. Munoz-Dorado J, Inouye S, Inouye M (1991) A gene encoding a protein serine-threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell* 67: 995-1006
9. Hanlon WA, Inouye M, Inouye S (1997) Pkn9, a Ser/Thr protein kinase involved in the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* 23: 459-471
10. Bakal CJ, Davies JE (2000) No longer an exclusive club: eukaryotic signaling domains in bacteria. *Trends Cell Biol* 10: 32-38
11. Phalip V, Li J-H, Zhang C-C (2001) HstK, a cyanobacterial protein with both a serine/threonine kinase domain and a histidine kinase domain: implication for the mechanism of signal transduction. *Biochem J* 360: 639-644
12. Miller M, Donat S, Rakette S, Stehle T, Kouwen TRHM, Diks SH, Dreisbach A, Reilman E, Gronau K, Becher D, Peppelenbosch MP, van Dijk JM, Ohlsen K (2010) Staphylococcal PknB as a first prokaryotic representative of the proline-directed kinases. *PLoS One* 5: e9057
13. Zimmer C (2009) On the origin of Eukaryotes. *Science* 325: 666-668
14. Margulis L, Dolan MF, Guerrero R (2000) The chimeric eukaryote: origin of the nucleus from the karyomastigont in amitochondriate protists. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6954-6959
15. Babik W (2009) Ewolucja genomów i powstawanie nowych genów. *Kosmos* 58: 385-393
16. Golik P (2009) Pochodzenie i ewolucja genomu mitochondrialnego. *Kosmos* 58: 547-554
17. Martin W (2010) Evolutionary origins of metabolic compartmentalization in eukaryotes. *Phil Trans R Soc B* 365: 847-855
18. Kutz D (1998) Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. *J Mol Evol* 46: 571-588
19. Clark-Lewis I, Sanghera JS, Pelech SL (1991) Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J Biol Chem* 266: 15180-15184
20. Kutz D, Burg M (1998) Evolution of osmotic stress signaling via MAP kinase cascades. *J. Exp Biol* 201: 3015-3021
21. Caffrey DR, O'Neill LAJ, Shields DC (1999) The evolution of the MAP kinase pathways: coduplication of interacting proteins leads to new signaling cascades. *J Mol Evol* 49: 567-582
22. Coulombe P, Meloche S (2007) Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1376-1387
23. Bohm M, Gamulin V, Schroder HC, Muller WEG (2002) Evolution of osmosensing signal transduction in Metazoa: stress-activated protein kinases p38 and JNK. *Cell Tissue Res* 308: 431-438
24. Galcheva-Gargova Z, Derijard B, Wu IH, Davis RJ (1994) An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* 265: 806-808
25. Han J, Lee J-D, Bibbs L, Ulevitch RJ (1994) A MAP kinase targeted by endotoxins and by hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265: 808-810
26. Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 50-83
27. Pertseva MN, Shpakov AO (2009) The prokaryotic origin and evolution of eukaryotic chemosignaling systems. *Neur Behav Physiol* 39: 793-804
28. Galimberti D, Scarpini E (2011) Progress in Alzheimer's disease. *J Neur* DOI 10.1007/s00415-011-6145-3
29. Swerdlow RH (2011) Alzheimer's disease pathologic cascades: who comes first, what drives what. *Neurotox Res* DOI 10.1007/s12640-011-9272-9
30. Swerdlow RH (2011) Brain aging. Alzheimer disease, and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1812: 1630-1639
31. Eisenhauer PB, Johnson RJ, Wells JM, Davies TA, Fine RE (2000) Toxicity of various amyloid β peptide species in cultured human blood-brain barrier endothelial cells: increased toxicity of dutch-type mutant. *J Neurosci Res* 60: 804-810
32. Johnson LV, Leitner WP, Rivest AJ, Staples MK, Radeke MJ, Anderson DH (2002) The Alzheimer's A β -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11830-11835
33. Gandy S (2005) The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 115: 1121-1129
34. Kametani F (2008) ϵ -secretase: reduction of amyloid precursor protein ϵ -site cleavage in Alzheimer disease. *Curr Alzheimer Res* 5: 165-171
35. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM (1996) RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer disease. *Nature* 382: 685-691
36. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM (2000) The biology of the receptor for advanced glycation end product and its ligands. *Biochim Biophys Acta* 1498: 99-111
37. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM (2001) The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 108: 949-955
38. Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjerkce RJ, Juhasz O, Crow MT, Tilton RG, Denner L (2001) Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor- κ B transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes* 50: 1495-1504
39. Li JH, Wang W, Huang XR, Oldfield M, Schmidt AM, Cooper ME, Lan HY (2004) Advanced glycation end products induce tubular epithelial-myofibroblast transition through the RAGE-ERK1/2 MAP kinase signaling pathway. *Am J Pathol* 164: 1389-1397
40. Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39
41. Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313: 1093-1097
42. Origlia N, Arancio O, Domenici L, Yan SS (2009) MAPK, β -amyloid and synaptic dysfunction: the role of RAGE. *Expert Rev Neurother* 9: 1635-1645
43. Kim EK, Choi EJ (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802: 396-405
44. Munoz L, Ammit AJ (2010) Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 58: 561-568
45. Peel AL, Sorscher N, Kim JY, Galvan V, Chen S, Bredesen DE (2004) Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: potential involvement of an APP-MAP kinase complex. *Neuromolecular Med* 5: 205-218
46. Galvan V, Banwait S, Spilman P, Gorostiza OF, Peel A, Ataide M, Crippen D, Huang W, Sidhu G, Ichijo H, Bredesen DE (2007) Interaction of ASK1 and the β -amyloid precursor protein in a stress-signaling complex. *Neurobiol Dis* 28: 65-75

47. Crosiers D, Theuns J, Cras P, van Broeckhoven C (2011) Parkinson disease: Insights in clinical, genetic and pathological features of monogenic disease subtypes. *J Clin Neuroanat* 42: 131-141
48. Kaźmierczak A, Adamczyk A, Strosznajder JB (2007) Udział α -synukleiny w funkcji układu dopaminergicznego. *Post Biol Kom* 34: 377-390
49. Saha AR, Ninkina NN, Hanger DP, Anderton BH, Davies AM, Buchman VL (2000) Induction of neuronal death by α -synuklein. *Eur J Neurosci* 12: 3073-3077
50. Cookson MR (2009) α -synuklein and neuronal cell death. *Mol Neurodegener* 4: 9
51. Miller RL, James-Kracke M, Sun GY, Sun AY (2009) Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochem Res* 34: 55-65
52. Klegeris A, Pelech S, Giasson BI, Maguire J, Zhang H, McGeer EG, McGeer PL (2008) α -synuklein activates stress signaling protein kinases in THP-1 cells and microglia. *Neurobiol Aging* 29: 739-752
53. Klegeris A, Giasson BI, Zhang H, Maguire J, Pelech S, McGeer PL (2006) α -synuklein and its disease-causing mutants induce ICAM-1 and IL-6 in human astrocytes and astrocytoma cells. *FASEB J* 20: 2000-2008
54. Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M, Ghafourifar P (2008) Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cell Mol Life Sci*. 65: 1272-1284
55. Petrucelli L, O'Farrell C, Lockhart PJ, Baptista M, Kehoe K, Vink L, Choi P, Wolozin B, Farrer M, Hardy J, Cookson MR (2002) Parkin protects against the toxicity associated with mutant α -synuklein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron* 36: 1007-1019
56. Jiang H, Ren Y, Zhao J, Feng J (2004) Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. *Hum Mol Genet* 13: 1745-1754
57. Xu J, Zhong N, Wang H, Elias JE, Kim CY, Woldman I, Pifl C, Gygi SP, Geula C, Yankner BA (2005) The Parkinson's disease-associated DJ-1 protein is a transcriptional co-activator that protects against neuronal apoptosis. *Hum Mol Genet* 14: 1231-1241
58. Jankowski M (2007) Rola szlaku JNK w rodzinnych postaciach choroby Parkinsona. *Postepy Biochem* 53: 297-303
59. Polymeridou M, Cleveland DW (2008) The curious ways of ALS. *Nature* 454: 284-285
60. Zinman L, Cudkowicz M (2011) Emerging targets and treatments in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 10: 481-490
61. Turner BJ, Atkin JD (2006) ER stress and UPR in familiar amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Mol Med* 6: 79-86
62. Rutkowski DT, Kaufman RJ (2004) A trip to ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 14: 20-28
63. Diehl JA, Fuchs SY, Koumenis C (2011) The cell biology of the unfolded protein response. *Gastroenterology* 141: 38-41
64. Sekine Y, Takeda K, Ichijo H (2006) The ASK1-MAP kinase signaling in ER stress and neurodegenerative diseases. *Cur Mol Med* 6: 87-97
65. Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T, Fukutomi H, Noguchi T, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H (2008) ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting derlin-1. *Genes Dev* 22: 1451-1464
66. Harrasz MM, Marden JJ, Zhou W, Zhang Y, Williams A, Sharov VS, Nelson K, Luo M, Paulson H, Schöneich C, Engelhardt JF (2008) SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J Clin Invest* 118: 659-670
67. Brownlee J, Yates A, Bajaj NP, Davis D, Anderton BH, Leigh PN, Shaw CE, Miller CC (2000) Phosphorylation of neurofilament heavy chain side-arms by stress activated protein kinase-1b/Jun N-terminal kinase-3. *J Cell Sci* 113: 401-407
68. Ackerley S, Grierson AJ, Banner S, Perkinson MS, Brownless J, Byers HL, Ward M, Thornhill P, Hussain K, Waby JS, Anderton BH, Cooper JD, Dingwall C, Leigh PN, Shaw CE, Miller CC (2004) p38 α stress-activated protein kinase phosphorylates neurofilaments and is associated with neurofilament pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci* 26: 354-364
69. Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyriere O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B (2002) Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. Potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35: 1067-1083
70. Raoul C, Buhler E, Sadeghi C, Jacquier A, Aebischer P, Pettmann B, Henderson CE, Haase G (2006) Chronic activation in presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice of a feedback loop involving Fas, Daxx, and FasL. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 6007-6012
71. Guenther I, Kędzierska-Mieszkowska S (2011) System kontroli jakości białek w cytoplazmie – rola białek opiekuńczych w biologii chorób neurodegeneracyjnych. *Postepy Biochem* 57: 274-282
72. Borsello T, Bonny C (2004) Use of cell-permeable peptides to prevent neuronal degeneration. *Trends Mol Med* 10: 239-244
73. Borsello T, Forloni G (2007) JNK Signalling: A possible target to prevent neurodegeneration. *Curr Pharm Des* 13: 1875-1886
74. Antoniou X, Falconi M, Di Marinob D, Borsello T (2011) JNK3 as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *J Alzh Disease* 24: 633-642

MAP kinase pathways - their evolution and role in some neurodegenerative diseases

Iwona Wojda 

Department of Immunobiology, Institute of Biology and Biochemistry, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, 19 Akademicka St., 20-033 Lublin, Poland

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

Key words: MAP kinases, evolution, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)

ABSTRACT

The scientific literature is rich in reports concerning the participation of MAP kinases in various aspects of the physiology of different organisms. There are, however few papers devoted to the evolution of these pathways. This paper offers a survey of the scientific literature describing how MAP kinase pathways have evolved. Why is the cascade of protein phosphorylation on serine, threonine and tyrosine residues more advantageous in Eucaryota than the two-component regulatory system, based on the phosphorylation of histidine and aspartic acid, which predominates in bacteria? How were these pathways formed and evolved? Finally, how important role do they play in the physiology of human organism? Disturbances in the proper functioning of the MAP kinase pathways lead to uncontrolled cell proliferation and the emergence of various diseases including cancer. Because the average life span has lengthened we hear more and more often about neurodegenerative diseases that lead to dementia or paralysis. Disturbances in the proper functioning of the MAP kinase pathways in neurodegenerative diseases have also been reported recently. Therefore, in this paper I present the current state of research on the dysfunction of these pathways in three diseases: Alzheimer's, Parkinson's and amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

STRESZCZENIE

Cząsteczki mikroRNA (miRNA) są małymi cząsteczkami RNA, pełniącymi kluczowe funkcje w regulacji wielu procesów komórkowych. Wiąże się z nimi nadzieje na rozwiązanie szeregu problemów współczesnej medycyny, biotechnologii i innych nauk biologicznych. Liczba projektów badawczych na ich temat, jak również publikacji, nieustannie rośnie, czemu towarzyszy przyrost danych oraz liczby baz danych. Aktualnie istnieje 51 baz danych miRNA, a ich liczba dynamicznie wzrasta, przez co coraz trudniej jest się po nich poruszać. Dodatkowo, niemałym problemem stały się takie zjawiska, jak niewystarczająca dokumentacja lub niska jakość danych czy interfejsu graficznego. Nadzieją na rozwiązanie tych problemów jest stale podnoszący się standard baz danych, tendencja do tworzenia zintegrowanych systemów bazodanowych, udostępniających dane zawarte w kilku tematycznych bazach danych w jednolitym formacie oraz systemów do automatycznego pozyskiwania informacji.

WPROWADZENIE

Cząsteczki miRNA są małymi, niekodującymi cząsteczkami RNA, pełniącymi liczne regulatorowe funkcje w komórkach zwierząt i roślin. miRNA regulują między innymi odpowiedź na stres środowiskowy [1], szlaki przekazywania sygnałów [2] czy procesy rozwojowe [3]. Liczne miRNA powiązane z chorobami u człowieka, takimi jak na przykład białaczka [4], rak trzustki [5] czy choroba Alzheimera [6]. Z tych powodów identyfikacja miRNA i poznawanie ich funkcji stało się niezwykle ważnym zagadnieniem nie tylko w biologii molekularnej, ale również w naukach medycznych i rolniczych.

Powstawanie dojrzałych cząsteczek miRNA przebiega w kilku etapach [7]. Najpierw gen miRNA ulega transkrypcji z udziałem polimerazy RNA II lub III. Powstały transkrypt, zwany pri-miRNA, podlega dalszej obróbce - cięciom katalitycznym, prowadzącym do otrzymania tzw. cząsteczki pre-miRNA, zwykle o długości 50-100 nukleotydów. Cząsteczka ta posiada charakterystyczną strukturę drugorzędową typu spinki do włosów (ang. *hairpin loop*, *stem-loop*), w której można wyróżnić część osiową (trzonek, ang. *stem*), zawierającą komplementarne do siebie fragmenty sekwencji oraz pętlę z niesparowanymi nukleotydami. Dojrzałe miRNA jest wycinane z części osiowej pre-miRNA, po czym wbudowane zostaje w kompleks wyciszający RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*), gdzie uczestniczy w procesach regulowania ekspresji genów na zasadzie cięcia docelowego mRNA bądź hamowania jego translacji.

W ciągu ostatniej dekady opracowano szereg algorytmów i programów komputerowych służących do identyfikacji i analizy funkcjonalnej miRNA *in silico* (metodami bioinformatycznymi). Jednocześnie pojawiły się innowacyjne techniki laboratoryjne, służące do odkrywania nowych miRNA, analizy ich poziomu ekspresji czy funkcji molekularnych. Skutkiem zwiększonego zainteresowania tematyką miRNA jest szybko narastająca ilość danych na ich temat. Znajduje to odzwierciedlenie w liczbie artykułów o miRNA, których w samym 2010 roku opublikowano 4012, wobec jedynie 5 w roku 2001 (Ryc. 1).

Głównym powodem tak dynamicznego przyrostu danych są analizy skoncentrowane na poszukiwaniach nowych miRNA, w oparciu o dane pochodzące z sekwencjonowania małych cząsteczek RNA technikami nowej generacji (NGS, ang. *Next Generation Sequencing*) oraz analizy *in silico* na poziomie genomów i transkryptomów. Znaczna ilość danych generowana jest również w trakcie komputerowych poszukiwań potencjalnych docelowych mRNA dla miRNA. Nie ulega zatem wątpliwości, że istnieje obecnie ogromne zapotrzebowanie na repozytoria, które pozwalałyby na przeglądanie, filtrowanie i analizę danych. W odpowiedzi na tę potrzebę powstało już 51 internetowych baz danych związanych z miRNA (PubMed, grudzień 2011), a ich liczba narasta coraz szybciej (Ryc. 2).

Michał Wojciech Szcześniak

Elżbieta Owczarkowska

Jakub Gapski

Izabela Makałowska

Pracownia Bioinformatyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

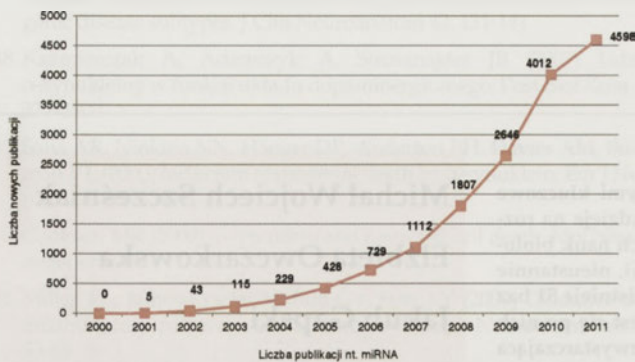
Pracownia Bioinformatyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań; tel. (61) 829 58 35; e-mail: izabel@amu.edu.pl

Artykuł otrzymano 12 grudnia 2011 r.
Artykuł zaakceptowano 21 stycznia 2012 r.

Słowa kluczowe: baza danych, mikroRNA, miRBase

Wykaz skrótów: EST – znaczniki sekwencji ulegających ekspresji; HMM – ukryte modele Markowa; NGS – sekwencjonowanie DNA nowej generacji; SVM – maszyna wektorów podpierających; UTR – region genu nieulegający translacji

Podziękowania: Badania mgr Elżbiety Owczarkowskiej są finansowane z grantu Fundacji na rzecz Nauki Polskiej nr MPD81, a mgr Michała Wojciecha Szcześniaka z grantu Narodowego Centrum Nauki nr 2011/01/N/NZ2/01653.



Rycina 1. Wzrost liczby publikacji na temat miRNA. Stan na grudzień 2011 r.

Niestety, przyrost liczby baz danych, choć ogólnie jest pozytywnym zjawiskiem, stwarza niemały kłopot użytkownikowi, chcącemu otrzymać potrzebne informacje. Wielokrotnie, aby uzyskać dostęp do istniejących danych na temat interesującej nas cząsteczki miRNA, trzeba przeszukać kilka a nawet kilkanaście baz danych. Brakuje także repozytorium baz danych miRNA, dzięki któremu użytkownik mógłby poznać wszystkie dostępne źródła oraz dowiedzieć się jakiego rodzaju dane są zdeponowane w konkretnej bazie. Niniejsze opracowanie, będące przeglądem istniejących, opublikowanych baz danych miRNA, wychodzi naprzeciw potrzebom użytkowników.

ŹRÓDŁA INFORMACJI W BAZACH DANYCH miRNA

Ilość, jakość oraz charakter informacji gromadzonych w bazach danych miRNA ściśle zależy od metody, która posłużyła do ich otrzymania. Najogólniej, metody te można podzielić na *in silico* oraz eksperymentalne. Te pierwsze zwykle charakteryzują się wysoką czułością oraz niską specyficznością. Z tego powodu nieustannie rozwijane są nowe algorytmy pozwalające na obniżanie odsetka błędnych danych. Metody eksperymentalne z kolei, choć zwykle pozwalają na uzyskanie danych o dużo wyższej jakości, cechują się wysoką czaso- i pracochłonnością oraz wiążą się z wyższymi kosztami niż analizy bioinformatyczne. Dlatego jedynie znikoma część informacji zdeponowanych w bazach danych posiada potwierdzenie eksperymentalne.

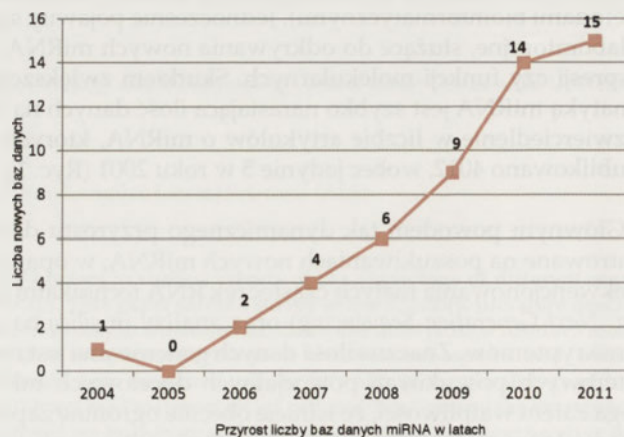
IDENTYFIKACJA miRNA

W przypadku metod *in silico* służących do identyfikacji miRNA, możemy wyróżnić dwie główne grupy. Pierwsza skupia metody oparte na zachowaniu sekwencji i/lub struktury drugorzędowej miRNA, pozwalające na identyfikację ortologów i paralogów znanych już miRNA; nie znajdują one jednak zastosowania w przypadku poszukiwania miRNA należących do nowych rodzin. Druga grupa to algorytmy oparte na metodach nauczania maszynowego, takich jak ukryte modele Markowa (HMM, ang. *Hidden Markov Models*), maszyna wektorów podpierających (SVM, ang. *Supported Vector Machine*) czy sieci neuronowe [8,9]. Ich zaletą jest zdolność do odkrywania nowych rodzin miRNA, jednakże muszą zostać odpowiednio wytrenowane na wysokiej jakości podzbiorze znanych miRNA – zarówno pro-

ces trenowania, jak i przygotowanie odpowiedniego zbioru jest sporym wyzwaniem dla bioinformatyków.

Metody bioinformatyczne, zwłaszcza w przypadku analiz przeprowadzanych na poziomie genomów, zwykle prowadzą do otrzymania znacznego odsetka fałszywie pozytywnych wyników. W ostatnich latach sposobem na zmniejszenie tego problemu stało się wsparcie wyników wygenerowanych poprzez analizę sekwencji genomowych danymi pochodzącymi z eksperymentów NGS, które dostarczają informacji na temat ekspresji - a więc istnienia - dojrzałego miRNA. Tak działają m.in. miRDeep [10] oraz miRanalyzer [11]. Istnieją również algorytmy, które poszukują miRNA w znacznikach sekwencji ulegających ekspresji (EST, ang. *Expressed Sequence Tags*) [12,13], bądź też wyłącznie w oparciu o dane z eksperymentów NGS [14]. W tym drugim przypadku zazwyczaj odkrywa się jedynie dojrzałe miRNA, jako że długość zsekwencjonowanych cząsteczek RNA jest mniejsza niż długość prekursorów miRNA.

Badania eksperymentalne, które coraz częściej są nierozdzielnie powiązane z analizami *in silico*, koncentrują się na dostarczeniu dowodu eksperymentalnego na istnienie miRNA, jak również służą do weryfikacji przewidzianych komputerowo funkcji miRNA. Eksperymentalne metody służące do wykazania obecności miRNA i poznania poziomu ich ekspresji muszą pokonać kilka trudności, takich jak mały rozmiar dojrzałych miRNA, brak ogonów poli(A) i znaczne podobieństwo sekwencji (a nawet identyczność) pomiędzy różnymi przedstawicielami tej samej rodziny miRNA. Wykorzystywane tutaj metody to qPCR (ang. *quantitative Polymerase Chain Reaction*), sekwencjonowanie, Northern blot oraz mikromacierze. Zostały one wykorzystane z powodzeniem w wielu badaniach, niemniej jednak posiadają liczne techniczne ograniczenia. Na przykład niektóre z metod wymagają dużych ilości początkowego materiału (np. > 10 µg całkowitego RNA), podczas gdy inne - wzbogacenia RNA we frakcję małych RNA [15]. Poza tym niektórych metod nie można stosować w eksperymentach wielkoskalowych, jak Northern blot, który jest czasochłonny i dodatkowo charakteryzuje się stosunkowo niską czułością.



Rycina 2. Wzrost liczby baz danych miRNA od 2004 r. Stan na grudzień 2011 r.

Poznanie docelowych mRNA dla miRNA ma kluczowe znaczenie podczas rozszyfrowywania ich funkcji regulatorowych. Stosowane tutaj metody bioinformatyczne można podzielić na dwie kategorie. Programy i metody należące do pierwszej z nich sprawdzają komplementarność pozycji 2-8 dojrzałego miRNA (tzw. regionu *seed*) z sekwencją 3'UTR regulowanego mRNA, energię swobodną związania się kompleksu RNA-RNA oraz stopień zachowania między gatunkami sekwencji dojrzałego miRNA i jego miejsca wiązania na mRNA. W oparciu o te kryteria działają DIANA-microT [16], RNAhybrid [17] czy microInspector [18].

Druga kategoria metod oparta jest na nauczaniu maszynowym. Sztandarowym przykładem jest tutaj program PicTar [19], który skanuje przyrównane do siebie sekwencje 3'UTR w poszukiwaniu zachowanych w ewolucji fragmentów, komplementarnych do regionu *seed* miRNA, a następnie filtruje duplekisy mRNA-3'UTR na podstawie ich stabilności termodynamicznej. Ostatecznie, każdy kandydat otrzymuje punktację wyliczaną z wykorzystaniem ukrytych modeli Markowa (HMM).

Docelowe mRNA dla miRNA, które zostały przewidziane bioinformatycznie, powinny zostać potwierdzone metodami laboratoryjnymi. Najlepiej, jeśli uda się wykazać, że para miRNA-mRNA spełnia wszystkie cztery poniższe kryteria [20].

a) Fizyczne oddziaływanie między miRNA a mRNA. Podejście eksperymentalne polega tutaj najczęściej na wkłoniowaniu całej sekwencji 3'UTR potencjalnego genu docelowego do plazmidu z otwartą ramką odczytu dla lucyferazy lub GFP (białko zielonej fluorescencji, ang. *Green Fluorescent Protein*). Plazmid i miRNA są transfekowane do komórek gospodarza, a następnie mierzy się aktywność lucyferazy bądź luminescencję.

b) Koekspresja *in vivo* mRNA i miRNA. Koekspresję można sprawdzać szeregiem metod służących do badania poziomu ekspresji mRNA, jak Northern blot czy qPCR. Z kolei by wykazać koekspresję tkankowospecyficzną lub nawet na poziomie pojedynczej komórki, stosuje się hybrydyzację *in situ*, wykorzystując m.in. znakowane digoksygeniną (DIG) antysensowne miRNA.

c) Wpływ miRNA na ilość produktu genu, będącego pod jego kontrolą. Jeśli mRNA jest pod kontrolą określonego miRNA, ilość powstającego z niego białka powinna maleć w obecności miRNA. By to sprawdzić, komórki transfekuje się plazmidem zawierającym sekwencję, która udaje docelowe mRNA, 'podkradając' miRNA. Skutkiem tego, poziom prawdziwego docelowego mRNA oraz odpowiedniego białka powinien być wyższy niż w przypadku próby kontrolnej bez plazmidu. Ilość białka sprawdza się metodą Western blot. Alternatywnie, do wykazania różnic w ekspresji białka można wykorzystać test immunoenzymatyczny ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

d) Regulacja mRNA poprzez miRNA wiąże się z modyfikacją odpowiedniej funkcji biologicznej.

W zależności od regulowanego mRNA, często możliwe jest zaobserwowanie odpowiednich zmian fenotypowych. By je dostrzec, stosuje się tutaj szeroki wachlarz technik biologii molekularnej, jako że zmiany mogą dotyczyć na przykład szlaków przekazywania sygnałów, podziałów komórek, ich różnicowania, programowanej śmierci czy migracji komórek.

BAZY DANYCH miRNA

Dzięki analizom bioinformatycznym i molekularnym posiadamy coraz więcej informacji o miRNA i ich roli w szlakach metabolicznych i regulatorowych. Towarzyszy temu zapotrzebowanie na klasyfikowanie danych i stworzenie szybkich systemów służących do ich przechowywania i przeszukiwania. W rezultacie powstały liczne internetowe bazy danych miRNA, które kolekcjonują sekwencje miRNA, a także różnego rodzaju dane dotyczące ich biologii, włączając regulowane przez nie geny czy profile ekspresji w różnych tkankach.

Poniżej omówionych zostało kilka baz danych miRNA, reprezentujących różne kierunki badań nad miRNA. Dodatkowo przedstawiono bazę miRNEST, która jest próbą integracji danych zawartych w różnych bazach danych w ramach jednolitego systemu bazodanowego. Krótka charakterystyka 51 opublikowanych do tej pory baz danych miRNA znajduje się w Tabeli 1.

miRBase

Baza miRBase jest referencyjnym repozytorium sekwencji miRNA [21]. W wersji 17 obejmuje 16 772 sekwencje prekursorów miRNA (pre-miRNA) i 19 724 sekwencje dojrzałych miRNA ze 153 gatunków. Główne zadania spełniane przez tę bazę danych to utrzymywanie konsekwentnego systemu nazewnictwa nowych miRNA oraz pełnienie funkcji centralnego repozytorium opublikowanych sekwencji miRNA.

Każdy wpis w bazie, oprócz nazwy i sekwencji dojrzałego miRNA i pre-miRNA, zawiera numer dostępu, którego format jest stały i nie ulega zmianie pomiędzy wersjami bazy danych. W przypadku, gdy znane są sekwencje genomowe gatunku, udostępniane są współrzędne genomowe pre-miRNA. miRNA są dzielone na rodziny, w których obrębie znajdują się homologiczne geny miRNA. Użytkownik korzystający z miRBase może uzyskać dostęp do danych, poprzez i) przeglądanie wszystkich dostępnych wpisów w bazie, ii) przeszukiwanie na podstawie podobieństwa do zadanej sekwencji, iii) podanie przedziałów współrzędnych genomowych, iv) wyszukiwanie z użyciem słów kluczowych, v) masowe ściągnięcie wszystkich dostępnych danych. miRBase znajduje się pod adresem <http://www.mirbase.org/>.

miRNEST

miRNEST [12] kolekcjonuje zwierzęce, roślinne i wirusowe miRNA. Centralną część tej bazy danych stanowią 10 004 miRNA ze 199 gatunków roślin oraz 221 gatunków zwierząt, zidentyfikowane metodą bioinformatyczną. Poszukiwanie nowych miRNA zostało przeprowadzone z wykorzystaniem sekwencji EST w oparciu o zachowanie

sekwencji dojrzałego miRNA (identyfikacja homologów znanych już miRNA). W przypadku 29 gatunków do pre-miRNA zmapowano odczyty pochodzące ze 192 bibliotek małych RNA pobranych z bazy GEO (ang. *Gene Expression Omnibus*) [22]. Dodatkowo, miRNEST został wyposażony w dane pochodzące z 13 zewnętrznych baz danych miRNA oraz dwu publikacji. Dane te dotyczą sekwencji miRNA (miRBase [21], microPC [13], PMRD [23]), ich ekspresji (phenomiR [24], dbDEMC [25]), polimorfizmów (Patrocles [26]), docelowych mRNA i funkcji miRNA (miRDB [27], miRTarBase [28], miRecords [29], PMRD [23], ASRP [30]), regulacji miRNA i ich promotorów (dPORE-miRNA [31], PMRD [23]), genomiki (CoGemiR [32]) oraz imprintingu (ncRNAimprint [33]). Wszystko to sprawia, że miRNEST jest obecnie największym repozytorium miRNA, obejmującym 544 gatunki, gromadzącym dane pochodzące z wielu źródeł i udostępniającym je w jednolitym formacie. Istnieje tutaj możliwość przeszukiwania i przeglądania danych, a także wykonywania podstawowych analiz, takich jak przeszukiwanie programem BLASTN [34] czy też przyrównanie wielu sekwencji programem ClustalW [35]. Baza jest dostępna pod adresem <http://mirnest.amu.edu.pl>.

miRecords

Baza miRecords [29] jest zintegrowanym repozytorium informacji o interakcjach miRNA - gen docelowy u zwierząt. Dostępna pod adresem <http://mirecords.biolead.org> baza podzielona jest na dwie części, jedna jest poświęcona miejscom docelowym miRNA, które zostały potwierdzone eksperymentalnie, a druga - miejscom przewidzianym *in silico*. W części poświęconej potwierdzonym miejscom docelowym zdeponowane są informacje dotyczące 2 286 interakcji pomiędzy 548 miRNA a 1 579 genami docelowymi w 9 gatunkach zwierząt. Dane te pozyskano z literatury. Szczególny nacisk kładziony jest na systematyczną i dobrze zorganizowaną dokumentację eksperymentalnych dowodów na istnienie interakcji pomiędzy miRNA a danym genem. Druga część bazy miRecords poświęcona jest miejscom docelowym przewidzianym za pomocą aż 11 różnych programów bioinformatycznych (Tab. 1, pozycja 16). Dostęp do informacji o potwierdzonych i przewidzianych miejscach docelowych możliwy jest poprzez wyszukiwarki umieszczone na głównej stronie bazy. Interakcji miRNA-gen można szukać poprzez wprowadzenie nazwy gatunku, nazwy miRNA oraz opcjonalnie nazwy bądź numeru dostępu genu docelowego. Na stronie wyników wyszukiwania w każdym wierszu zawarta jest nazwa miRNA, nazwa i numer identyfikacyjny docelowego genu w bazie RefSeq [36], odnośnik do szczegółowych danych na temat interakcji miRNA z genem docelowym oraz informacje na temat interakcji miRNA-gen wygenerowane przez każdy z 11 programów. Główna strona bazy miRecords umożliwia dostęp do dokumentacji projektu, jak również pozwala ściągnąć zawartość bazy w postaci arkusza programu Excel.

miR2Disease

Baza miR2Disease [37] jest repozytorium informacji na temat regulowania genów przez miRNA w różnych chorobach u człowieka. W tej adnotowanej przez kuratorów bazie znajdują się 3 273 powiązania pomiędzy 349 sekwencjami miRNA a 163 chorobami, wprowadzone na podstawie przeanalizowania ponad 100 artykułów z serwisu PubMed.

Każdy wpis zawiera szczegółowe informacje o związku miRNA-choroba, takie jak numer identyfikacyjny miRNA (ID), nazwa choroby, krótki opis występującego związku, wzór ekspresji miRNA i sposób w jaki analizowano ekspresję miRNA, eksperymentalnie potwierdzone docelowe mRNA dla miRNA oraz odnośniki do literatury. Wszystkie wpisy odnośnie terminologii chorób zostały zorganizowane według kontrolowanego słownictwa medycznego wykorzystującego Jednolity System Języka Medycznego (UMLS, ang. *Unified Medical Language System*) [38]. Oprócz łatwego w obsłudze systemu wyszukiwania za pomocą miRNA ID, nazwy choroby lub genów będących celem dla miRNA, prezentowane są użytkownikowi odnośniki do innych baz danych miRNA, zawierających dalsze informacje o wyszukiwanej frazie lub miRNA ID. Dodatkową zaletą systemu zaimplementowanego w miR2Disease jest funkcja przeszukiwania rozmytego (ang. *fuzzy search*), pozwalająca w połączeniu z kontrolowanym słownictwem medycznym na znalezienie w bazie informacji o związku miRNA-choroba nawet w przypadku, gdy użytkownik nie zna dokładnej nazwy choroby zapisanej w bazie danych. Użytkownik ma ponadto możliwość przesłania własnych informacji o powiązaniach miRNA-choroba, które po analizie przez kuratorów bazy mogą zostać dodane do miR2Disease. Baza miR2Disease jest dostępna pod adresem <http://www.mir-2disease.org/>.

PhenomiR

Baza PhenomiR (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/phenomir>) jest źródłem informacji o ekspresji miRNA w chorobach i procesach biologicznych [24]. Zawarte w bazie dane pochodzą z 296 artykułów opisujących 542 przypadki deregulacji miRNA. Każdy przypadek zapisywany jest w bazie danych z takimi informacjami na temat miRNA i warunków eksperymentu, jak charakter zmiany ekspresji miRNA (wzrost lub spadek), metoda eksperymentalna (mikromacierze, RT-PCR, Northern blot), wskaźnik zmiany poziomu ekspresji miRNA czy pochodzenie próbki biologicznej. Każdemu wpisowi przyporządkowany jest numer PubMed ID oraz odnośnik do odpowiedniej publikacji w serwisie PubMed. Do adnotacji miRNA wykorzystane zostały dane z miRBase [21]. Adnotację chorób przeprowadzono w oparciu o OMIM Morbid Map (ang. *Online Mendelian Inheritance in Man Morbid Map*) [39], alfabetyczny spis chorób opisanych w OMIM. Przewagą OMIM Morbid Map nad takimi słownikami chorób, jak DO (ang. *Disease Ontology*) lub MeSH (ang. *Medical Subject Heading*) jest zawarcie dodatkowych informacji dotyczących choroby, wliczając cechy kliniczne, genetykę populacji i powiązane z nią geny. Adnotację procesów biologicznych przeprowadzono zgodnie z terminami zawartymi w Gene Ontology [40], natomiast w przypadku linii komórkowych i tkanek - wykorzystując BTO (ang. *Brenda Tissue Ontology*) [41].

INNE BAZY DANYCH miRNA

W Tabeli 1 wyszczególnionych zostało 51 baz danych poświęconych miRNA. Oprócz nich istnieją bazy danych o szerszym zakresie gromadzonych danych, które gromadzą dane na temat miRNA, jednak nie jest to podstawowe zadanie, jakie spełniają. Należy tutaj wspomnieć przede wszystkim przeglądarki genomowe (UCSC Genome Browser [42],

Tabela 1. Istniejące bazy danych miRNA.

Nr	Nazwa bazy danych	Gatunki (liczba)	Rodzaj danych	Metody i źródła danych	PMID*	
Sekwencje miRNA	1	miRBase	zwierzęta, rośliny, wirusy (153)	opublikowane miRNA, referencyjne źródło adnotacji miRNA	literatura, dane od użytkowników, program RNAfold	20205188
	2	PMRD	rośliny (123)	przewidziane <i>in silico</i> miRNA, ich ekspresja i mRNA docelowe	literatura, eksperymenty mikromacierzowe	19808935
	3	microPC	rośliny (125)	przewidziane <i>in silico</i> miRNA	algorytm do identyfikacji miRNA w sekwencjach EST	19660144
	4	miOrtho	zwierzęta (46)	przewidziane <i>in silico</i> miRNA	programy: R-COFFEE, RNAplfold, RNAalifold	18927110
	5	Vir-Mir db	wirusy (1491)	przewidziane <i>in silico</i> miRNA	program Srnalooop, baza danych NCBI	17702763
	6	miRNAMap	zwierzęta (13)	potwierdzone eksperymentalnie miRNA i ich mRNA docelowe	programy: miRanda, RNAhybrid, TargetScan, eksperymenty qPCR	16381831
	7	GrapeMiRNA	winorośl	przewidziane <i>in silico</i> miRNA	program FindMiRNA	19563653
	8	miRNEST	zwierzęta, rośliny, grzyby (544)	miRNA przewidziane <i>in silico</i> i/lub potwierdzone eksperymentalnie, mRNA docelowe, polimorfizm i regulacja ekspresji miRNA	literatura, algorytm do identyfikacji miRNA w sekwencjach EST, 13 baz danych miRNA (patrz: podrozdział <i>miRNEST</i>), GEO, NCBI	22135287
Docelowe miRNA	9	miRWalk (dawniej: Argonaute)	człowiek, mysz, szczur	przewidziane oraz potwierdzone mRNA docelowe	bazy danych: GenBank, Ensembl, miRBase, programy: DIANA-microT, miRanda, miRDB, PicTar, PITA, RNA22, TargetScan/TargetScanS, miRWalk	21605702
	10	HOCTAR	człowiek	mRNA docelowe	programy: miRanda, TargetScan, PicTar.	21435384
	11	RepTar	człowiek, mysz	przewidziane <i>in silico</i> mRNA docelowe	nowy algorytm oparty na założeniu, że miRNA może posiadać więcej niż jedno miejsce wiązania do pojedynczej sekwencji UTR	21149264
	12	miRTarBase	zwierzęta, rośliny, wirusy (14)	mRNA docelowe	literatura	21071411
	13	miRGator	człowiek, mysz	mRNA docelowe miRNA i ich ekspresja, powiązania miRNA z chorobami	bazy danych: PhenomiR, GEO, ArrayExpress, programy: targetScan, PITA, miRanda, miRbridge	21062822
	14	starBase	człowiek, mysz, <i>C. elegans</i> , rzodkiewnik pospolity, ryż, winorośl	mRNA docelowe	eksperymenty CLIP-Seq i Degradome-Seq	21037263
	15	miRSel	człowiek, mysz, szczur	mRNA docelowe	bazy danych: HGNC, MGD, Entrez Gene, Swiss-Prot Protein Database, miRGen, miRBase	20233441
	16	miRecords	zwierzęta (9)	mRNA docelowe	literatura, programy: DIANA-microT, MicroInspector, miRanda, miTarget, MirTarget2, Nbmirtar, PicTar, PITA, RNA 22, RNA Hybrid, TargetScan/TargetScanS	18996891
	17	TarBase	zwierzęta (6)	mRNA docelowe (tylko eksperymentalne)	literatura	18957447
	18	miRDB	człowiek, mysz, szczur, pies, kura	mRNA docelowe oraz adnotacja funkcjonalna miRNA	baza danych miRBase, nowy algorytm do szukania mRNA docelowych	18426918
	19	MicroRNA.org	człowiek, mysz, szczur, muszka owocowa, <i>C. elegans</i>	mRNA docelowe i ekspresja miRNA	literatura, program miRanda, bazy danych: miRBase, UCSC	18158296
	20	MiRonTop	człowiek, mysz, szczur	mRNA docelowe	bazy danych: miRBase, NCBI, programy: Targetscan, MicroCosm Targets, Miranda, PicTar	20959382

21	CIRCUITSdb	człowiek, mysz	regulacja ekspresji miRNA przez czynniki transkrypcyjne	literatura, bazy danych: TransmiR, TarBase, Myc Target Gene	20731828
22	mESAdb	człowiek, mysz, danio przegowany	ekspresja miRNA i ich mRNA docelowych	bazy danych: Ensembl, miRBase, microCosm, HUGO, KEGG, GO	21177657
23	miRNeye	mysz	ekspresja miRNA w oku myszy	eksperyment: hybrydyzacja RNA <i>in situ</i> z wykorzystaniem modyfikowanych nukleotydów LNA	21171988
24	dbDEMC	człowiek	ekspresja miRNA w tkankach nowotworowych	literatura	21143814
25	miReg	człowiek	regulacja ekspresji genów miRNA	literatura	20693604
26	PuTmiR	człowiek	regulacja ekspresji genów miRNA przez czynniki transkrypcyjne	bazy danych: miRBase, UCSC	20398296
27	S-MED	człowiek	ekspresja miRNA w sarkomie	eksperymenty z wykorzystaniem systemu BeadArrays	20212452
28	PhenomiR	człowiek	ekspresja miRNA w chorobach i różnych procesach biologicznych	literatura, bazy danych: OMIM Morbid Map, Gene Ontology, BRENDA Tissue Ontology	20089154
29	miRGen	zwierzęta (11)	regulacja ekspresji miRNA, polimorfizm, mRNA docelowe	literatura, program mathTM tool (szukanie TFBS), bazy danych: mammalian miRNA expression atlas, UCSC, dbSNP	19850714
30	TransmiR	zwierzęta	regulacja ekspresji miRNA przez czynniki transkrypcyjne	literatura, baza danych UCbase & miRfunc	19786497
31	miR2Disease	człowiek	ekspresja miRNA w chorobach	literatura, baza danych TarBase	18927107
32	GenomeTraFaC	człowiek, mysz	regulacja ekspresji miRNA przez czynniki transkrypcyjne	bazy danych: Homologene, NCBI, MGI, miRBase	17178752
33	miSolRNA	pomidor, rzodkiewnik pospolity	ekspresja miRNA oraz ich funkcje w szlakach metabolicznych	literatura	21059227
34	MirZ (dawniej: mammalian miRNA expression atlas)	człowiek, mysz, szczur	ekspresja miRNA	eksperymenty sekwencjonowania w technologii NGS	17604727
35	mirEX	rzodkiewnik pospolity	ekspresja miRNA	eksperymenty real-time PCR	22013167
36	mimiRNA	człowiek	ekspresja miRNA	literatura, programy: TargetScan, RNA22, PicTar, algorytm ExParser, bazy danych: Hypertext cell line database, mammalian miRNA expression atlas, GEO	19933167
37	mirConnX	człowiek, mysz	regulacja ekspresji miRNA	bazy danych: TarBase, miRBase, DBTSS, UCSC, The Eukaryotic Promoter Database, programy: CoreBoost_HM, PITA, miRANDA, TargetScan, RNAhybrid, Pictar	21558324
38	miRvar	człowiek	polimorfizm i jego funkcjonalne konsekwencje	literatura, bazy danych: SNPdb, UCSC Genome Browser, miRBase, programy: PHDcleav, RISCbinder	21618345
39	Patrocles	zwierzęta (7)	polimorfizm miRNA i mRNA docelowych	literatura, bazy danych: miRBase, Ensembl, program RNAfold	19906729
40	PolymiRTS	człowiek, mysz	polimorfizm w mRNA docelowych	bazy danych: dbSNP, miRBase	17099235
41	dPORE-miRNA	człowiek	polimorfizm i regulacja ekspresji miRNA	bazy danych: UCSC, PhenomiR, Tarbase, KEGG, program BIOBASE MATCH	21326606
42	dbSMR	człowiek	polimorfizm miRNA	bazy danych: miRBase, Ensembl, programy: miRanda, RNAHybrid, TargetScan	19371411

Funkcje	43	Ubase & miRfunc	człowiek, mysz, szczur	funkcje miRNA; konserwacja sekwencji miRNA	bazy danych: miRBase, UCSC, NCBI	18945703
	44	miRNApath	człowiek, mysz, szczur, kura	udział miRNA w ścieżkach metabolicznych	bazy danych: miRBase, miRGen, miRGen, KEGG	18058708
	45	miRò	człowiek	powiązania miRNA-fenotyp	bazy danych: miRBase, mammalian miRNA expression atlas, miRecords, NCBI, GO, Genetic Association Database, programy: TargetScan, PicTar, miRanda	20157481
	46	miREnvironment	zwierzęta, rośliny (17)	powiązania miRNA-fenotyp	literatura	21984757
	47	miTALOS	człowiek, mysz	udział miRNA w szlakach sygnalizacyjnych	programy: TargetScan, TargetScan, PicTar, Pita, RNA22, bazy danych: KEGG, NCBI	21441347
Inne	48	IntmiR	człowiek, mysz	intronowe miRNA, ich mRNA docelowe i deregulacja w chorobach	brak danych	21423893
	49	CoGemiR	zwierzęta (36)	genomika i konserwacja sekwencji miRNA	bazy danych: miRBase, Ensembl, SymAtlas, CoGemiR, program miRNAMiner	18837977
	50	AntagomirBase	człowiek	antagomiry (cząsteczki służące do wyciszenia ekspresji genów miRNA)	programy: Sfold, mfold	21904438
	51	HNOCDB	człowiek	miRNA powiązane z nowotworami głowy i szyi oraz nowotworem szczęki	literatura	22024348

Bazy danych podzielono na pięć kategorii, w zależności od charakteru przechowywanych w nich danych. Dodatkowo wyszczególniono kategorię *Inne* dla baz IntmiR, CoGemiR, AntagomirBase i HNOCDB ze względu na unikalny charakter danych. *PMID - PubMed ID, identyfikator publikacji w serwisie PubMed.

Map Viewer [43] i Ensembl [44]), które pozwalają śledzić otoczenie genowe pre-miRNA, choć prawie zawsze informacja na temat budowy genu miRNA nie jest dostępna. W bazie danych RFAM [45], która gromadzi dopasowania wielu sekwencji różnych klas RNA, znajdują się zwierzęce, roślinne i wirusowe sekwencje pre-miRNA podzielone na 452 rodziny na podstawie podobieństwa sekwencji. deepBase [46] jest kolekcją małych regulatorowych RNA i gromadzi sekwencje miRNA należące do 7 gatunków. W bazie ASRP (ang. *Arabidopsis thaliana Small RNA Project*) można znaleźć krótkie sekwencje RNA z eksperymentów NGS zmapowane do pre-miRNA u *Arabidopsis thaliana* [30], zaś CSRDB (ang. *Cereal Small RNA Database*) kolekcjonuje małe niekodujące RNA, również z eksperymentów NGS, ale zidentyfikowane u ryżu i kukurydzy [47]. Dodatkowo, informacji o miRNA można szukać w bazach ENCODE [48], RNAdB [49] i ncRNAdB [50], kolekcjonujących niekodujące RNA oraz ncRNAimprint [51], bazie zawierającej RNA będące przedmiotem imprintingu.

ZAUTOMATYZOWANE PRZESZUKIWANIE I POBIERANIE DANYCH

Głównym problemem podczas korzystania z wielu baz danych jako źródła informacji o miRNA, jest brak jednolitego interfejsu wyszukiwania i pobierania potrzebnych informacji. Poszczególne serwery bazodanowe przechowują dane w charakterystyczny dla siebie sposób, co prowadzi do dużego zróżnicowania formatów plików i danych. Odpowiedzią na taki stan rzeczy jest miRMaid [52]. Jest to system ułatwiający wyszukiwanie i ściąganie potrzebnych informacji z różnych serwerów bazodanowych, zaprojektowany do współpracy z bazą miRBase, ale w przyszłości planowane jest rozszerzenie jego funkcjonalności na inne bazy

danych miRNA. miRMaid pozwala na dostęp do danych poprzez interfejs oparty na języku Ruby oraz poprzez sieć WWW, korzystając z interfejsu REST (ang. *Representational State Transfer*). Po zainstalowaniu na serwerze, miRMaid może automatycznie pobierać dane z obecnej wersji bazy miRBase, a następnie tworzyć lokalną bazę danych na komputerze użytkownika.

PODSUMOWANIE

Istnieje kilka czynników decydujących o użyteczności bazy danych dla społeczności naukowej. Są to przede wszystkim: jakość danych, ich ilość, oryginalność, jak również jakość interfejsu. Jakość danych mocno zależy od metody, która posłużyła do ich otrzymania. Jednakże dużą niedogodnością jest to, że nierzadko brak wymiernej, liczbowej informacji na temat jakości danych, jak np. wartości prawdopodobieństwa czy P-value, a jeśli jest, to w jednostkach, które nie pozwalają na porównania z podobnymi bazami danych. Poza tym, należy się liczyć z faktem, że bazy danych posiadają pewną ilość przykładów fałszywie pozytywnych oraz innego rodzaju błędów, zwłaszcza jeśli nie są sprawdzane przez kuratorów i nie są aktualizowane. Jeśli chodzi o rozmiar bazy danych, to istnieje obecnie tendencja do tworzenia dość dużych i wszechstronnych baz danych, jako że te o wąskiej tematyce, skoncentrowane na przykład na jednym gatunku i jednej tkance, jak np. miRNeye [53], są skierowane jedynie do wąskiego grona specjalistów, przez co ich użyteczność jest mocno ograniczona. W przypadku udostępniania przez bazę danych/serwis danych z zewnętrznych źródeł danych, powinny być one jasno wskazane. Ostatnim kryterium mówiącym o użyteczności bazy danych jest jakość interfejsu. Zdarza się, że baza gromadzi niezwykle ciekawe, oryginalne dane, jednakże posiada nie-

intuicyjny interfejs graficzny lub pojawiają się liczne błędy ze strony serwera czy przeglądarki internetowej. Stworzenie bazy danych, która posiadałaby wysokiej jakości, oryginalne dane dostępne poprzez prosty w obsłudze i nowoczesny interfejs graficzny jest trudnym zadaniem, z którym niektórzy twórcy baz danych miRNA sobie nie poradzili.

W chwili obecnej istnieje 51 baz danych miRNA i coraz szybciej powstają nowe. Są to głównie bazy danych sekwencji miRNA, ich mRNA docelowych, funkcji oraz poziomu ekspresji. Choć ciągle istnieją kierunki badań nad miRNA, które nie doczekały się bazy danych, np. budowa genów miRNA, ważna z punktu widzenia badań nad regulacją ekspresji miRNA oraz ich ewolucją, to liczba baz danych oraz ich niekonsekwentna struktura i niepełna dokumentacja sprawiają, że poruszanie się w tej materii wiąże się z coraz większymi trudnościami. Prawdopodobnym kierunkiem, w jakim może podążać tworzenie nowych baz danych, są zintegrowane systemy kolekcjonujące dane dostępne dotychczas w różnych repozytoriach i udostępniające je w zestandardyzowanym formacie poprzez jednolity interfejs graficzny.

PIŚMIENNICTWO

1. Leung AK, Sharp PA (2010) MicroRNA functions in stress responses. *Mol Cell* 40: 205-215
2. O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE (2011) MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 11: 163-175
3. Kedde M, Agami R (2008) Interplay between microRNAs and RNA-binding proteins determines developmental processes. *Cell Cycle* 7: 899-903
4. Schotte D, Pieters R, Den Boer ML (2012) MicroRNAs in acute leukemia: from biological players to clinical contributors. *Leukemia* 26: 1-12
5. Brabletz S, Bajdak K, Meidhof S, Burk U, Niedermann G, Firat E, Wellner U, Dimmler A, Faller G, Schubert J, Brabletz T (2011) The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signaling in cancer cells. *EMBO J* 30: 770-782
6. Yao J, Hennessey T, Flynt A, Lai E, Beal MF, Lin MT (2010) MicroRNA-related cofilin abnormality in Alzheimer's disease. *PLoS One* 5: e15546
7. Filip A (2007) MikroRNA: nowe mechanizmy regulacji ekspresji genów. *Postepy Biochem* 53: 413-419
8. Koronacki J, Cwik J (2008) Statystyczne systemy uczące się, Exit, Warszawa
9. Higgs PG, Attwood TK (2008) Bioinformatyka i ewolucja molekularna, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
10. Friedländer MR, Chen W, Adamidi C, Maaskola J, Einspanier R, Knespel S, Rajewsky N (2008) Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nat Biotechnol* 26: 407-415
11. Hackenberg M, Sturm M, Langenberger D, Falcón-Pérez JM, Aransay AM (2009) miRanalyzer: a microRNA detection and analysis tool for next-generation sequencing experiments. *Nucleic Acids Res* 37: W68-W76
12. Szcześniak MW, Deorowicz S, Gapski J, Kaczyński Ł, Makalowska I (2012) miRNEST database: an integrative approach in microRNA search and annotation. *Nucleic Acids Res* 40: D198-D204
13. Mhuantong W, Wichadakul D (2009) MicroPC (microPC): A comprehensive resource for predicting and comparing plant microRNAs. *BMC Genomics* 10: 366
14. Chi X, Yang Q, Chen X, Wang J, Pan L, Chen M, Yang Z, He Y, Liang X, Yu S (2011) Identification and Characterization of microRNAs from Peanut (*Arachis hypogaea* L.) by High-Throughput Sequencing. *PLoS One* 6: e27530
15. Chen J, Lozach J, Garcia EW, Barnes B, Luo S, Mikoulitch I, Zhou L, Schroth G, Fan JB (2008) Highly sensitive and specific microRNA expression profiling using BeadArray technology. *Nucleic Acids Res* 36: e87
16. Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, Alexiou P, Papadopoulos GL, Dalamagas T, Giannopoulos G, Goumas G, Koukis E, Kourtis K, Vergoulis T, Koziris N, Sellis T, Tsanakas P, Hatzigeorgiou AG (2009) DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res* 37: W273-W276
17. Krüger J, Rehmsmeier M (2006) RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res* 34: W451-454
18. Rusinov V, Baev V, Minkov IN, Tabler M (2005) MicroInspector: a web tool for detection of miRNA binding sites in an RNA sequence. *Nucleic Acids Res* 33: W696-W700
19. Chen K, Rajewsky N (2006) Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nat Genet* 38: 1452-1456
20. Kuhn DE, Martin MM, Feldman DS, Terry AV Jr, Nuovo GJ, Elton TS (2008) Experimental validation of miRNA targets. *Methods* 44: 47-54
21. Griffiths-Jones S (2004) The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32: D109-D111
22. Barrett T, Suzek TO, Troup DB, Wilhite SE, Ngau WC, Ledoux P, Rudnev D, Lash AE, Fujibuchi W, Edgar R (2005) NCBI GEO: mining millions of expression profiles—database and tools. *Nucleic Acids Res* 33: D562-D566
23. Zhang Z, Yu J, Li D, Zhang Z, Liu F, Zhou X, Wang T, Ling Y, Su Z (2009) PMRD: plant microRNA database. *Nucleic Acids Res* 38: D806-D813
24. Ruepp A, Kowarsch A, Schmidl D, Buggenthin F, Brauner B, Dunger I, Fobo G, Frishman G, Montrone C, Theis FJ (2010) PhenomiR: a knowledgebase for microRNA expression in diseases and biological processes. *Genome Biol* 11: R6
25. Yang Z, Ren F, Liu C, He S, Sun G, Gao Q, Yao L, Zhang Y, Miao R, Cao Y, Zhao Y, Zhong Y, Zhao H (2010) dbDEMC: a database of differentially expressed miRNAs in human cancers. *BMC Genomics* 11: S5
26. Hiard S, Charlier C, Coppieters W, Georges M, Baurain D (2010) Patrocles: a database of polymorphic miRNA-mediated gene regulation in vertebrates. *Nucleic Acids Res* 38: D640-D651
27. Wang X (2008) miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA* 14: 1012-1017
28. Hsu SD, Lin FM, Wu WY, Liang C, Huang WC, Chan WL, Tsai WT, Chen GZ, Lee CJ, Chiu CM, Chien CH, Wu MC, Huang CY, Tsou AP, Huang HD (2010) miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 39: D163-D169
29. Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T (2008) miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 37: D105-D110
30. Gustafson AM, Allen E, Givan S, Smith D, Carrington JC, Kasschau KD (2005) ASRP: the Arabidopsis Small RNA Project Database. *Nucleic Acids Res* 33: D637-D640
31. Schmeier S, Schaefer U, MacPherson CR, Bajic VB (2011) dPORE-miRNA: polymorphic regulation of microRNA genes. *PLoS One* 6: e16657
32. Maselli V, Di Bernardo D, Banfi S (2008) CoGemiR: a comparative genomics microRNA database. *BMC Genomics* 9: 457
33. Zhang Y, Guan DG, Yang JH, Shao P, Zhou H, Qu LH (2010) ncRNAimprint: a comprehensive database of mammalian imprinted noncoding RNAs. *RNA* 16: 1889-1901
34. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-402
35. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948
36. Pruitt KD, Tatusova T, Brown GR, Maglott DR (2012) NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy. *Nucleic Acids Res* 40: D130-D135
37. Jiang Q, Wang Y, Hao Y, Juan L, Teng M, Zhang X, Li M, Wang G, Liu Y (2009) miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res* 37: D98-D104

38. Lindberg C (1990) The Unified Medical Language System (UMLS) of the National Library of Medicine. *J Am Med Rec Assoc* 61: 40-42
39. Amberger J, Bocchini CA, Scott AF, Hamosh A (2009) McKusick's Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Nucleic Acids Res* 37: D793-D796
40. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 25: 25-29
41. Chang A, Scheer M, Grote A, Schomburg I, Schomburg D (2009) BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Res* 37: D588-D592
42. Dreszer TR, Karolchik D, Zweig AS, Hinrichs AS, Raney BJ, Kuhn RM, Meyer LR, Wong M, Sloan CA, Rosenbloom KR, Roe G, Rhead B, Pohl A, Malladi VS, Li CH, Learned K, Kirkup V, Hsu F, Harte RA, Guruvadoo L, Goldman M, Giardine BM, Fujita PA, Diekhans M, Cline MS, Clawson H, Barber GP, Haussler D, James Kent W (2012) The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2011. *Nucleic Acids Res* 40: D918-D923
43. Wolfsberg TG (2007) Using the NCBI Map Viewer to browse genomic sequence data. *Curr Protoc Bioinformatics* 1: 1.5
44. Hubbard T, Barker D, Birney E, Cameron G, Chen Y, Clark L, Cox T, Cuff J, Curwen V, Down T, Durbin R, Eyras E, Gilbert J, Hammond M, Huminecki L, Kasprzyk A, Lehvaslaiho H, Lijnzaad P, Melsopp C, Mongin E, Pettett R, Pocock M, Potter S, Rust A, Schmidt E, Searle S, Slater G, Smith J, Spooner W, Stabenau A, Stalker J, Stupka E, Ureta-Vidal A, Vastrik I, Clamp M (2002) The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Res* 30: 38-41
45. Griffiths-Jones S, Bateman A, Marshall M, Khanna A, Eddy SR (2003) Rfam: an RNA family database. *Nucleic Acids Res* 31: 439-441
46. Yang JH, Shao P, Zhou H, Chen YQ, Qu LH (2010) deepBase: a database for deeply annotating and mining deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 38: D123-D130
47. Johnson C, Bowman L, Adai AT, Vance V, Sundaresan V (2007) CSRDB: a small RNA integrated database and browser resource for cereals. *Nucleic Acids Res* 35: D829-D833
48. Rosenbloom KR, Dreszer TR, Long JC, Malladi VS, Sloan CA, Raney BJ, Cline MS, Karolchik D, Barber GP, Clawson H, Diekhans M, Fujita PA, Goldman M, Gravell RC, Harte RA, Hinrichs AS, Kirkup VM, Kuhn RM, Learned K, Maddren M, Meyer LR, Pohl A, Rhead B, Wong MC, Zweig AS, Haussler D, Kent WJ (2012) ENCODE whole-genome data in the UCSC Genome Browser: update 2012. *Nucleic Acids Res* 40: D912-D917
49. Pang KC, Stephen S, Engström PG, Tajul-Arifin K, Chen W, Wahlestedt C, Lenhard B, Hayashizaki Y, Mattick JS (2005) RNAdb - a comprehensive mammalian noncoding RNA database. *Nucleic Acids Res* 33: D125-D130
50. Szymanski M, Erdmann VA, Barciszewski J (2007) Noncoding RNAs database (ncRNAdb). *Nucleic Acids Res* 35: D162-D164
51. Zhang Y, Guan DG, Yang JH, Shao P, Zhou H, Qu LH (2010) ncRNAimprint: a comprehensive database of mammalian imprinted noncoding RNAs. *RNA* 16: 1889-1901
52. Jacobsen A, Krogh A, Kauppinen S, Lindow M (2010) miRMaid: a unified programming interface for microRNA data resources. *BMC Bioinformatics* 11: 29
53. Karali M, Peluso I, Gennarino VA, Bilio M, Verde R, Lago G, Dollé P, Banfi S (2010) miRNeye: a microRNA expression atlas of the mouse eye. *BMC Genomics* 11: 715

microRNA databases

Michał Wojciech Szcześniak, Elżbieta Owczarkowska, Jakub Gapski, Izabela Makałowska 

Laboratory of Bioinformatics, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University in Poznan, 89 Umultowska St., 61-614 Poznan, Poland

✉ e-mail: izabel@amu.edu.pl

Key words: database, microRNA, miRBase

ABSTRACT

microRNAs (miRNAs) are small RNAs that play key roles in regulation of cellular processes and therefore could largely contribute to solving many problems in medicine, biotechnology, and other biological sciences. As a result, the numbers of research projects and publications on miRNAs are constantly growing, which is accompanied by increasing amounts of new data and databases need to be created for data storage. There are 51 dedicated miRNA databases at the moment, what make it quite difficult for the users to find relevant data. Moreover, such problems as insufficient documentation, low quality of data or flaws in the graphical interface make the things even worse. However, there are positive signs, including standardization of database interfaces, a tendency to create integrated systems that collect data from a number of databases and present it in a uniform format, and emergence of systems for automated data search and download.

Agnieszka Dzedzic-Letka

Andrzej Ozyhar

Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50370 Wrocław

Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław; tel.: (71) 320 63 33; faks: (71) 320 63 37; e-mail: andrzej.ozyhar@pwr.wroc.pl

Artykuł otrzymano 24 października 2011 r.
Artykuł zaakceptowano 6 stycznia 2012 r.

Słowa kluczowe: białka inherentnie nieuporządkowane, regiony inherentnie nieuporządkowane, przewidywanie nieuporządkowania, identyfikacja nieuporządkowania

Wykaz skrótów: ID – inherentnie nieuporządkowany; IDP – białko inherentnie nieuporządkowane; IDR – region inherentnie nieuporządkowany; MG – stopiona globula (ang. *molten globule*); PMG – stopiona globula typu PMG (ang. *pre-molten globule*); PTM – po-translacyjna modyfikacja

Podziękowanie: Praca finansowana z dotacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na działalność statutową Wydziału Chemicznego Politechniki Wroclawskiej.

STRESZCZENIE

Białka inherentnie nieuporządkowane (IDPs) to stosunkowo niedawno odkryta i stale rosnąca grupa białek. W przeciwieństwie do białek globularnych, w warunkach uznanych za natywne, funkcjonalne IDPs pozbawione są stabilnej struktury trzeciorzędowej, charakteryzują je natomiast nadzwyczajna plastyczność i dynamika konformacji. Dzięki swym niezwykłym właściwościom IDPs, mogą łatwo przyjmować odmienne stany konformacyjne w odpowiedzi na zmianę warunków środowiska, czy na skutek oddziaływania z różnymi partnerami. Dodatkowo, duża labilność i ekspozycja łańcucha polipeptydowego IDPs sprawia, że białka te stanowią cel licznych modyfikacji potranslacyjnych, co dodatkowo zwiększa repertuar możliwych do przyjęcia konformacji i umożliwia szybką regulację aktywności IDPs. Z tego powodu IDPs zaangażowane są w rozmaite szlaki regulacyjne i procesy, podczas których dochodzi do składania supramolekularnych kompleksów. Odkrycie IDPs ujawnia nieznane oblicze białek i stanowi nowe wyzwanie dla współczesnej biochemii.

WPROWADZENIE

Przez dziesiątki lat, analizy oddziaływań enzymów z substratami zakładały, iż białka te posiadają jednoznacznie zdefiniowaną i w dużej mierze stabilną trzeciorzędową strukturę, warunkującą specyficzną funkcję. Dwa modele, tłumaczące na tej podstawie, oddziaływanie enzymu z substratem, jeden wprowadzony w 1894 r. przez Emila Fischera, „model zamka i klucza” [1] oraz drugi „model wymuszonego dopasowania” zaproponowany przez Daniela Koshlanda w 1958 r. [2], zdominowały na długi czas rozumienie zależności pomiędzy strukturą a funkcją, nie tylko enzymów, ale także innych białek. Także badania Christiana Anfinsena¹ nad renaturacją rybonukleazy utwierdziły w przekonaniu, że w warunkach fizjologicznych dane białko przyjmuje tylko jedną strukturę, natywną, odpowiadającą minimum energetycznemu dla danej sekwencji reszt aminokwasowych [3]. I tak przez wiele lat badania skupiały się na poznawaniu struktur i funkcji kolejnych białek zgodnie z paradygmatem: sekwencja → stabilna struktura trzeciorzędowa → określona funkcja. Dziś wiadomo, że paradygmat ten nie może być uogólniany na wszystkie białka, a w braku strukturalnego uporządkowania upatruje się daleko idących korzyści. Białka o inherentnie² nieuporządkowanej strukturze (IDPs³, ang. *intrinsically disordered proteins*) to białka, które w warunkach uznawanych za fizjologiczne, nie posiadają stabilnej struktury drugo- i trzeciorzędowej, a mimo to pełnią istotne funkcje biologiczne [4-10]. IDPs swoje funkcje pełnią albo bezpośrednio w stanie nieuporządkowanym, albo po przejściu ze stanu nieuporządkowanego do stanu uporządkowanego/sfałdowanego [11]. Brak stabilnej, ściśle określonej struktury trzeciorzędowej stwierdzono do tej pory głównie w białkach zaangażowanych w mechanizmy regulacyjne oraz szlaki przekazywania sygnałów [6,12,13]. Obszerną bazę IDPs, o potwierdzonych doświadczalnie, charakterystycznych dla tej grupy białek, właściwościach, wraz ze zwięzłym opisem funkcji, można znaleźć na serwerze DisProt (<http://www.disprot.org/>).

Już w latach 60. i 70. XX wieku, zauważono odstępstwa od wcześniej obowiązującego paradygmatu strukturalno-funkcjonalnego. Jednak początkowo informacje dotyczące IDPs były rozproszone, a badacze, którzy napotykali na nie pasujące do paradygmatu właściwości białek/ domen, albo obserwacje te traktowali jako artefakty i ignorowali, albo różnie je tłumaczyli i różnie nazy-

¹ Nagroda Nobla w roku 1972, w dziedzinie chemii, za badania nad powiązaniem sekwencji aminokwasowej i biologicznie aktywnej konformacji białka.

² Pojęcie inherentny oznacza: tkwiący w czymś w istocie, strukturze, zasadniczym charakterze czegoś, w naturze czegoś; nieodłączny, nieodzowny (za Słownikiem Języka Polskiego PWN, 2007 r.). Określenie to wydaje się najtrafniej oddawać znaczenie angielskiego słowa intrinsic (nieodłączny). Brak stabilnej struktury drugo- i trzeciorzędowej, określane jako nieuporządkowanie (disorder), jest nieodłączną właściwością białek zaliczanych do IDPs i tkwi w ich naturze, tj. w sekwencji reszt aminokwasowych łańcucha polipeptydowego.

³ W niniejszym artykule stosowany będzie skrót literowy IDP, który odnosić się będzie do pojedynczego białka inherentnie nieuporządkowanego oraz skrót IDPs, oznaczający, zgodnie z literaturą anglojęzyczną, większą ich grupę. Ta sama zasada będzie obowiązywać także dla innych skrótów.

wali, co nie pozwalało dostrzec skali zjawiska [9]. Sytuacja zmieniła się dopiero pod koniec lat 90., kiedy cztery grupy badawcze, niezależnie od siebie, postanowiły przyrzeć się bliżej tej niezwyklej grupie białek [6,8,14,15]. Obecnie wiadomo, że zjawisko strukturalnego nieuporządkowania jest bardzo powszechne. Jak wynika z analiz bioinformatycznych, 25-30% eukariotycznych białek jest w dużej mierze nieuporządkowanych [15], więcej niż połowa posiada długie nieuporządkowane regiony [16,17], a ponad 70% białek zaangażowanych w kaskady przekazywania sygnału, wyposażonych jest w długie nieuporządkowane regiony [12]. Dodatkowo z przeprowadzonych analiz wynika, że białka *Eukaryota* wykazują większy stopień nieuporządkowania w postaci długich regionów pozbawionych struktury (52-67%) niż *Prokaryota* (16-45%) czy *Archea* (26-51%) [16,17]. Prawdopodobnie wzrost nieuporządkowania w królestwie *Eukaryota* ma związek ze wzrostem złożoności szlaków sygnałowych w wielokomórkowych organizmach [8,16,17]. Nie dziwi zatem, że zainteresowanie IDPs jest coraz większe i, że w ciągu ostatniej dekady odnotowano prawdziwą eksplozję liczby publikacji poświęconych tej grupie białek [9].

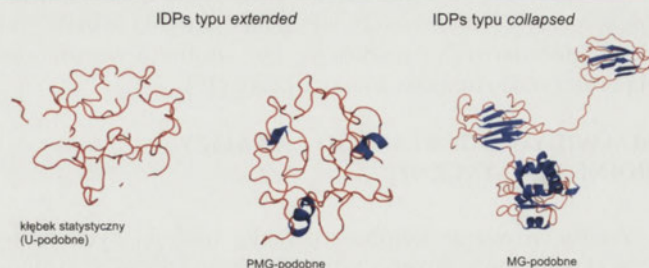
W piśmiennictwie spotkać można kilka terminów, przy pomocy których próbowano oddać naturę nieuporządkowanych białek/regionów: *rheomorphic* [18], *intrinsically disordered* [8], *natively denatured* [19], *natively unfolded* [14,20], *intrinsically unstructured* [6,14], *mostly unstructured* [21] *natively disordered* [22]. Każdy z wymienionych terminów posiada jakieś ograniczenia, jednak, by uniknąć znaczeniowego chaosu, zaproponowano określenie *inherentnie nieuporządkowany* (ID, ang. *intrinsically disordered*) [9]. Zaproponowano także wprowadzenie pojęć: *unfoldome* i *unfoldomic*. Określenie *unfoldome* oznaczałoby zbiór obejmujący IDPs, ale także regiony ID, obecne w obrębie białek globularnych (IDRs, ang. *intrinsically disordered regions*), tymczasem określenie *unfoldomic*, oznaczałoby dziedzinę zajmującą się *unfoldome*-em, a więc nie tylko identyfikacją nowych IDPs/IDRs, ale także badaniem ich funkcji, struktury, ewolucji oraz oddziaływań w jakie są zaangażowane [23].

STAN INHERENTNIE NIEUPORZĄDKOWANY - WŁAŚCIWOŚCI IDPs/IDRs

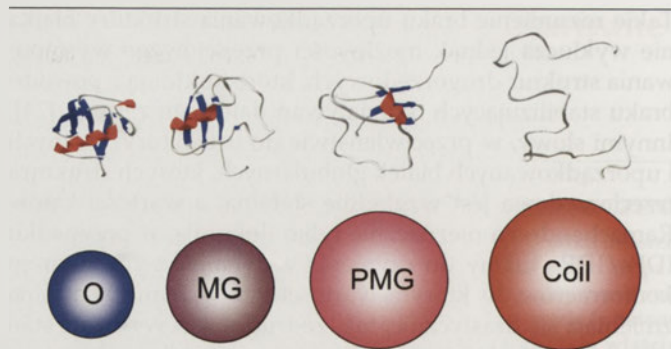
Stan ID, to stan, w którym białko, w roztworze, w warunkach uznawanych za natywne, występuje w postaci zespołu różnych konformerów. Ma to związek ze zjawiskiem fluktuacji atomów łańcucha polipeptydowego. W przypadku białek globularnych, posiadających uporządkowaną strukturę, kąty Ramachandrana (ϕ i ψ) oraz pozycje atomów łańcucha głównego wykazują niewielkie odchylenia względem ich lokalnego otoczenia. Nieznaczne fluktuacje atomów są spowodowane przypadkowymi ruchami termicznymi oraz niewielkimi, kooperatywnymi zmianami lokalnej konformacji i w dużej mierze zależą od stopnia upakowania sąsiadujących reszt aminokwasowych. A ponieważ struktura białek globularnych wykazuje silne upakowanie, odchylenia te są stosunkowo niewielkie i można określić uśrednione pozycje, w których atomy znajdują się przez większość czasu [24]. W przypadku IDPs/IDRs, pozycje atomów łańcucha głównego oraz wartości kątów ϕ i ψ wykazują znacznie większe fluktuacje, co ma związek z bardzo małym stopniem upakowania cząsteczki.

Takie rozumienie braku uporządkowania struktury białka nie wyklucza jednak możliwości przejściowego występowania struktur drugorzędowych, które fluktuują z powodu braku stabilizujących oddziaływań dalekiego zasięgu [24]. Innymi słowy, w przeciwieństwie do ustrukturyzowanych i uporządkowanych białek globularnych, których struktura trzeciorzędowa jest względnie stabilna, a wartości kątów Ramachandrana nieznacznie tylko fluktuują, w przypadku IDPs/IDRs mamy do czynienia z dynamicznym zbiorem konformerów, w którym wartości kątów Ramachandrana zmieniają się drastycznie, tak, że trudno jest wyróżnić stan równowagi, w którym konformery podlegają niekooperatywnym przekształceniom strukturalnym [9]. Stąd uważa się, że w takim zbiorze istnieje pewien statystyczny rozkład możliwych konformacji, a obserwowana, wypadkowa struktura odzwierciedla ten rozkład [11].

Intensywne badania prowadzone w ostatniej dekadzie na IDPs, sugerują znaczną różnorodność konformacyjną białek zaliczanych do tej grupy. Różnorodność ta przyczyniła się do wyróżnienia dwóch klas IDPs: białek o charakterystyce podobnej do stanu zdenaturowanego białek globularnych (U-podobne; ang. *unstructured-like*), o konformacji kłęбка statystycznego oraz białek o charakterystyce podobnej do stanu stopionej globuli (MG-podobne; ang. *molten globule-like*) (Ryc. 1) [25]. Jakiś czas później zaproponowano też istnienie dodatkowego stanu: o charakterystyce podobnej do stanu stopionej globuli typu PMG (PMG-podobne; ang. *premolten globule-like*), będącego stanem przejściowym pomiędzy stopioną globulą a kłębką statystycznym (Ryc. 1) [5]. Zaproponowane nazwy stanów, w jakich mogą występować IDPs/IDRs, wywiedziono z badań nad fałdowaniem i denaturacją białek globularnych [26-28]. Jednak w przypadku białek globularnych, stany te są z reguły niefunkcjonalne, tymczasem IDPs/IDRs mogą pełnić swoje funkcje w każdym z wymienionych stanów [29]. IDPs/IDRs w stanie MG-podobnym, cechuje brak sztywnej struktury trzeciorzędowej i słabe upakowanie, możliwa jest jednak spora zawartość struktur drugiego rzędu. Białka w tym stanie wykazują większą podatność na trawienie proteazami niż białka globularne [5]. Struktury PMG-podobne mają jeszcze mniejszy stopień upakowania i niższą zawartość drugorzędowych struktur w porównaniu do struktur MG-podobnych. Konformacja U-podobna wykazuje cechy właściwe dla stanu rozfałdowanego, a więc dużą elastyczność, brak lub niewielką zawartość struktur drugorzędowych



Rycina 1. Konformacje przyjmowane przez IDPs. Na schemacie przedstawiono dwie główne konformacje przyjmowane przez IDPs: konformację typu *extended* oraz typu *collapsed*. W obrębie IDPs typu *extended* wyróżnia się dwie odmienne konformacje: o charakterystyce podobnej do stanu zdenaturowanego białek globularnych, kłęбка statystycznego (U-podobne) oraz o charakterystyce podobnej do stanu stopionej globuli typu PMG (PMG-podobne). Białka o charakterystyce podobnej do stanu stopionej globuli (MG-podobne), zalicza się do IDPs typu *collapsed*. Na podstawie [28], zmodyfikowano.



Rycina 2. Wpływ stanu ID na objętość hydrodynamiczną. Schemat przedstawia wpływ stanu ID na objętość hydrodynamiczną białek. Poniżej przykładowych cząsteczek w danym stanie konformacyjnym przedstawiono sferyczne modele, odpowiadające ich hydrodynamicznym objętościom; od lewej: globularny (O), stopionej globuli typu MG (MG), stopionej globuli typu PMG (PMG), kłębka statystycznego (Coil). Na podstawie [8], zmodyfikowano.

oraz bardzo słabe upakowanie [5,30]. Często także można spotkać inny podział IDPs, na dwie klasy. Pierwsza to tzw. *collapsed disorder IDPs*, do której zalicza się białka typu MG-podobnego, druga to tzw. *extended disorder IDPs*, do której zalicza się białka o strukturze PMG-podobnej i U-podobnej [8,22,31] (Ryc. 1). Ze względu na różnice w zawartości struktur i upakowaniu, białka występujące w konkretnym stanie konformacyjnym wykazują odmienną objętość hydrodynamiczną. I tak białka w stanie MG podobnym, PMG-podobnym oraz U-podobnym wykazują 1,5; 3 i 12 razy zawyżoną objętość hydrodynamiczną cząsteczki, w porównaniu do białka globularnego o takiej samej masie cząsteczkowej [9] (Ryc. 2).

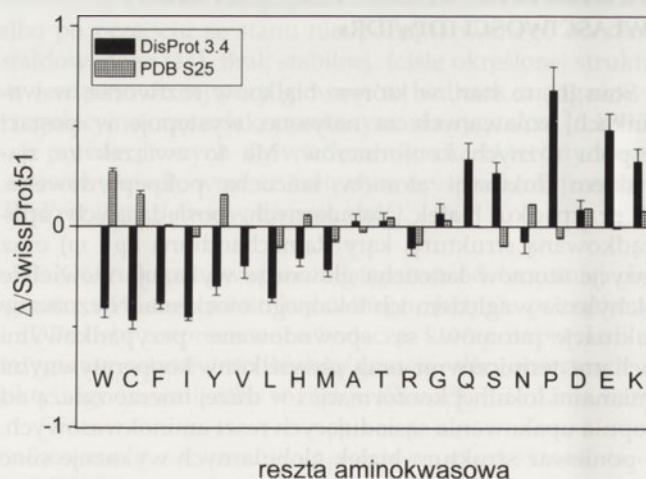
Liczba możliwych konformacji, stopień upakowania, jak również długość fragmentu, który ulega fluktuacjom, zdefiniowana jest przez strukturę pierwszorzędową białka. Analiza porównawcza struktur pierwszorzędowych wszystkich poznanych do tej pory IDPs/IDRs, pozwoliła określić ich cechy wspólne. Okazuje się, że posiadają one odmienny skład aminokwasowy niż ten obserwowany w przypadku białek globularnych, a mianowicie: wyraźnie zawyżoną zawartość reszt promujących nieuporządkowanie (ang. *disorder-promoting residues*): A, R, G, Q, S, E, K, P i jednocześnie znaczący niedomiar reszt promujących strukturę uporządkowaną (ang. *order-promoting residues*): W, Y, F, I, L, V, C, N [8,32-35] (Ryc. 3). Spora zawartość kwaśnych i zasadowych reszt w sekwencjach ID, wprowadzająca wiele nieskompensowanych ładunków, w połączeniu z małą zawartością reszt hydrofobowych, wyraźnie odróżnia te białka od białek globularnych i wydaje się być istotnym warunkiem dla braku ściśle upakowanej struktury [15].

PRZEWIDYWANIE STANU ID – ANALIZY BIOINFORMATYCZNE

Zaobserwowanie kombinacji małej średniej hydrofobowości i względnie dużego, wypadkowego ładunku, zaowocowało opracowaniem metody definiującej wartości graniczne, pozwalającej na rozróżnienie IDPs/IDRs od białek globularnych, na podstawie zestawienia ze sobą ładunku wypadkowego cząsteczki białka i jej hydropatii – wykres CH (ang. *charge-hydrophathy plot*) [15]. W oparciu o specyficzny skład aminokwasowy, wskaźnik hydropatii i ładunku,

tendencję do przyjmowania struktur α lub β , a także inne właściwości analizowanych sekwencji białek globularnych i IDPs/IDRs, powstało wiele algorytmów, które analizują sekwencje aminokwasowe i przewidują w nich obecność IDRs. Jeśli w pierwszorzędowej strukturze białek globularnych ukryta jest informacja o strukturze trzeciorzędowej i sposobie jej osiągnięcia, to powinna tam znaleźć się także informacja o braku uporządkowania dla IDPs [9,29,39]. Pierwszym, opracowanym w 1997 r., programem do przewidywania IDPs/IDRs, był PONDR® [40]. Od tamtego czasu powstało ponad 50 innych, a większość z nich dostępna jest w bazie DisProt [36]. Programy przewidujące obecność IDRs działają przeważnie na zasadzie sieci neuronowych, trenowanych na sekwencjach aminokwasowych białek, których przynależność do IDPs potwierdzono doświadczalnie. Algorytmy te analizują nie tylko strukturę pierwszorzędową, ale również skład aminokwasowy, gdyż zauważono, że fragmenty przyjmujące rozciągnięta, nieuporządkowaną konformację cechuje zazwyczaj mała złożoność sekwencji [34]. Z ostatnich doniesień wynika również, że IDPs często zawierają powtórzone ciągi kilku reszt aminokwasowych, stąd sugeruje się nawet, że białka te ewoluowały poprzez rozprzestrzenianie się określonego, dla danego białka, motywu [41]. Zorganizowane w ten sposób elastyczne i niesfałdowane regiony odseparowują niezależnie sfaldowane domeny w obrębie cząsteczki białkowej, stanowiąc tzw. łączniki. Łączniki różnią się znacznie długością i składem reszt aminokwasowych, ale w większości bogate są w polarne, nienaładowane reszty S, T, Q, N, poprzedzielane resztami A, G, P [7]. Z przeprowadzonych analiz bioinformatycznych wynika również, iż IDRs ewoluowały znacznie szybciej niż regiony globularne, jednak poziom tej szybkości zależał od funkcji danego regionu. I tak, jeśli porównano fragmenty zaangażowane w oddziaływania białko-białko, białko-DNA, białko-RNA, czy fragmenty będące elastycznymi łącznikami, najwolniej ewoluowały regiony zaangażowane w oddziaływania białko-DNA [42].

Zauważono także możliwość wyciągania dodatkowych wniosków z analiz otrzymanych przy pomocy różnych



Rycina 3. Skład aminokwasowy IDPs/IDRs. Analiza wykonana za pomocą programu Composition Profiler, dostępnego na stronie <http://www.cproffiler.org> [33]. Porównanie składu aminokwasowego białek o strukturze nieuporządkowanej z bazy DisProt 3.4 [36] (słupki czarne) i białek o strukturze uporządkowanej z bazy PDB S25 [37] (słupki zakreskowane) ze składem aminokwasowym białek z bazy SwissProt 51 [38]. Wartości ujemne oznaczają niższą niż w bazie SwissProt 51 zawartość danego aminokwasu, a wartości dodatnie wyższą.

algorytmów. Dla przykładu białka przewidywane jako ID jednocześnie przy pomocy wykresu CH i algorytmu PONDR, są najprawdopodobniej typu *extended* (Ryc. 1), jeśli natomiast algorytm PONDR zakwalifikuje białko jako ID, podczas gdy wykres CH uzna je za globularne, w takim przypadku mamy najprawdopodobniej do czynienia z białkiem typu *collapsed* [16] (Ryc. 1). Jednak w celu identyfikacji IDPs/IDRs nie można ograniczyć się tylko i wyłącznie do zastosowania narzędzi bioinformatycznych. Analiza komputerowa może być stosowana jako narzędzie wspólowarzące i pozwalające na planowanie doświadczeń.

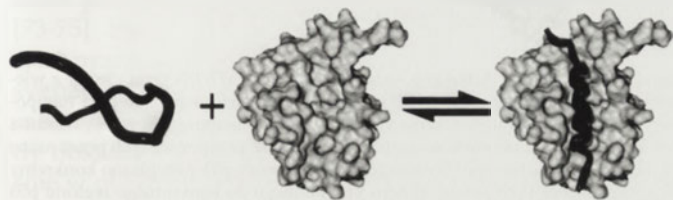
IDENTYFIKACJA STANU ID - METODY EKSPERYMENTALNE

Do badań doświadczalnych, pomocnych w identyfikacji stanu ID, zalicza się między innymi: analizę rentgenograficzną białek w kryształach [8,43-45], heterojądrową, wielowymiarową spektroskopię jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) [14,46-49], spektroskopię dichroizmu kołowego (CD) w dalekim i bliskim ultrafiolecie [6,9,47-49], spektroskopię fourierowską w podczerwieni (FTIR), różnicową mikrokalorymetrię skaningową (DSC) [50], niskokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS) [51], metody wykorzystujące techniki fluorescencyjne i wiele innych [9]. Wymienione powyżej metody stosuje się zwykle do charakteryzowania białek globularnych, a obecność stanu ID stwierdza się na podstawie braku sygnałów typowych dla białek globularnych. Dla przykładu, analiza rentgenograficzna białek w kryształach, pozwala stwierdzić stan ID, gdy nie jest możliwe ustalenie współrzędnych atomów badanego fragmentu [8]. NMR pozwala na bezpośrednią obserwację heterogenności konformacyjnej, nawet w przypadku białek całkowicie pozbawionych struktury trzeciorzędowej [52], a spektroskopia CD w dalekim ultrafiolecie pozwala określić zawartość lub brak struktur drugorzędowych [6]. Dzięki analizie sedymentacyjnej, metodą ultrawirrowania analitycznego, można oszacować kształt i uśrednione wymiary badanej cząstki, które dla IDPs często odpowiadają wymiarom białka globularnego, o takiej samej masie, ale badanego w warunkach denaturujących [6]. Widma absorpcyjne i fluorescencyjne umożliwiają stwierdzenie istnienia lub braku zdefiniowanej struktury trzeciorzędowej poprzez obserwację otoczenia aromatycznych chromoforów w białkach [53]. W sposób pośredni, o braku struktury dowodzi również o wiele większa wrażliwość IDPs na proteolizę, głównie ze względu na silną ekspozycję łańcucha polipeptydowego [5]. Zawyżona, o 20-80%, wartość pozornej masy cząsteczkowej, szacowana na podstawie ruchliwości elektroforetycznej, podczas elektroforezy w warunkach

denaturujących w obecności SDS, spowodowana dużym słabszym wiązaniem SDS przez IDPs, to także przesłanka sugerująca stan ID [5,6,54]. Nietypowy skład aminokwasowy i wszystkie konsekwencje z nim związane, sprawiają, że IDPs/IDRs reagują w charakterystyczny sposób na zmiany środowiska [29]. IDPs charakteryzuje m.in. (i) słabe nachylenie krzywej denaturacyjnej lub nawet całkowity brak sigmoidalnego przejścia, podczas eksperymentów rozkładowania łańcucha polipeptydowego pod wpływem denaturanta (chlorowodoru guanidyny, mocznika); (ii) brak specyficznego szczytu absorpcji ciepła na krzywej topnienia, charakterystycznego dla białek globularnych, podczas eksperymentów DSC; (iii) możliwość wzrostu ustrukturyzowania w odpowiedzi na ciepło, tzw. odwrotna odpowiedź na ogrzewanie (ang. „*turned out*” *response to heat*) lub drastyczne zmiany pH; (iv) możliwość wzrostu ustrukturyzowania w obecności jonów zapewniających neutralizację nieskompensowanego ładunku, osmolitów, związków naśladujących warunki/sąsiedztwo błon biologicznych, tj. fosfolipidów, SDS, 2,2,2-trifluoroetanolu, czy etanolu; (v) ustrukturyzowanie pod wpływem makromolekularnego tłoku (ang. *macromolecular crowding*) lub w obecności partnera [29]. Co ciekawe, zastosowanie wielu z wymienionych powyżej czynników, wywołujących wzrost ustrukturyzowania i stabilizujących IDPs/IDRs, w przypadku typowych białek globularnych spowodowałoby ich denaturację [29].

FUNKCJONALNOŚĆ STANU ID

Mimo niestabilnej konformacji, IDPs/IDRs pełnią ściśle określone funkcje w komórce [4,12,13]. Jedną z zaproponowanych klasyfikacji tej grupy białek, wyróżnia pięć podstawowych klas IDPs, uwzględniając rodzaj pełnionej przez nie funkcji. I tak pierwszą grupę stanowią tzw. łańcuchy entropowe (ang. *entropic chains*), których mechanizm działania wynika bezpośrednio ze stanu ID, tworzą one przede wszystkim elastyczne łączniki pomiędzy domenami białka. Drugą grupę stanowią białka efektorowe (ang. *effectors*), wywierające wpływ na działanie innych białek. Kolejne grupy to tzw.: białka wychwytyjące (ang. *scavengers*), które przechowują i neutralizują małowiązujące ligandy, białka składające (ang. *assemblers*), które składają, stabilizują i regulują wielopodjednostkowe kompleksy (rybosomy, cytoskielet, chromatynę, macierz zewnątrzkomórkową), a także białka ekspozujące fragmenty sekwencji (ang. *display sites*), ułatwiające w ten sposób międzycząsteczkowe rozpoznanie miejsc ulegających potranslacyjnym modyfikacjom (PTMs), fosforylacji, proteolizie [6,11]. Większość spośród wyżej wymienionych funkcji, realizowana jest poprzez tzw. molekularne rozpoznanie, a procesowi temu towarzyszy przejście konformacyjne IDPs/IDRs w kierunku bardziej uporządkowanej struktury, pod wpływem oddziaływań z partnerem, określane mianem indukowanego dopasowania [49,55] (Ryc. 4).



Rycina 4. Przykład indukowanego dopasowania. IDR białka Bad (czarna wstążka) oddziałujący z czynnikiem anty-apoptotycznym Bcl-x₁ (szara cząsteczka globularna). Po związaniu do czynnika Bcl-x₁, nieuporządkowany fragment Bad przybiera postać helisy α . Na podstawie [65], zmodyfikowano.

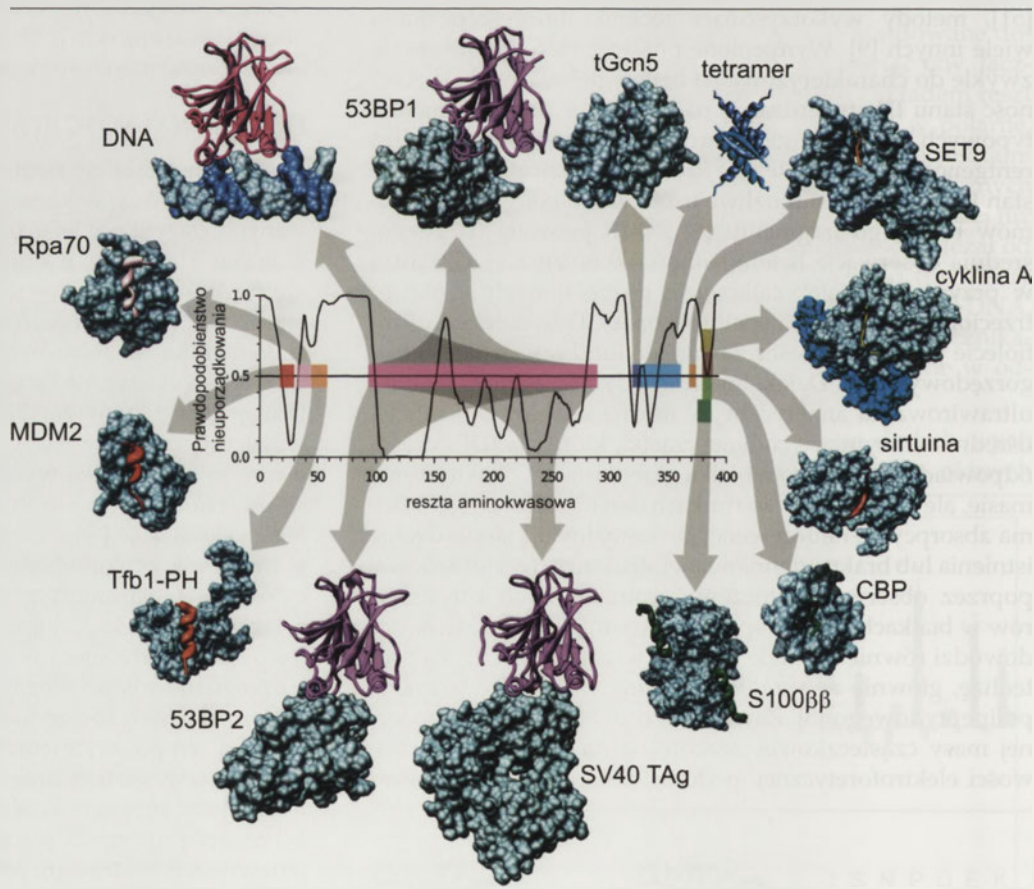
Świetnym przykładem molekularnego rozpoznania, ale także różnorodności wiązanych partnerów przez ten sam IDR, jest polimorfizm strukturalny miejsc wiązających, obecnych w białku p53 (Ryc. 5). Białko p53 posiada cztery domeny: nieuporządkowaną, transaktywacyjną domenę N-końcową, centralną, globularną domenę wiążącą DNA oraz nieuporządkowaną C-końcową domenę, odpowiedzialną

za tetrameryzację, zakończoną domeną regulatorową. IDRs p53 mogą przybierać, w zależności od białka partnerującego, postać helisy α , struktur β lub kłęбка statystycznego (Ryc. 5). Uderzające jest bogactwo kompleksów, które do oddziaływań angażują IDRs p53. Co ciekawe, często tylko krótki fragment IDR p53 podlega przejściu konformacyjnemu w bardziej uporządkowaną formę, pod wpływem wiązania partnera. Te same krótkie IDRs angażowane są w oddziaływania z różnymi partnerami, a oddziaływania te wymuszają przyjmowanie odmiennej struktury, jak to ma miejsce, na przykład, w przypadku C-końca p53, wiązanego przez czterech różnych partnerów (Ryc. 5). Okazuje się, że niektóre z tych oddziaływań można skorelować z wynikiem przewidywania nieuporządkowania wykonanego dla białka p53 przy pomocy programu PONDR (Ryc. 5). Zaproponowano, że wyraźne obniżenie wartości parametru skorelowanego z nieuporządkowaniem, może sugerować istnienie tzw. elementów molekularnego rozpoznania (MoREs, ang. *molecular recognition elements* lub MoRFs, ang. *molecular recognition features*), a więc IDRs, które pod wpływem kontaktu z partnerem podlegają przejściu nieuporządkowany do uporządkowanego (ang. *disorder-to-order transition*). W zależności od rodzaju struktury, jaką przyjmują MoRFs w kompleksie z partnerem, elementy te podzielono na trzy grupy: α -MoRFs, które tworzą helisy α , β -MoRFs, które tworzą struktury β oraz ι -MoRFs, tworzące struktury bez regularnego układu wiązań wodorowych [56].

Na podstawie wielu przeprowadzonych tego typu analiz, sugeruje się istnienie w analizowanym polipeptydzie α -MoRFs i β -MoRFs, jeśli możliwe jest zaobserwowanie wyraźnych zmian na wykresie PONDR, wskazujących na istnienie struktury uporządkowanej. ι -MoRFs trudniej przewidzieć, gdyż w takim przypadku wykres PONDR przebiega bez wyraźnych zmian [57]. Obecnie dostępne są nawet algorytmy do przewidywania MoRFs: MoRF [58] oraz ANCHORS [59]. Tymczasem badania powierzchni oddziaływań białko-białko, polegające na analizie sekwencji, za pośrednictwem których odbywa się molekularne rozpoznanie i oddziaływanie z partnerem, zasugerowały istnienie tzw. krótkich liniowych motywów (SLiMs, ang. *short linear motifs* [60,61] lub ELMs, ang. *eukaryotic linear motifs* [62,63]) zaangażowanych w inicjowanie powierzchni kontaktu białko-białko. Najnowsze badania wykazały, iż SLiMs/

ELMs są przeważnie pozbawione struktury i w dużej mierze nakładają się z MoRFs [64].

W 2000 r. analizy IDPs z użyciem NMR zasugerowały istnienie wstępnie uformowanych, specyficznych elementów strukturalnych, określanymi mianem *pre-existing, pre-organized, structural pre-ordering* [21,65-67]. Także następne doniesienia mówiły o lokalnych, ograniczonych obszarach, posiadających struktury wyższego rzędu (głównie helisy α), w obrębie regionów uznanych za IDRs [68]. Zaproponowano więc, że obecność tych krótkich ustrukturyzowanych regionów może mieć kluczowe znaczenie podczas oddziaływań z docelowym partnerem i że mogłyby one stanowić centra inicjacji fałdowania. Istnieją jednak dowody, iż w wielu przypadkach IDPs są całkowicie nieuporządkowane, co dla przykładu pokazała analiza struktury 4EBP1, wykonana za pomocą NMR. Dopiero związanie z partnerem, w tym przypadku z czynnikiem eIF4E, powoduje utworzenie krótkich, uporządkowanych fragmentów, tu helisy α , co ciekawe, w obrębie sekwencji, dla której obserwowano wyraźne obniżenie wartości parametru skorelowanego ze stanem ID, podczas przewidywania nieuporządkowania 4EBP1 programem PONDR [69].



Rycina 5. Oddziaływanie z różnymi partnerami na przykładzie białka p53. Oddziaływanie IDPs/IDRs typu „jeden z wieloma”, na przykładzie p53. W centralnej części schematu umieszczono wykres ilustrujący przewidywanie stopnia nieuporządkowania dla białka p53, przy użyciu algorytmu PONDR (wartości na osi $y > 0,5$ – region nieuporządkowany; wartości $< 0,5$ – uporządkowany). Wokół wykresu, przykłady struktur, potwierdzonych doświadczalnie, przyjmowanych przez różne regiony p53, pod wpływem oddziaływania z 14 różnymi partnerami. Poszczególne regiony p53 przypisano konkretny kolor, co zaznaczono na wykresie PONDR w postaci kolorowych pasów. Koloru przypisanego do konkretnego regionu p53 użyto następnie do zaznaczenia fragmentu białka p53 w odpowiedniej strukturze. Dodatkowo, strzałkami wskazano odwołanie danego regionu p53 do konkretnej struktury. Poczynając od lewej, górnej struktury, w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara, p53 w kompleksie z: DNA (pdb 1TSR), 53BP1 (pdb 1GZH), tGcn5 (pdb 1Q2D), p53 – domena tetrameryzacyjna (pdb 3SAK), SET9 (pdb 1XQH), cyklina A (pdb 1H26), sirtuina (pdb 1MA3), CBP (pdb 1JSP), s100 β (pdb 1DT7), SV40 TA (pdb 2H1L), 53BP2 (pdb 1YCS), Tfb1-PH (pdb 2G50), MDM2 (pdb 1YCR), Rpa70 (pdb 2B3G). Na podstawie [8], zmodyfikowano.

Zgodnie z zaproponowanym niedawno modelem istnienia i fałdowania IDPs/IDRs [39], IDPs nie mogą spontanicznie fałdować do postaci zwartej cząsteczki, tak jak ma to miejsce w przypadku białek globularnych. Niektóre z nich jednak podlegają całkowitemu przekształceniu w uporządkowaną strukturę podczas oddziaływania z partnerem, jeśli entalpia swobodna kompleksu jest mniejsza niż entalpia swobodna IDP i jego partnera, zanim zaczną oddziaływać. Fałdowanie nieuporządkowanego regionu jest kosztowne entropowo, zatem konieczne jest utworzenie większej powierzchni kontaktu obu partnerów białkowych, aby zapewnić entalpową kompensację [5,15,29-31]. Częściej jednak tylko fragment IDP, element specyficznie rozpoznawany przez partnera, podlega procesowi sprzężonego fałdowania i wiązania [14,49,56,58,68,70]. Znane są dwa modele opisujące proces sprzężonego fałdowania i wiązania. W pierwszym, partner wybiera z dostępnego zbioru konformerów IDP, specyficzną konformację, która najbardziej odpowiada tej ostatecznej, przybieranej przez IDP po związaniu z tym partnerem, model wybieranej konformacji (ang. *conformational selection model*). W drugim modelu, indukowanego fałdowania (ang. *induced folding model*), IDP, w stanie całkowicie pozbawionym struktury, wiąże się z partnerem i dopiero pod wpływem asocjacji dochodzi do fałdowania [71]. W przypadku modelu wybieranej konformacji, duże znaczenie odgrywają wstępnie uformowane elementy strukturalne [68], podczas gdy w modelu indukowanego fałdowania istotną rolę odgrywają MoRFs [56,58,70].

Główną korzyścią, jaka płynie z przyjmowania przez IDPs zdefiniowanej konformacji podczas oddziaływania z partnerem jest „rozprężenie” specyficzności oddziaływania i jego siły, co wynika ze zmniejszenia entropii konformacyjnej układu. Dzięki temu możliwe są wysoce specyficzne, a jednocześnie szybkie i odwracalne oddziaływania [6]. Duża specyficzność, połączona z małym powinowactwem podczas oddziaływania z wieloma partnerami, wydaje się być nieodłącznym elementem w czasie molekularnego rozpoznawania, odbierania i przekazywania sygnałów oraz kontroli i regulacji szlaków sygnałowych. Możliwość przyjmowania wielu konformacji, ułatwiająca IDPs/IDRs dopasowanie do wielu różnych struktur (białek, DNA, RNA, itd.), a także zapewniająca dużą specyficzność podczas oddziaływania z każdą z nich, określana jest często mianem swobody wiązania (ang. *binding promiscuity*) [6,72] lub sygnalizacją typu jeden-do-wielu (ang. *one-to-many signalling*) [8]. Dzięki temu, IDPs, oddziałujące i odbierające sygnały od rozmaitych partnerów mogą sprzęgać ze sobą różne szlaki przekazywania sygnałów, czego świetnym przykładem jest, przytaczane wcześniej, białko p53. IDPs mogą także pełnić rolę tzw. białek węzłowych (ang. *hub proteins*) [73-75]. Są to białka zlokalizowane w węzłach złożonych sieci przekazywania sygnałów, odbierające i przekazujące sygnał, od i do rozmaitych partnerów. Białka te mogą być całkowicie nieuporządkowane, lub też zawierać IDRs, wtedy obszary oddziaływania w większości znajdują się właśnie w obrębie IDRs. Co ciekawe, zidentyfikowano również dwa wysoce uporządkowane białka węzłowe, 14-3-3 oraz kalmodulinę, w takim przypadku to partnerzy tych białek przynależą do IDPs [76]. Zaproponowano więc istnienie dwóch mechanizmów, za pośrednictwem których stan ID

jest tak powszechnie używany podczas oddziaływania białek uczestniczących w złożonych szlakach sygnałowych. Pierwszy to sygnalizacja typu jeden-do-wielu, gdy jeden IDR może wiązać wielu różnych partnerów oraz sygnalizację typu wielu-do-jednego (ang. *many-to-one signalling*), kiedy wiele różnych IDRs wiąże jedno miejsce danego białka uporządkowanego [77]. Dodatkowo w obrębie białek węzłowych wyróżniono podrodzinę białek określaną mianem białek rusztowania (ang. *scaffold proteins*). Białka te posiadają znacznie mniejszą liczbę partnerów, z którymi mogą oddziaływać, jednak zlokalizowane są często w centralnych punktach wielopodjednostkowych kompleksów, gdzie oddziałują z większością swoich partnerów jednocześnie [75]. Białka rusztowania wyposażone są w kilka domen umożliwiających równoczesne zaangażowanie ich różnych obszarów w oddziaływanie z różnymi partnerami [78]. Mogą zatem, poprzez jednoczesne oddziaływanie z wieloma partnerami, zaangażowanymi w poszczególne szlaki, wpływać na specyficzność i szybkość procesów sygnalizacyjnych, a więc modyfikować ścieżki dalszych oddziaływań [79]. Niektóre z białek rusztowania stanowią centralny punkt dla czasowej i przestrzennej koordynacji enzymatycznej aktywności kinaz i fosfataz [79]. Białko BRCA1 (ang. *breast cancer type 1 susceptibility protein*), MAP2 (ang. *microtubule-associated protein 2*) czy tytyna, to tylko niektóre spośród tej grupy białek. Zlokalizowane w ich obrębie plastyczne IDRs wydają się mieć kluczowe znaczenie podczas pełnienia przez te białka funkcji rusztowania dla tworzonych, wielopodjednostkowych kompleksów białkowych [78].

KONTROLA STANU ID

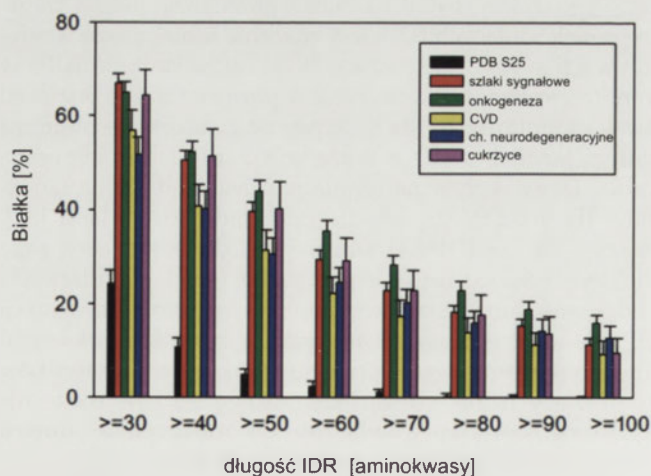
Choć wydaje się, że IDPs/IDRs, przez swoją labilność i plastyczność, a co za tym idzie różnorodność konformacyjną, umożliwiającą oddziaływanie z różnymi partnerami, wprowadzają chaos do świata białek i sieci sygnalizacyjnych, to jednak okazuje się, że chaos ten jest pod ścisłą kontrolą [80]. Pomimo porównywalnej szybkości syntezy mRNA kodujących IDPs i białka globularne, liczba transkryptów kodujących IDPs jest znacznie mniejsza, ze względu na ich szybszą degradację [81]. Także stężenie IDPs w komórce, jest znacznie mniejsze w porównaniu do poziomu białek globularnych. Ma to zapewne związek z wolniejszą syntezą łańcuchów ID, a także krótszym czasem ich półtrwania. Duży wpływ na regulację czasu półtrwania łańcuchów ID mają PTMs, jak dla przykładu fosforylacja [82]. Okazuje się, że IDPs są substratami dla kinaz dwa razy częściej niż ma to miejsce w przypadku białek globularnych, a większość kinaz zaangażowanych w regulowanie funkcji IDPs, to kinazy związane z regulacją cyklu komórkowego lub aktywowane pod wpływem konkretnych czynników stymulujących, np. stresu [82]. Stąd rola PTMs może nie ograniczać się tylko i wyłącznie do „dostrajania” funkcji IDPs/IDRs, ale także w istotny sposób może wpływać na ich dostępność w komórce. Jedne modyfikacje mogą kierować białko do szybkiej degradacji, inne zaś mogą zapewniać jego obecność i funkcjonalność przez długi czas [81]. Oprócz tego natura wyposaża komórki także w inne mechanizmy ochronne, zależne od chaperonów czy proteasomu, tak by mogły one zapobiegać „niebezpiecznym” oddziaływaniom, nie tylko niezwykle reaktywnych, z racji swojej plastyczności, IDPs/IDRs, ale i białek globularnych [81]. Dzięki tej

ściślej kontroli, IDP dostępne jest tylko w określonym czasie i odpowiednim stężeniu, a kiedy przestaje być ono potrzebne, zostaje szybko i wydajnie usunięte [81].

ZABURZENIA ZWIĄZANE ZE STANEM ID - POJĘCIE D²

Częstość występowania IDPs/IDRs w niektórych procesach biologicznych jest wyraźnie większa niż w pozostałych. Korelacja ta najsilniej zaznacza się w procesach: (i) regulacji transkrypcji; (ii) transmisji sygnału i regulacji cyklu komórkowego; (iii) biogenezy i funkcjonowania organelli zawierających kwasy nukleinowe; (iv) procesowania mRNA; (v) organizacji i biogenezy cytoszkieletu [42]. Zapewne właśnie z tego powodu zaobserwowano również wyraźny związek IDPs/IDRs z występowaniem pewnych stanów patologicznych (Ryc. 6, Tab. 1). Początkowo, z uwagi na stan ID, przyczyn obserwowanej zależności upatrywano w procesach nieprawidłowego fałdowania [83-87]. Jeśli jednak przyjąć, że wybór pomiędzy możliwymi konformacjami zależy od warunków panujących w komórce, to u podstaw wielu tzw. *chorób konformacyjnych* zapewne nie leży sam proces nieprawidłowego fałdowania, ale także niepoprawna identyfikacja (ang. *misidentification*), niepoprawna regulacja (ang. *misregulation*) czy też niepoprawne przekazywanie sygnału (ang. *missignaling*). Zatem mutacje, czy drastyczne zmiany w środowisku komórki, mogą sprawić, że białko przestanie prawidłowo funkcjonować, co w przypadku IDPs oznacza m.in. ograniczenie zdolności do prawidłowego rozpoznawania odpowiednich partnerów, a to w konsekwencji może prowadzić m.in. do tworzenia niefunkcjonalnych agregatów. Nieprawidłowe rozpoznawanie czy przekazywanie sygnału to także nieprawidłowa aktywacja kaskad transmisji sygnału i innych białek zaangażowanych w sieć połączeń.

W związku z wyraźną korelacją występowania IDPs/IDRs w określonych procesach biologicznych [42], a przez



Rycina 6. IDRs w obrębie białek związanych z określonymi stanami chorobowymi. Procentowy udział białek związanych z wyszczególnionymi stanami chorobowymi, zawierających nieuporządkowane ciągi reszt aminokwasowych o długości od ≥ 30 do ≥ 100 reszt. Dla porównania przeanalizowano także udział białek bogatych w IDRs w obrębie bazy białek globularnych (PDB S25) i białek zaangażowanych w szlaki przekazywania sygnału. Przeanalizowane zestawy białek zawierały: 1786, 487, 689 i 285 cząsteczek zaangażowanych w choroby nowotworowe, układu sercowo-naczyniowego (CVD, ang. *cardiovascular disease*), neurodegeneracyjne i cukrzyce. Na podstawie [83], zmodyfikowano.

Tabela 1. Wybrane stany chorobowe i związane z nimi IDPs/IDRs [42].

Choroba	Zaangażowane białko/region białka
Choroba Alzheimerera	Peptyd A β (IDP)
Choroba Alzheimerera	Białko Tau (IDP)
Choroba Parkinsona	α -synukleina (IDP)
Płasawica Huntingtona	Huntingtyna (IDR, poliQ)
Gąbczaste zwyrodnienie mózgu	Białko prionowe (IDR)
Ataksja rdzeniowo-mózdkowa	Ataksyna (IDR, poliQ)
Choroba Kennedy'ego	Receptor androgenowy (IDR, poliQ)
Syndrom Worster-Drought	ABri (IDP)
Amyloidoza ApoAI	koniec N apolipoproteiny AI (IDR)
Cukrzyca typu II	Amylina (IAPP) (IDP)
Rak rdzeniasty tarczycy	Kalcytonina (IDP)
Amyloidoza przedsionkowa	Przedsionkowy peptyd natriuretyczny (IDP)
Procesy nowotworzenia	p53 (IDR)

W tabeli zebrano przykłady chorób, w patogenezie których biorą udział IDPs lub IDRs przytoczonych białek. Jeśli dany stan chorobowy ma związek z ekspansją wielokrotnie powtórzonych reszt glutaminowych, fakt ten zaznaczono w nawiasie jako poliQ.

to z ich niewątpliwym udziałem w rozwoju określonych patologii, zaproponowano pojęcie D² (ang. *D² concept*), czyli ideę nieuporządkowania w zaburzeniach (ang. *disorder in disorders*). Zdaniem twórców tego pojęcia, IDPs/IDRs mogą stanowić atrakcyjny cel dla projektowanych leków. Leki te byłyby kierowane w obszar oddziaływania białko-białko i uniemożliwiłyby np. nieprawidłowe oddziaływania IDP/IDR z partnerem/-ami lub zapewniałyby prawidłowe rozpoznawanie i poprawną regulację szlaków przekazywania sygnałów kontrolowanych przez IDP/IDR [88,89].

STAN ID - PODSUMOWANIE

Labilność i brak, w nieobecności partnera, stabilnej, ściśle określonej konformacji, pozwala IDPs/IDRs pełnić rolę niezwykle czułych elementów w procesach molekularnego rozpoznawania, podczas których rejestrowanie, przetwarzanie i przekazywanie sygnału wymaga precyzyjnych zmian konformacyjnych [6]. Daje to, w pewien sposób, przewagę IDPs nad białkami całkowicie sfałdowanymi, gdyż dzięki swojej plastyczności IDPs predysponowane są do łatwiejszego odbierania i przekazywania sygnału, a dzięki możliwości przyjmowania wielu różnorodnych struktur, zdolne są do oddziaływań z wieloma różnymi partnerami. Rozprężenie specyficzności i siły wiązania jest kluczowe w czasie molekularnej identyfikacji. Gwarantuje ono dużą specyficzność reakcji, połączoną z małym powinowactwem, a to właśnie zapewnia szybkość i odwracalność procesów, dając jednocześnie możliwość oddziaływania z wieloma różnymi partnerami zdolność do oddziaływań: jeden-do-

-wielu i wielu-do-jednego, za każdym razem z dużą specyficznością. Umożliwia także tworzenie rozległej powierzchni kontaktu, powierzchnia ta rośnie w miarę postępującego fałdowania, w wyniku kontaktów z partnerem [7,13,90]. IDPs/IDRs fałdują do specyficznej konformacji, wymaganej podczas oddziaływań z ustrukturyzowanym partnerem, w oparciu o wzór fałdowania dostarczany przez tego partnera. Szybkość wiązania gwarantowana jest przez zwiększenie zasięgu „skanowania” przestrzeni reakcji w poszukiwaniu powierzchni oddziaływań. Stan ID pozwala na obejście sterycznych restrykcji, gwarantując powstanie większej powierzchni kontaktów w oddziaływaniach kompleksów, białko-białko, białko-ligand, od tej jaka tworzy się podczas oddziaływań białek o sztywnej strukturze. Elementy wstępnie uformowane oraz MoRFs, są najprawdopodobniej kluczowe dla przejścia nieuporządkowany do uporządkowanego. Przy czym, regiony zawierające większy udział fragmentów wstępnie uformowanych, dostarczają więcej entalpii swobodnej do wiązania podczas oddziaływania z partnerem, niż regiony pozbawione takich fragmentów. Najprawdopodobniej na dalszych etapach oddziaływania białek, dochodzi do stopniowego wzrostu siły oddziaływań między partnerami, także na skutek rosnącej powierzchni kontaktu. Brak strukturalnego uporządkowania umożliwia także tworzenie słabo zasocjowanych, wielopodjednostkowych kompleksów białkowych, które mogą podlegać takim przekształceniom konformacyjnym, na jakie akurat w danym momencie jest zapotrzebowanie [13,90]. Co więcej, miejsca PTMs: fosforylacji, metylacji, ubikwitylacji, sumoilacji, zlokalizowane są często właśnie w IDRs, co znacznie ułatwia dostęp enzymom modyfikującym do docelowych reszt łańcucha polipeptydowego, a co za tym idzie przyspiesza „dostrajanie” funkcji białka w zależności od potrzeb [13,90]. Plastyczność łańcuchów IDPs pozwala maskować lub odsłaniać miejsca oddziaływań/modyfikacji/proteolizy. Stan ID umożliwia więc wydajną regulację aktywności IDPs poprzez PTMs, ale także przez degradację łańcucha polipeptydowego.

Powyżej przedstawiono najważniejsze z korzyści płynących ze stanu ID i przejścia nieuporządkowany do uporządkowanego [8,14,34,77,78]. Wszystkie z zalet, wynikające ze stanu ID wydają się być kluczowe dla regulacji i kontroli wielu istotnych procesów zachodzących w komórkach żywego organizmu. Duży, choć najpewniej nie nieskończony potencjał konformacyjny jaki posiadają IDPs/IDRs, ma prawdopodobnie ogromne znaczenie podczas wielu skomplikowanych procesów jakim jest choćby kontrola i regulacja transkrypcji czy kaskady sygnałowe. Zapewne stan ID jest kluczowy podczas dostrajania powierzchni oddziaływań pomiędzy partnerami i tworzenia swojego rodzaju platformy do rozmaitych oddziaływań, w zależności od zapotrzebowania na formowane kompleksy. Poznanie reguł rządzących stanem ID i jego konsekwencji, może okazać się istotne dla pełnego zrozumienia skomplikowanych mechanizmów działania poszczególnych elementów proteomów, składania wielopodjednostkowych kompleksów, ich regulacji na poszczególnych poziomach. Każda z hipotez wysnuwanych na temat IDPs/IDRs jest mniej lub bardziej prawdopodobna, dlatego też identyfikacja kolejnych przykładów białek/regionów z tej grupy ma duże znaczenie, gdyż oprócz nowych informacji na temat samego spo-

sobu ich działania, regulacji czy struktury, umożliwi także ulepszenie algorytmów komputerowych, dzięki czemu odnajdywane podczas analiz bioinformatycznych przykłady kolejnych przedstawicieli IDPs będą bardziej wiarygodne i poprawne.

PIŚMIENNICTWO

1. Fischer E (1894) Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme. *Ber Dt ChemGes* 27: 2985-2993
2. Koshland DE (1958) Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 44: 98-104
3. Anfinsen CB, Scheraga HA (1975) Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Adv Protein Chem* 29: 205-300
4. Uversky VN, Oldfield CJ, Dunker AK (2005) Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. *J Mol Recognit* 18: 343-384
5. Uversky VN (2002) Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci* 11: 739-756
6. Tompa P (2002) Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci* 27: 527-533
7. Dyson HJ, Wright PE (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 197-208
8. Dunker AK, Lawson JD, Brown CJ, Williams RM, Romero P, Oh JS, Oldfield CJ, Campen AM, Ratliff CM, Hipps KW, Ausio J, Nissen MS, Reeves R, Kang C, Kissinger CR, Bailey RW, Griswold MD, Chiu W, Garner EC, Obradovic Z (2001) Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model* 19: 26-59
9. Uversky VN, Dunker AK (2010) Understanding protein non-folding. *Biochim Biophys Acta* 1804: 1231-1264
10. Fink AL (2005) Natively unfolded proteins. *Curr Opin Struct Biol* 15: 35-41
11. Tompa P (2005) The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Lett* 579: 3346-3354
12. Iakoucheva LM, Brown CJ, Lawson JD, Obradovic Z, Dunker AK (2002) Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J Mol Biol* 323: 573-584
13. Dunker AK, Brown CJ, Lawson JD, Iakoucheva LM, Obradovic Z (2002) Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* 41: 6573-6582
14. Wright PE, Dyson HJ (1999) Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* 293: 321-331
15. Uversky VN, Gillespie JR, Fink AL (2000) Why are „natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* 41: 415-427
16. Oldfield CJ, Cheng Y, Cortese MS, Brown CJ, Uversky VN, Dunker AK (2005) Comparing and combining predictors of mostly disordered proteins. *Biochemistry* 44: 1989-2000
17. Dunker AK, Obradovic Z, Romero P, Garner EC, Brown CJ (2000) Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* 11: 161-171
18. Holt C, Sawyer L (1993) Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the α S1-, β - and κ -caseins. *J Chem Soc Faraday Trans* 89: 2683-2692
19. Schweers O, Schonbrunn-Hanebeck E, Marx A, Mandelkow E (1994) Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J Biol Chem* 269: 24290-24297
20. Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT Jr (1996) NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35: 13709-13715
21. Lee H, Mok KH, Muhandiram R, Park KH, Suk JE, Kim DH, Chang J, Sung YC, Choi KY, Han KH (2000) Local structural elements in the mostly unstructured transcriptional activation domain of human p53. *J Biol Chem* 275: 29426-29432

22. Daughdrill GW, Pielak GJ, Uversky VN, Cortese MS, Dunker AK (2005) Natively disordered proteins. Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany
23. Uversky VN (2010) The mysterious unfoldome: structureless, underappreciated, yet vital part of any given proteome. *J Biomed Biotechnol* 2010: 568068
24. Halle B (2002) Flexibility and packing in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1274-1279
25. Dunker AK, Obradovic Z (2001) The protein trinity--linking function and disorder. *Nat Biotechnol* 19: 805-806
26. Uversky VN, Ptitsyn OB (1994) „Partly folded“ state, a new equilibrium state of protein molecules: four-state guanidinium chloride-induced unfolding of beta-lactamase at low temperature. *Biochemistry* 33: 2782-2791
27. Uversky VN, Ptitsyn OB (1996) Further evidence on the equilibrium „pre-molten globule state“: four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature. *J Mol Biol* 255: 215-228
28. Ptitsyn OB (1995) Molten globule and protein folding. *Adv Protein Chem* 47: 83-229
29. Uversky VN (2009) Intrinsically disordered proteins and their environment: effects of strong denaturants, temperature, pH, counter ions, membranes, binding partners, osmolytes, and macromolecular crowding. *Protein J* 28: 305-325
30. Uversky VN (2002) What does it mean to be natively unfolded? *Eur J Biochem* 269: 2-12
31. Uversky VN (2003) Protein folding revisited. A polypeptide chain at the folding-misfolding-nonfolding cross-roads: which way to go? *Cell Mol Life Sci* 60: 1852-1871
32. Williams RM, Obradovic Z, Mathura V, Braun W, Garner EC, Young J, Takayama S, Brown CJ, Dunker AK (2001) The protein non-folding problem: amino acid determinants of intrinsic order and disorder. *Pac Symp Biocomput* 89-100
33. Vacic V, Uversky VN, Dunker AK, Lonardi S (2007) Composition Profiler: a tool for discovery and visualization of amino acid composition differences. *BMC Bioinformatics* 8: 211
34. Romero P, Obradovic Z, Li X, Garner EC, Brown CJ, Dunker AK (2001) Sequence complexity of disordered protein. *Proteins* 42: 38-48
35. Radivojac P, Jakoucheva LM, Oldfield CJ, Obradovic Z, Uversky VN, Dunker AK (2007) Intrinsic disorder and functional proteomics. *Biophys J* 92: 1439-1456
36. Sickmeier M, Hamilton JA, LeGall T, Vacic V, Cortese MS, Tantos A, Szabo B, Tompa P, Chen J, Uversky VN, Obradovic Z, Dunker AK (2007) DisProt: the Database of Disordered Proteins. *Nucleic Acids Res* 35: D786-793
37. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235-42
38. Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger E, Huang H, Lopez R, Magrane M, Martin MJ, Natale DA, O'Donovan C, Redaschi N, Yeh LS (2005) The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 33(Database issue): D154-9
39. Turoverov KK, Kuznetsova IM, Uversky VN (2010) The protein kingdom extended: Ordered and intrinsically disordered proteins, their folding, supramolecular complex formation, and aggregation. *Prog Biophys Mol Biol* 102: 73-84
40. Romero P, Obradovic Z, Kissinger CR, Villafranca JE, Dunker AK (1997) Identifying disordered regions in proteins from amino acid sequences. *W: IEEE Int Conf Neural Netw*
41. Tompa P (2003) Intrinsically unstructured proteins evolve by repeat expansion. *Bioessays* 25: 847-855
42. Tompa P (2009) Structure and function of intrinsically disordered proteins. Chapman & Hall
43. Mohan A, Uversky VN, Radivojac P (2009) Influence of sequence changes and environment on intrinsically disordered proteins. *PLoS Comput Biol* 5: e1000497
44. Le Gall T, Romero PR, Cortese MS, Uversky VN, Dunker AK (2007) Intrinsic disorder in the Protein Data Bank. *J Biomol Struct Dyn* 24: 325-342
45. Bhalla J, Storch GB, MacCarthy CM, Uversky VN, Tcherkasskaya O (2006) Local flexibility in molecular function paradigm. *Mol Cell Proteomics* 5: 1212-1223
46. Bai Y, Chung J, Dyson HJ, Wright PE (2001) Structural and dynamic characterization of an unfolded state of poplar apo-plastocyanin formed under non-denaturing conditions. *Protein Sci* 10: 1056-1066
47. Jensen MR, Markwick PR, Meier S, Griesinger C, Zweckstetter M, Grzesiek S, Bernado P, Blackledge M (2009) Quantitative determination of the conformational properties of partially folded and intrinsically disordered proteins using NMR dipolar couplings. *Structure* 17: 1169-1185
48. Eliezer D (2009) Biophysical characterization of intrinsically disordered proteins. *Curr Opin Struct Biol* 19: 23-30
49. Dyson HJ, Wright PE (2002) Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr Opin Struct Biol* 12: 54-60
50. Mendoza C, Figueirido F, Tasayco ML (2003) DSC studies of a family of natively disordered fragments from *Escherichia coli* thioredoxin: surface burial in intrinsic coils. *Biochemistry* 42: 3349-3358
51. Millett IS, Doniach S, Plaxco KW (2002) Toward a taxonomy of the denatured state: small angle scattering studies of unfolded proteins. *Adv Protein Chem* 62: 241-262
52. Dyson HJ, Wright PE (2001) Nuclear magnetic resonance methods for elucidation of structure and dynamics in disordered states. *Methods Enzymol* 339: 258-270
53. Lakowicz JR (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer, Baltimore, Maryland, USA
54. Receveur-Brechot V, Bourhis JM, Uversky VN, Canard B, Longhi S (2006) Assessing protein disorder and induced folding. *Proteins* 62: 24-45
55. Demchenko AP (2001) Recognition between flexible protein molecules: induced and assisted folding. *J Mol Recognit* 14: 42-61
56. Vacic V, Oldfield CJ, Mohan A, Radivojac P, Cortese MS, Uversky VN, Dunker AK (2007) Characterization of molecular recognition features, MoRFs, and their binding partners. *J Proteome Res* 6: 2351-2366
57. Dunker AK (2007) Another window into disordered protein function. *Structure* 15: 1026-1028
58. Cheng Y, Oldfield CJ, Meng J, Romero P, Uversky VN, Dunker AK (2007) Mining alpha-helix-forming molecular recognition features with cross species sequence alignments. *Biochemistry* 46: 13468-13477
59. Dosztanyi Z, Meszaros B, Simon I (2009) ANCHOR: web server for predicting protein binding regions in disordered proteins. *Bioinformatics* 25: 2745-2746
60. Edwards RJ, Davey NE, Shields DC (2007) SLiMfinder: a probabilistic method for identifying over-represented, convergently evolved, short linear motifs in proteins. *PLoS One* 2: e967
61. Davey NE, Edwards RJ, Shields DC (2007) The SLiMDisc server: short, linear motif discovery in proteins. *Nucleic Acids Res* 35: W455-459
62. Puntervoll P, Linding R, Gemund C, Chabanis-Davidson S, Mattingsdal M, Cameron S, Martin DM, Ausiello G, Brannetti B, Costantini A, Ferre F, Maselli V, Via A, Cesareni G, Diella F, Superti-Furga G, Wyrwicz L, Ramu C, McGuigan C, Gudavalli R, Letunic I, Bork P, Rychlewski L, Kuster B, Helmer-Citterich M, Hunter WN, Aasland R, Gibson TJ (2003) ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res* 31: 3625-3630
63. Gould CM, Diella F, Via A, Puntervoll P, Gemund C, Chabanis-Davidson S, Michael S, Sayadi A, Bryne JC, Chica C, Seiler M, Davey NE, Haslam N, Weatheritt RJ, Budd A, Hughes T, Pas J, Rychlewski L, Trave G, Aasland R, Helmer-Citterich M, Linding R, Gibson TJ (2010) ELM: the status of the 2010 eukaryotic linear motif resource. *Nucleic Acids Res* 38: D167-180
64. Fuxreiter M, Tompa P, Simon I (2007) Local structural disorder imparts plasticity on linear motifs. *Bioinformatics* 23: 950-956

65. Zitzewitz JA, Ibarra-Molero B, Fishel DR, Terry KL, Matthews CR (2000) Preformed secondary structure drives the association reaction of GCN4-p1, a model coiled-coil system. *J Mol Biol* 296: 1105-1116
66. Sayers EW, Gerstner RB, Draper DE, Torchia DA (2000) Structural pre-ordering in the N-terminal region of ribosomal protein S4 revealed by heteronuclear NMR spectroscopy. *Biochemistry* 39: 13602-13613
67. Ramelot TA, Gentile LN, Nicholson LK (2000) Transient structure of the amyloid precursor protein cytoplasmic tail indicates preordering of structure for binding to cytosolic factors. *Biochemistry* 39: 2714-2725
68. Fuxreiter M, Simon I, Friedrich P, Tompa P (2004) Preformed structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins. *J Mol Biol* 338: 1015-1026
69. Fletcher CM, Wagner G (1998) The interaction of eIF4E with 4E-BP1 is an induced fit to a completely disordered protein. *Protein Sci* 7: 1639-1642
70. Oldfield CJ, Cheng Y, Cortese MS, Romero P, Uversky VN, Dunker AK (2005) Coupled folding and binding with alpha-helix-forming molecular recognition elements. *Biochemistry* 44: 12454-12470
71. Wright PE, Dyson HJ (2009) Linking folding and binding. *Curr Opin Struct Biol* 19: 31-38
72. Kriwacki RW, Hengst L, Tennant L, Reed SI, Wright PE (1996) Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11504-11509
73. Goh KI, Oh E, Jeong H, Kahng B, Kim D (2002) Classification of scale-free networks. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12583-12588
74. Watts DJ, Strogatz SH (1998) Collective dynamics of 'small-world' networks. *Nature* 393: 440-442
75. Ekman D, Light S, Bjorklund AK, Elofsson A (2006) What properties characterize the hub proteins of the protein-protein interaction network of *Saccharomyces cerevisiae*? *Genome Biol* 7: R45
76. Dunker AK, Cortese MS, Romero P, Iakoucheva LM, Uversky VN (2005) Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *Febs J* 272: 5129-5148
77. Dunker AK, Garner E, Guillot S, Romero P, Albrecht K, Hart J, Obradovic Z, Kissinger C, Villafranca JE (1998) Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations. *Pac Symp Biocomput*: 473-484
78. Cortese MS, Uversky VN, Dunker AK (2008) Intrinsic disorder in scaffold proteins: getting more from less. *Prog Biophys Mol Biol* 98: 85-106
79. Liu W, Rui H, Wang J, Lin S, He Y, Chen M, Li Q, Ye Z, Zhang S, Chan SC, Chen YG, Han J, Lin SC (2006) Axin is a scaffold protein in TGF-beta signaling that promotes degradation of Smad7 by Arkadia. *EMBO J* 25: 1646-1658
80. Uversky VN, Dunker AK (2008) *Biochemistry*. Controlled chaos. *Science* 322: 1340-1341
81. Gsponer J, Futschik ME, Teichmann SA, Babu MM (2008) Tight regulation of unstructured proteins: from transcript synthesis to protein degradation. *Science* 322: 1365-1368
82. Grimm M, Wang Y, Mund T, Cilensek Z, Keidel EM, Waddell MB, Jakel H, Kullmann M, Kriwacki RW, Hengst L (2007) Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell* 128: 269-280
83. Uversky VN, Fink AL (2004) Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim Biophys Acta* 1698: 131-153
84. Rochet JC, Lansbury PT Jr (2000) Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr Opin Struct Biol* 10: 60-68
85. Kelly JW (1998) The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Curr Opin Struct Biol* 8: 101-106
86. Galpern WR, Lang AE (2006) Interface between tauopathies and synucleinopathies: a tale of two proteins. *Ann Neurol* 59: 449-458
87. Uversky VN, Oldfield CJ, Dunker AK (2008) Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu Rev Biophys* 37: 215-246
88. Cheng Y, LeGall T, Oldfield CJ, Mueller JP, Van YY, Romero P, Cortese MS, Uversky VN, Dunker AK (2006) Rational drug design via intrinsically disordered protein. *Trends Biotechnol* 24: 435-442
89. Chene P (2004) Inhibition of the p53-MDM2 interaction: targeting a protein-protein interface. *Mol Cancer Res* 2: 20-28
90. Lavery DN, McEwan IJ (2005) Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem J* 391: 449-464

Intrinsically disordered proteins

Agnieszka Dziejcz-Letka, Andrzej Ozyhar 

Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry, Wrocław University of Technology, 27 Wybrzeże Wyspiańskiego, 50-370 Wrocław, Poland

e-mail: andrzej.ozyhar@pwr.wroc.pl

Key words: intrinsically disordered proteins, intrinsically disordered regions, disorder prediction, disorder identification

ABSTRACT

Intrinsically disordered proteins (IDPs) belong to the newly discovered and still growing group of proteins. In contrast to globular proteins IDPs fail to fold into a well-defined tertiary structure under physiological conditions and they are characterized by extraordinary structural flexibility and plasticity. These features enable IDPs to adopt different conformations in response to different stimuli or different partners. Additionally, a pliable polypeptide chain, much more accessible in IDPs, causes that IDPs can undergo extensive posttranslational modifications which might lead to further modulation of IDPs conformation enabling rapid regulation of IDPs activity. In this way IDPs are involved in regulation of various regulatory pathways and promoting the assembly of supramolecular complexes. IDPs discovery reveals a new face of proteins and constitutes a new challenge for modern biochemistry.

Dariusz Stępkowski

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: d.stepkowski@nenci.gov.pl

Artykuł otrzymano 9 listopada 2011 r.
Artykuł zaakceptowano 22 grudnia 2011 r.

Słowa kluczowe: amyloidogeneza, włókna amyloidowe, struktura fibryli amyloidowych

STRESZCZENIE

Niepożądana agregacja białek do włókien amyloidowych wynikająca z wadliwego fałdowania białka jest związana z etiologią wielu chorób człowieka i zwierząt. Mechanizm tego procesu jest intensywnie badany. Uważa się, że włókna amyloidowe są najbezpieczniejszą formą odkładania źle sfałdowanego białka, a formy najbardziej toksyczne dla komórek występują na wcześniejszych etapach agregacji. Z tego względu w niniejszym artykule przedstawiono najważniejsze osiągnięcia nauki w tej dziedzinie omawiając poszczególne etapy reakcji amyloidogenezy. Omówiono stan monomeryczny, etap oligomeryzacji aż do poglądowego omówienia struktury dojrzałych włókien z uwzględnieniem przyczyn polimorfizmu strukturalnego tych obiektów.

WPROWADZENIE

Amyloidogeneza jest rodzajem uporządkowanej agregacji peptydów i białek do włókien amyloidowych. Związana jest z wadliwym fałdowaniem struktury polipeptydów i białek. Występuje zarówno w organizmach żywych jak i w warunkach laboratoryjnych. Z amyloidogenezą określonych polipeptydów czy białek jest związanych ponad 40 chorób występujących u człowieka [1], a niektóre mają swoje odpowiedniki u zwierząt. Najbardziej rozpowszechnioną chorobą związaną z niepożądaną agregacją polipeptydu jest choroba Alzheimera (około 27 milionów chorych na świecie [2]). Amyloidozy, choroby związane z powstawaniem włókien amyloidowych stanowią zatem znaczny problem zdrowotny i społeczny. Mimo wieloletnich usilnych badań molekularny mechanizm powstawania włókien amyloidowych nie został do końca poznany. Niniejszy artykuł ma za zadanie przybliżyć czytelnikowi aktualny stan badań nad wybranymi aspektami tej tematyki.

REAKCJA AMYLOIDOGENEZY

Reakcję amyloidogenezy można skrótowo opisać jako ciąg zdarzeń według następującego schematu.: monomer* – oligomer- protofibryla- fibryla (*w przypadku większych monomerów do zajścia oligomeryzacji potrzebne jest częściowe rozfałdowanie struktury). Do pewnego stopnia reakcja amyloidogenezy jest podobna do znanej z chemii polimerów reakcji nukleacji, polimeryzacji z charakterystyczną fazą opóźnienia (ang. *lag phase*) opisywaną przez krzywą sigmoidalną. Etap oligomeryzacji jest zatem odpowiednikiem nukleacji, po którym następuje faza wydłużania. Uważa się, że etap powstawania oligomerów może być powiązany z ich konformacyjną restrukturyzacją do oligomerów kompetentnych do tworzenia fibryli [3] jak również, że niektóre rodzaje oligomerów mogą być poza ścieżką zmian konformacyjnych prowadzących do powstania fibryli. Nie jest też jasne czy fibryle powstają z bocznej asocjacji protofilamentów czy też rosną tworząc zasocjowane *in statu nascendi* protofilamenty [11].

MONOMERY

Reakcji amyloidogenezy ulegają bardzo różnorodne peptydy i białka. Ze względu na wielkość monomeru można je podzielić na peptydy (począwszy od sekwencji o długości kilku reszt aminokwasowych), polipeptydy i białka. Wydaje się, że większe białka mają mniejszą tendencję do agregacji do włókien amyloidowych tworząc chętniej agregaty nieuporządkowane [4]. Ze względu na ustrukturyzowanie monomery można podzielić na nieustrukturyzowane, α -helikalne, mieszane zawierające α -helisy i pasma β -struktury oraz zawierające w przewodzie β -struktury. Sekwencje aminokwasowe białek ulegających amyloidogenezie różnią się bardzo i raczej istotne dla transformacji do włókien amyloidowych są krótkie odcinki sekwencji o resztach aminokwasowych o określonych właściwościach [5-7]. Uważa się nawet, że nieomal każde białko można zmusić do takiej agregacji stosując określone sposoby częściowego rozfałdowania struktury [8]. To, że tylko nieliczne z białek ulegają tej transformacji *in vivo* należy przypisać dużej stabilności struktur natywnych [8]. Jak już wspomniano

monomery mają bardzo różną zawartość struktur drugorzędowych, począwszy od struktury kłębaka nieuporządkowanego do dużej zawartości α -heliksów lub β -struktury. Przejście do etapu oligomerów wymaga zatem różnej drogi transformacji do formy o dużej zawartości β -struktury (poprzecznie ułożone w stosunku do osi włókna pasma β -struktury są charakterystyczne dla włókien amyloidowych) w zależności od struktury początkowej.

OLIGOMERY

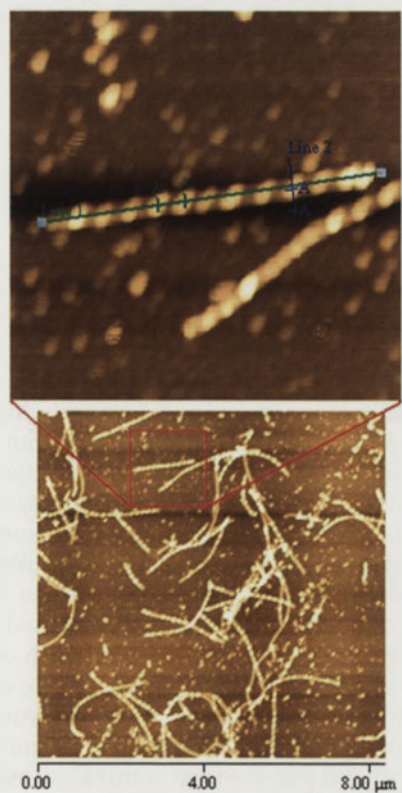
Oligomery są stosunkowo najtrudniejszym do badania etapem reakcji amyloidogenezy ze względu na ich znaczną niestabilność i różnorodność strukturalną. Wydaje się też, że nie wszystkie oligomery są na ścieżce prowadzącej do powstania włókien amyloidowych. Takim przykładem mogą być globulomery β -amyloidu, sferyczne agregaty tego peptydu [9,10]. Z występowaniem oligomerów wiąże się też problem cytotoksyczności tych agregatów. W przypadku β -amyloidu uważa się, że dojrzałe włókna są znacznie mniej neurotoksyczne niż oligomery (11). Część badaczy uważa, że dojrzałe włókna są sposobem usunięcia bardziej cytotoksycznych form i rodzajem magazynu niepotrzebnego białka, a nawet formą zmiatacza form toksycznych [12]. Występowanie różnych oligomerów rodzi pytanie czy wszystkie są jednakowo toksyczne. Stwierdzona dla β -amyloidu większa cytotoksyczność form oligomerycznych może być prawdziwa dla większości białek amyloidogennych. Na ścieżce transformacji do włókien amyloidowych prawdopodobnie dla większości rodzajów monomerów koniecznym etapem przejściowym jest helikalny stan pośredni. Istnienie takiego

stanu przejściowego dla wielu peptydów i polipeptydów a nawet dla niektórych białek jest dobrze udowodnione [11,13-16]. Ciekawym spostrzeżeniem jest fakt, że zbliżenie do siebie helikalnych peptydów, umocowanych jako równoległa wiązka na szkieletcie cząsteczki makrocyklu, zwiększa znakomicie efektywność transformacji do β -struktury [17]. Naturalnym wnioskiem z tych badań jest stwierdzenie, że dla zajścia transformacji do bogatej w β -strukturę formy fibryli potrzebne jest oddziaływanie między helisami. Zatem dla małych i średnich monomerów prawdopodobnym szlakiem transformacji do włókien amyloidowych jest przejście przez stan helikalny. Powstawaniu takiego stanu sprzyjać mogą warunki środowiska np. oddziaływanie z błoną lipidową. Postuluje się np. dla β -amyloidu, że przyjmuje on konformację helikalną w kontakcie z lipidami tworzącymi dwuwarstwę [18]. Dla szeregu peptydów stwierdzono, że dodanie do środowiska trifluoroetanolu (TFE), czynnika heliksotwórczego [19], przyspiesza transformację do włókien amyloidowych [20,21]. Obszerne omówienie koncepcji helikalnych stanów pośrednich jest zawarte w artykule Abedini i Raleigh [22]. Dla większych białek postuluje się jako warunek konieczny dla zajścia amyloidogenezy częściowe rozfałdowanie natywnej struktury sprzyjającej transformacji [8]. Z topologicznego punktu widzenia można rozważyć istnienie dwóch wariantów reakcji amyloidogenezy dla tych białek. Wyjście od struktury helikalnej i wyjście od β -struktury. W pierwszym przypadku musi nastąpić rozkręcenie helisy, związane z rotacją dużych fragmentów białka (β -struktura jest strukturą rozciągniętego głównego łańcucha polipeptydowego o kształcie piły zębatej, z którego, z atomu węgla C-alfa, wystają na obie strony łańcuchy boczne). W drugim przypadku możliwe jest po wstępnym niewielkim rozfałdowaniu, że istniejące pasma β -struktury zaczną ze sobą oddziaływać między monomerami i w ten sposób dokona się transformacja do włókna bez rotacji dużych fragmentów białka. Alternatywnie można postulować, że częściowe rozfałdowanie doprowadzi do powstania helikalnych fragmentów, a z kolei oddziaływanie tych fragmentów według wariantu pierwszego doprowadzi do agregacji do włókna amyloidowego. Mając na uwadze wyniki doświadczeń dla β -mikroglobuliny, białka β -strukturalnego wydaje się, że w tym przypadku etap helikalny jest omijany [23-25].

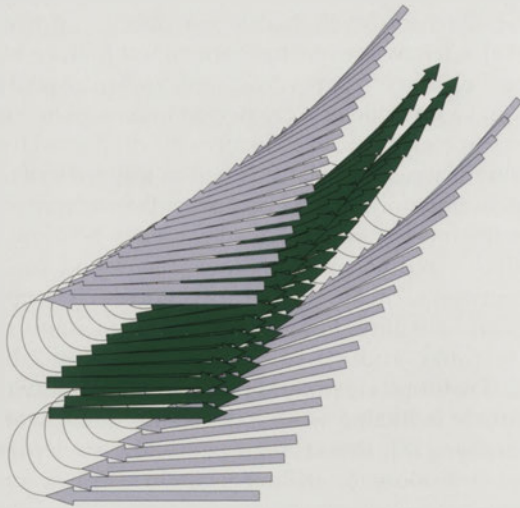
WŁÓKNA AMYLOIDOWE

Włókna amyloidowe są strukturami prostymi i nierozgałęzionymi. Przykładowy obraz takich włókien w mikroskopii sił atomowych jest przedstawiony na rycinie 1. Często morfologia tych włókien jest helikalna co wynika z wzajemnego okręcania się protofibrili względem siebie. Cechą charakterystyczną tych włókien jest występowanie poprzecznie ułożonych pasm β -struktury. Współczesne techniki NMR ciała stałego, dyfrakcji promieni X i różnych rodzajów mikroskopii a także, w przypadku małych peptydów amyloidogennych, krystalizacji, pozwoliły na częściowe scharakteryzowanie struktury protofilamentów niektórych polipeptydów. Stopień komplikacji struktury protofilamentu jest przedstawiony na rycinie 2, obrazującej schematycznie ułożenie pasm β -struktury wzorowane na strukturze protofilamentu β -amyloidu zaproponowanej przez zespół Roberta Tycko [26]. Rycina 3 pokazuje prawdopodobny układ ułożenia protofilamentów w hipotetycznej fibryli według

(503,332) x: 1.74 μ m y: 1.150 μ m z: 0.004209 μ m

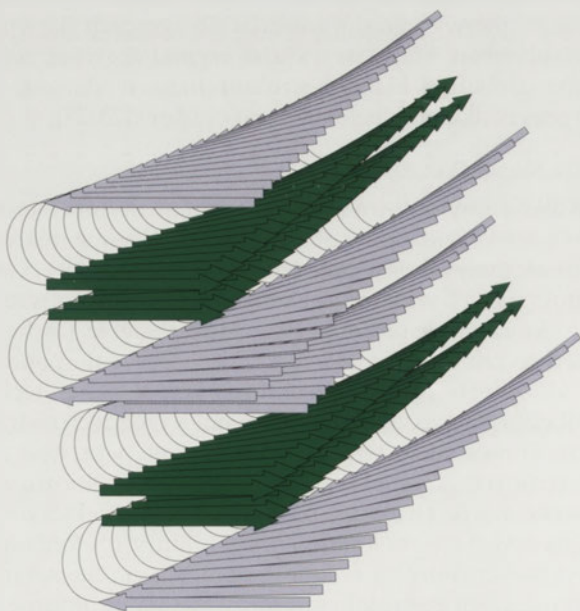


Rycina 1. Obrazy włókien β -amyloidu 1-40 otrzymane techniką mikroskopii sił atomowych. Udostępnione dzięki uprzejmości Andrzeja Szczepankiewicza i Danki Elbauma.

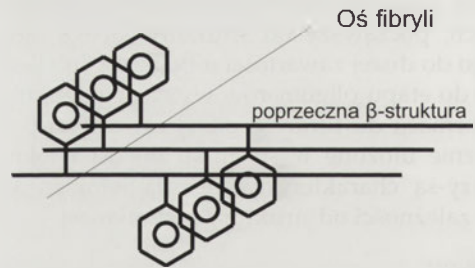


Rycina 2. Schemat ułożenia pasm β -struktury protofilamentu wzorowany na modelu struktury protofilamentu β -amyloidu 1-40; opracowano na podstawie [25].

autora niniejszego artykułu. Ryciny 2 i 3 są poglądowe i warto wspomnieć, że jest to jedna z możliwości oraz, że proponowane dla innych białek modele strukturalne włókien amyloidowych oparte mogą być na innej zasadzie organizacji przestrzennej [27]. Włókna β -amyloidu charakteryzują się różną morfologią zależną od środowiska w jakim powstają. Ostatnio opublikowano artykuł pokazujący możliwą przyczynę polimorfizmu włókien β -amyloidu [28]. Opisano w nim występowanie tak zwanego suwaka sterycznego (ang. *steric zipper*) w 11 rodzajach kryształów krótkich peptydów β -amyloidu zawierających odcinki amyloidogene. Autorzy postulują, że polimorfizm włókien β -amyloidu może wynikać z tworzenia suwaka sterycznego przez różne fragmenty sekwencji β -amyloidu [28]. Współczesna wiedza na temat struktury włókien β -amyloidu jest przedstawiona szczegółowo w artykule Fändrich i wsp. [29]. Polimorfizm

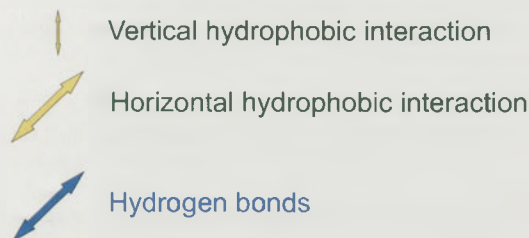
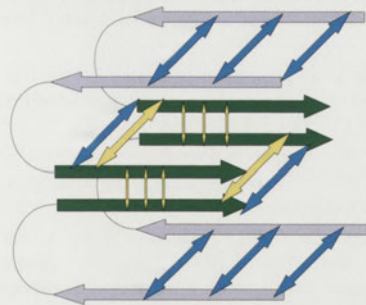


Rycina 3. Przykładowy sposób ułożenia protofilamentów w fibryli proponowany przez autora. Dwa protofilamenty są ułożone równoległe do siebie. Powierzchnie kontaktu między nimi mogą tworzyć suwak steryczny.



Rycina 4. Idea topologii ułożenia pasm β -struktury równoległej i w rejestrze. Trafianie identycznych reszt aminokwasowych na siebie wzdłuż osi fibryli pokazano na przykładzie reszt fenyloalanin 19 i 20 β -amyloidu. Rysunek jest wyidealizowanym przedstawieniem ułożenia łańcuchów bocznych. W rzeczywistości łańcuchy te mają pewną swobodę konformacyjną powodującą zapewne odstępstwa w regularności ich ułożenia. Jednakże regularność może również wiązać się z zyskiem energetycznym i przedstawiony obraz może nie odbiegać wiele od rzeczywistego ułożenia łańcuchów bocznych zwłaszcza aromatycznych.

strukturalny włókien amyloidowych jest prawdopodobnie cechą wspólną wszystkich rodzajów włókien amyloidowych [28]. Cechą charakterystyczną modelu protofilamentu β -amyloidu według Petkova i wsp. [26] jest topologia ułożenia łańcuchów polipeptydowych tworzących pasma β -struktury. Tak zwana równoległa i w rejestrze (ang. *parallel and in register*). Oznacza ona, że kierunek łańcucha polipeptydowego od końca aminowego do karboksylowego jest dla równoległych w strukturze poprzecznej łańcuchów ten sam oraz, że są one ustawione tak, że reszty o tej samej numeracji w sekwencji trafiają na siebie wzdłuż osi protofilamentu (Ryc. 4). Taka topologia jest preferowana przez większe polipeptydy gdyż zapewnia większą liczbę oddziaływań hydrofobowych wzdłuż osi protofilamentu [31]. Zjawisko to ilustruje rycina 5 przedstawiająca oddziaływania między pasmami struktury poprzecznej i wewnątrz jednej warstwy poprzecznej protofilamentu. Występują zatem dwa rodzaje oddziaływań: równoległe względem osi włókna i poprzeczne. Wzdłuż osi włókna występują oddziaływania łańcuchów bocznych oraz bardzo ważne ze względu na stabilizację włókna wiązania wodorowe między poprzecznymi głównymi łańcuchami polipeptydowymi. Oddziaływania poprzeczne do osi włókna występują między warstwami β -kartek i prawdopodobnie niektóre z nich tworzą suwak steryczny (Ryc. 6). Takie oddziaływania pierwotnie stwierdzono w kryształach peptydu pochodzącego z białka Sup35 prionu drożdży. Takie ugrupowanie przestrzenne nazwano " β -spine" postulując, że jest głównym kręgosłupem powstającego włókna amyloidowego [32]. Rozważania ułożenia przestrzennego oddziaływań we włóknie prowadzą jednak do wniosku, że ilość oddziaływań wzdłuż osi włókna (wiązania wodorowe i oddziaływania hydrofobowe łańcuchów bocznych) jest znacząco większa niż oddziaływań poprzecznych łańcuchów bocznych (suwak steryczny). Zakładając, że nie ma dramatycznych różnic między efektami energetycznymi zapięcia suwaka sterycznego i wiązań wodorowych oraz oddziaływań hydrofobowych wzdłuż osi włókna większa ilość tych dwóch ostatnich oddziaływań wskazywałaby na ich większą rolę w stabilizacji włókna. Z drugiej strony suwak steryczny stwierdzono w kryształach peptydów, co uzasadnia pytanie na ile strukturę krystaliczną można przenosić na warunki, w których kryształy nie powstają. Badania przy użyciu spektroskopii NMR (ang. *nuclear magnetic resonance*) nad włóknami amyloidowymi peptydu z Sup35 wskazują na większą różnorodność

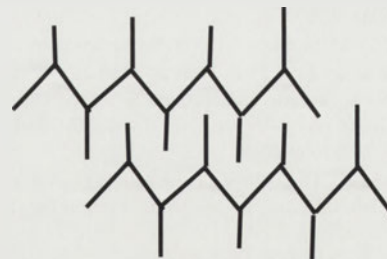


Rycina 5. Występowanie oddziaływań podłużnych i poprzecznych w stosunku do osi fibryli. Zaznaczono oddziaływania hydrofobowe oraz wodorowe. Pokazano przekrój przez protofilament zawierający dwie warstwy monomerów. Oddziaływania poprzeczne można podzielić na pionowe (w układzie rysunku) oraz boczne asocjacje łańcuchów bocznych (oddziaływania poziome w układzie rysunku, nie są uwidocznione). Zaproponowany schemat pokazuje raczej ideę ukierunkowania kontaktów między łańcuchami bocznymi kolejnych warstw protofilamentu niż rzeczywisty obraz oddziaływań. Takie podejście pozwala oszacować liczbę oddziaływań podłużnych i poprzecznych i ich relatywny wkład w stabilizację włókna.

strukturalną obecną w tych włóknach niż w kryształach nie wykluczając jednak występowania suwaka sterycznego [30]. Stwierdzenie, które z oddziaływań: podłużne czy poprzeczne są najistotniejsze dla stabilizacji struktury włókna będzie miało znaczenie dla rozpoznania ciągu zdarzeń prowadzących do powstania włókna amyloidowego.

REGIONY AMYLOIDOGENNE

W sekwencjach aminokwasowych białek występują rejonu kilku przylegających do siebie reszt, które mają potencjał amyloidogenny [5-7]. Wydaje się, że mogą to być dwa rodzaje odcinków sekwencji. Obszar przylegających reszt hydrofobowych [33,34] lub reszt asparaginy i glutaminy jak w białkach prionów drożdży lub w białkach o powtarzających się sekwencjach glutaminowo-asparaginowych (ang. *glutamine, asparagine repeats*). Sengen i wsp. [33,34] pokazali zależność efektywności transformacji do β -struktury, od hydrofobowości kluczowych reszt aminokwasowych analogów fragmentu β -amyloidu 16-22. Oprócz hydrofobowości również wielkość przestrzenna reszt miała znaczenie dla efektywności transformacji. Na podstawie tych badań można wysnuć wniosek, że im bardziej hydrofobowy odcinek amyloidogenny sekwencji tym będzie bardziej sprzyjał transformacji do β -struktury. Inna sytuacja jest w przypadku powtórzeń sekwencji glutaminowo-asparaginowych o wysokiej zdolności do tworzenia suwaka sterycznego [32] gdzie najprawdopodobniej oddziaływania van der Waalsa między upakowanymi gęsto łańcuchami bocznymi uczestniczących w suwaku sterycznym reszt aminokwasowych z przylegających β -kartek decydują o trwałości takiego ugrupowania przestrzennego (Ryc. 6). Opracowanych jest



Rycina 6. Schematyczne przedstawienie wzajemnego oddziaływania łańcuchów bocznych dwóch przylegających warstw β -kartki w ramach suwaka sterycznego. Jest to przykład oddziaływań poprzecznych.

szereg metod teoretycznych przewidywania odcinków amyloidogennych opartych o różne zasady (statystyczne i fizykochemiczne bądź ich połączenie) [35]. Znaczenie tych metod jest potencjalnie bardzo duże gdyż znajomość odcinka amyloidogennego może pomóc w opracowaniu leku skierowanego na tę sekwencję, hamującego transformację do β -struktury. W przypadku amyliny (IAPP) małego polipeptydu (hormonu) znajomość amyloidogennych reszt aminokwasowych doprowadziła do opracowania syntetycznej amyliny, która została zarejestrowana do leczenia ludzi w przypadku cukrzycy typu pierwszego i drugiego, w której amyлина tworzy włókna amyloidowe. W syntetycznej amylinie zastąpiono reszty hydrofobowe F25, L28, I29 przez reszty proliny, znany łamacz β -struktury, przez co zmieniono jej właściwości w kierunku braku tendencji do agregacji. Dalszy rozwój metod teoretycznego wyszukiwania odcinków amyloidogennych sekwencji aminokwasowych białek i peptydów będzie sprzyjał opracowaniu metod zapobiegania ich amyloidogenezie.

PODSUMOWANIE

Ostatnie lata przyniosły znaczny postęp w badaniach nad amyloidogenezą. Tworzące się w reakcji amyloidogenezy oligomery uważane są za formy szczególnie cytotoksyczne podczas gdy dojrzałe włókna w złogach amyloidowych są zapewne mniej szkodliwe i prawdopodobnie mogą spełniać rolę zmiataczy szkodliwych form oligomerycznych. Jeżeli chodzi o formowanie się oligomerów to wydaje się, że oddziaływania hydrofobowe mają znaczną rolę. Polimorfizm dojrzałych włókien może wynikać z zapoczątkowania oligomeryzacji przez inny odcinek amyloidogenny. Dla wielu polipeptydów pierwszym etapem tworzenia oligomerów jest wyjściowy lub przejściowy stan helikalny. Rozwój teoretycznych metod przewidywania odcinków amyloidogennych może ułatwić projektowanie związków chemicznych (np. peptydów) do ich blokowania w celu zapobieżenia agregacji.

PIŚMIENNICTWO

1. Chiti F, Dobson CM (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 75: 333-366
2. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dementia* 3: 186-191
3. Lee J, Culyba EK, Powers ET, Kelly JW (2011) Amyloid- β forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. *Nat Chem Biol* 7: 602-609
4. Ramshini H, Parrini C, Relini A, Zampagni M, Mannini B, Pesce A, Saboury AA, Nemat-Gorgani M, Chiti F (2011) Large proteins have

- a great tendency to aggregate but a low propensity to form amyloid fibrils. *PLoS One* 6: e16075
5. Lopez de la Paz M, Serrano L (2004) Sequence determinants of amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 87-92
 6. Esteras-Chopo A, Serrano L, Lopez de la Paz M (2005) The amyloid stretch hypothesis: recruiting proteins toward the dark side. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 1639-1648
 7. Teng PK, Eisenberg D (2009) Short protein segments can drive a non-fibrillizing protein into the amyloid state. *Protein Eng Des Sel* 22: 531-536
 8. Chiti F, Dobson CM (2009) Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat Chem Biol* 5: 15-22
 9. Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H (2005) Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 95: 834-847
 10. Gellermann GP, Byrnes H, Striebinger A, Ullrich K, Mueller R, Hillen H, Barghorn S (2008) Abeta-globulomers are formed independently of the fibril pathway. *Neurobiol Dis* 30: 212-220
 11. Härd T (2011) Protein engineering to stabilize soluble amyloid β -protein aggregates for structural and functional studies. *FEBS J* 278: 3884-3892
 12. Wolfe KJ, Cyr DM (2011) Amyloid in neurodegenerative diseases: friend or foe? *Semin Cell Dev Biol* 22: 476-481.
 13. Stöhr J, Weinmann N, Wille H, Kaimann T, Nagel-Steger L, Birkmann E, Panza G, Prusiner SB, Eigen M, Riesner D (2008) Mechanisms of prion protein assembly into amyloid. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2409-2414
 14. Williamson JA, Loria JP, Miranker AD (2009) Helix stabilization precedes aqueous and bilayer-catalyzed fiber formation in islet amyloid polypeptide. *J Mol Biol* 393: 383-396
 15. Liu G, Prabhakar A, Aucoin D, Simon M, Sparks S, Robbins KJ, Sheen A, Petty SA, Lazo ND (2010) Mechanistic studies of peptide self-assembly: transient α -helices to stable β -sheets. *J Am Chem Soc* 132: 18223-18232
 16. Bjorndahl TC, Zhou GP, Liu X, Perez-Pineiro R, Semenchenko V, Saleem F, Acharya S, Bujold A, Sobsey CA, Wishart DS (2011) Detailed biophysical characterization of the acid-induced PrP(c) to PrP(β) conversion process. *Biochemistry* 50: 1162-1173
 17. Singh Y, Sharpe PC, Hoang HN, Lucke AJ, McDowall AW, Bottomley SP, Fairlie DP (2011) Amyloid formation from an α -helix peptide bundle is seeded by 3(10)-helix aggregates. *Chemistry* 17: 151-160
 18. Ikeda K, Yamaguchi T, Fukunaga S, Hoshino M, Matsuzaki K (2011) Mechanism of amyloid β -protein aggregation mediated by GM1 ganglioside clusters. *Biochemistry* 50: 6433-6440
 19. Celinski SA, Scholtz JM (2002) Osmolyte effects on helix formation in peptides and the stability of coiled-coils. *Protein Sci* 11: 2048-2051
 20. Otzen DE (2010) Amyloid formation in surfactants and alcohols: membrane mimetics or structural switchers? *Curr Protein Pept Sci* 11: 355-371
 21. Sekhar A, Udgaonkar JB (2011) Fluoroalcohol-induced modulation of the pathway of amyloid protofibril formation by barstar. *Biochemistry* 50: 805-819
 22. Abedini A, Raleigh DP (2009) A critical assessment of the role of helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded proteins and polypeptides. *Protein Eng Des Sel* 22: 453-459
 23. Rennella E, Corazza A, Giorgetti S, Fogolari F, Viglino P, Porcari R, Verga L, Stoppini M, Bellotti V, Esposito G (2010) Folding and fibrillogenesis: clues from beta2-microglobulin. *J Mol Biol* 401: 286-297
 24. Santambrogio C, Ricagno S, Sobott F, Colombo M, Bolognesi M, Grandori R (2011) Characterization of β 2-microglobulin conformational intermediates associated to different fibrillation conditions. *J Mass Spectrom* 46: 734-741
 25. Eichner T, Radford SE (2011) Understanding the complex mechanisms of β (2) -microglobulin amyloid assembly. *FEBS J* 278: 3868-3883
 26. Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R (2002) A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16742-16747
 27. Van Melckebeke H, Wasmer C, Lange A, Ab E, Loquet A, Böckmann A, Meier BH (2010) Atomic-resolution three-dimensional structure of HET-s(218-289) amyloid fibrils by solid-state NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 132: 13765-13775
 28. Colletier JP, Laganowsky A, Landau M, Zhao M, Soriaga AB, Goldschmidt L, Flot D, Cascio D, Sawaya MR, Eisenberg D (2011) Molecular basis for amyloid-b polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 16938-16943
 29. Fändrich M, Schmidt M, Grigorieff N (2011) Recent progress in understanding Alzheimer's β -amyloid structures. *Trends Biochem Sci* 36: 338-345
 30. Lewandowski JR, van der Wel PC, Rigney M, Grigorieff N, Griffin RG (2011) Structural Complexity of a Composite Amyloid Fibril. *J Am Chem Soc* 133: 14686-14698
 31. Margittai M, Langen R (2008) Fibrils with parallel in-register structure constitute a major class of amyloid fibrils: molecular insights from electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Q Rev Biophys* 41: 265-297
 32. Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Madsen AØ, Riekel C, Grothe R, Eisenberg D (2005) Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435: 773-778
 33. Senguen FT, Lee NR, Gu X, Ryan DM, Doran TM, Anderson EA, Nilsson BL (2011) Probing aromatic, hydrophobic, and steric effects on the self-assembly of an amyloid- β fragment peptide. *Mol Biosyst* 7: 486-496
 34. Senguen FT, Doran TM, Anderson EA, Nilsson BL (2011) Clarifying the influence of core amino acid hydrophobicity, secondary structure propensity, and molecular volume on amyloid- β 16-22 self-assembly. *Mol Biosyst* 7: 497-510
 35. Hamodrakas SJ (2011) Protein aggregation and amyloid fibril formation prediction software from primary sequence: towards controlling the formation of bacterial inclusion bodies. *FEBS J* 278: 2428-2435

Selected aspects of amyloidogenesis

Dariusz Stępkowski[✉]

Department of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, 3 Pasteur St., 02-093 Warsaw, Poland

[✉]e-mail: d.stepkowski@nencki.gov.pl

Key words: amyloidogenesis, amyloid fibrils, structure of amyloid fibrils

ABSTRACT

Unwanted aggregation of proteins into amyloid fibrils caused by protein misfolding is connected with many human and animal diseases. Mechanism of this process is intensively studied. In the present paper main achievements in this field are described. Some researchers postulate that fibrils are the less harmful species and the most toxic species are the earlier aggregates on the path to mature fibrils. Therefore, monomeric, oligomeric and finally mature fibrils stages of the reaction of amyloidogenesis are reviewed with attention paid to the problem of structural polymorphism of fibrils.

Dodaj trochę koloru do swojego Real-Time PCR

DyNAmo™ SNP Genotyping Master Mix

Nowy zestaw do genotypowania polimorfizmów pojedynczych nukleotydów

- Niezwykle szybki protokół - unikalny, zoptymalizowany skład buforu reakcyjnego umożliwia uzyskanie wyników w czasie 50 minut.
- Wysoka wydajność i czułość detekcji oraz powtarzalność reakcji SNP.
- Niewielka ilość materiału potrzebna do reakcji - dokładne wyniki genotypowania już z 0,5 ng DNA.
- Innowacyjny dwukolorowy system zapewnia poprawne pipetowanie (w szczególności na białych płytках).
- Uniwersalny - kompatybilny z większością powszechnie stosowanych instrumentów do reakcji PCR w czasie rzeczywistym, także z Thermo Scientific PikoReal® Real-Time PCR System.
- Mix reakcyjny stabilny przez 3 dni w 4°C - idealny do badań genotypowania w laboratoriach na szeroką skalę.
- Zwiększona dokładność dyskryminacji w porównaniu do niezoptymalizowanych zestawów opartych o sondy molekularne TaqMan®.
- **Dostępne bezpłatne próbki DyNAmo™ SNP Genotyping Master Mix.**

Informacje do zamówienia

Numer katalogowy	Produkt	Opakowanie
F-480S	DyNAmo™ SNP Genotyping Master Mix	200 reakcji (25 µl każda)
F-480L		1000 reakcji (25 µl każda)
F-480XL		4000 reakcji (25 µl każda)

Jedyny autoryzowany dystrybutor



abo Grażyna Tarnowska Boreysza, 80-255 Gdańsk, ul. Podleśna 6A,
Adres biura: ul. Wichrowe Wzgórze 123, 80-293 Gdańsk
Tel.: 58 341 21 43, Fax: 58 520 33 80,
abo@abo.com.pl, www.abo.com.pl

<http://rcin.org.pl>



Muse™ cell analyzer. Simply see more.

Achieve smarter cell analysis with your own Muse™.

Be inspired by innovation at your side. The Muse™ Cell Analyzer delivers accurate assessments of cell viability, apoptosis and cell cycle in just minutes, revolutionizing the way you analyze cells. With the Muse™ Cell Analyzer's miniaturized optics, sleek, touchscreen operation and simple sample prep, you can make faster, more accurate decisions about your experiments, for more productive research.

Muse™ advantages:

- Simple, effortless operation
- Accurate and reliable results
- Intuitive software and touchscreen user interface
- Rapid setup and analysis
- Optimized assays
- Compact and affordable



www.millipore.com/muse

Merck Sp. z o.o.,
Aleje Jerozolimskie 178, 02-486 Warszawa
tel.: 022 53 59 770; fax: 022 53 59 945
dzial.handlowy@merckgroup.com