

Zeszyt Studentów Biotechnologii

ACTA MYGENICA

numer 5

Kraków, luty 2014

Zespół redakcyjny:

Jan Majta
Maciej Bąk
Justyna Barut
Katarzyna Chamera
Jan Kierzyk
Barbara Szewczyk
Marta Tempes
Katarzyna Wajda-Nikiel

Okładka:
Piotr Kubicki

Skład:
Jan Majta
Jakub Skrzeczkowski

Korekta:
Zespół Redakcyjny

Wydawca: KNSB Mygen

Nakład: 500

Kontakt:
jan.majta@gmail.com

ISSN: 1899-5535

Dofinansowane przez:



Kraków, luty 2014

Od redakcji

DRODZY CZYTELNICY,

Witam Was na łamach kolejnego numeru czasopisma naukowego ACTA MYGENICA! Wracamy po wakacjach i zimowym semestrze roku akademickiego z nową porcją artykułów. Zaczynamy krótką sekcją podsumowującą ostatnie pół roku, a tam między innymi relacja z rozdania tegorocznych nagród Nobla i informacja o jeszcze gorących wynikach badań grupy Haruko Obokata, która opracowała rewolucyjnie prostą technikę otrzymywania pluripotentnych komórek macierzystych. Jednocześnie udostępniamy nasze łamy organizatorom konferencji, które odbędą się w nadchodzącym półroczu - gorąco zachęcamy do udziału w tych wydarzeniach.

W kolejnej sekcji prezentujemy prace nadesłane do naszej Redakcji. Sara Przetocka przybliży ciekawe zagadnienie DARPin, które nazywa perspektywiczną alternatywą przeciwciał. Pracownicy firmy Vita InSillica zaprezentują nowoczesne metody sekwencjonowania kwasów nukleinowych. Reprezentujący Zakład Biologii

Komórki Marcin Luty przedstawi zagadnienie mikrofragmentów, które mogą stać się kolejnym narzędziem w terapii antynowotworowej. Adrian Miara, z koła naukowego MEDIGENET, opíše w swojej pracy przeglądowej metaloproteinazy skupiając się na ich roli w różnego rodzaju patologiach. Przedstawiciel Zakładu Biochemii Ogólnej - Piotr Konieczny natomiast upatruje przyszłość medycyny w nanotechnologiach biologicznych. Warte uwagi są też prace pochodzące z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, opisujące związki flawonoidowe oraz potencjalne działanie prozdrowotne związków pochodzących z piwa. Ponadto przeglądową pracę na temat białka ADAM 17 przedstawi Marcin Markiewicz. Na deser praca opisująca projekt nukowy Koła Mygen, czyli otrzymanie termostabilnej polimerazy Pfu na potrzeby prac badawczych Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ.

JAN MAJTA

II Studencka Konferencja Biologii Medycznej



biofuzje

23-25.05.2014

Uniwersytet Warszawski

Wydział Biologii

www.biofuzje.pl

IV bloki tematyczne



Immunologia



Nowotworzenie



**Genetyka
Medyczna**



**Komórki
Macierzyste**



**Koło Naukowe
Biologii Medycznej
„Antidotum”**

Organizatorzy

Tegoroczna edycja ogólnopolskiej konferencji naukowej „Biofuzje” odbędzie się w dniach 23-25.05.2014 r. na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego! Zeszłoroczne „Biofuzje”, flagowy projekt Koła Naukowego Biologii Medycznej „Antidotum”, cieszyły się dużym zainteresowaniem ze strony studentów i młodych naukowców z całego kraju, zostały też przez nich pozytywnie i wysoko

ocenione, co zaowocowało wyróżnieniem Koła w konkursie StRuNa 2013. Warto dodać, że zapraszani są na nią znakomici goście, specjaliści w danej dziedzinie, którzy chętnie dzielą się swoją wiedzą, prowadząc wykłady jak również biorąc udział w dyskusjach.

Więcej informacji oraz formularz rejestracyjny: **biofuzje.pl**

POLYGEN®

Aparatura i odczynniki dla biologii molekularnej

Firma **POLYGEN** pojawiła się na polskim rynku aparatury naukowo-badawczej w 1991 roku. Początkowo, jak wielu innych, oferowaliśmy urządzenia różnych firm, dostarczane według wyboru klienta, ale z upływem czasu zdecydowaliśmy się wyłącznie na producentów najnowocześniejszych aparatów o najwyższej jakości. Obserwując dynamikę rozwoju nauk przyrodniczych, skoncentrowaliśmy się od samego początku na wyposażaniu laboratoriów biologii molekularnej w urządzenia umożliwiające wykorzystanie najnowocześniejszych technik badawczych.

Naturalnym następstwem sprzedawania dużych ilości aparatury było utworzenie własnego serwisu naprawczego. Chętnie uczestniczymy w zjazdach naukowych oraz współorganizujemy szkolenia i warsztaty poświęcone metodom stosowanym w biologii molekularnej.

Mając nadzieję, że nasza działalność spełnia oczekiwania naszych dotychczasowych Klientów zapraszamy do współpracy wszystkich, kontaktujących się z nami po raz pierwszy.

Mamy w swojej ofercie urządzenia takich renomowanych marek jak np:

BIOMETRA , SIGMA Laborzentrifugen, NEW BRUNSWICK Sci., VILBER LOURMAT, LICOR, IMPLEN , JULABO, HLC DITABIS, CONSORT, CLEAVER Sci., SARTORIUS, VACUUBRAND, EDWARDS.

Nasza oferta obejmuje między innymi:

- Amplifikatory DNA
- Systemy rejestracji obrazu, obiektów biologicznych i analizy DNA w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR)
- Aparatura do prowadzenia fermentacji i hodowli komórkowych
- Inkubatory CO₂
- Inkubatory z funkcją wytrząsania
- Zamrażarki niskotemperaturowe (-86°C)
- Wirówki
- Systemy dokumentacji i analizy obrazu
- Skaner do rejestracji chemiluminescencji
- Transiluminatory i aparatura UV
- Elektroforeza i transfer makrocząsteczek
- pipety
- Termomiksery i termobloki
- Suszarki, sterylizatory i inkubatory laboratoryjne
- Piece hybrydizacyjne
- Kołyski laboratoryjne
- Odczynniki do biologii molekularnej
- Spektrofotometr do pomiaru nanoobjętości DNA/RNA/BIAŁEK
- Pompy i akcesoria do wytwarzania próżni

Kontakt:

POLYGEN Spółka z o. o.
ul. Krzemieniecka 53
54-613 Wrocław
www.polygen.pl

Pocztą elektroniczną:

dział handlowy:
biuro@polygen.pl
sprzedaz@polygen.pl
lukasz@polygen.pl
serwis:
serwis@polygen.pl

Telefony:

71 373 51 50
71 373 48 41
71 3580 500 - sekretariat
71 3580 501 - księgowość
71 3580 502/504 - sprzedaż
71 3580 506 - serwis
603 999 410

Faks:

71 374 46 28

NOBEL 2013: MECHANIZM TRANSPORTU PĘCHERZYKOWEGO

W 2013 roku Nagrodę Nobla z dziedziny Fizjologii i Medycyny otrzymało trzech amerykańskich naukowców: James E. Rothman, Randy W. Schekman oraz Thomas C. Südhof. Jak uzasadniła Komisja Noblowska, badacze zostali wyróżnieni „za ich odkrycia dotyczące maszynerii regulującej transport pęcherzykowy – główny system transportowy w naszych komórkach.”

Badania prowadzone przez laureatów są bardzo podstawowe, mają jednak ogromny wpływ na zrozumienie wielu procesów zachodzących w komórce, a także w całym organizmie.

Każda komórka nieustannie produkuje, przemieszcza i eksportuje poza swój obszar rozmaite cząsteczki. Przykładami takich substancji mogą być enzymy, hormony czy neurotransmitery, które po wyprodukowaniu są pakowane do pęcherzyków – niewielkich, zamkniętych struktur, oddzielonych od środowiska zewnętrznego co najmniej jedną dwuwarstwą lipidową. Pęcherzyki te mogą przemieszczać się w obrębie komórki, a także być transportowane na zewnątrz.

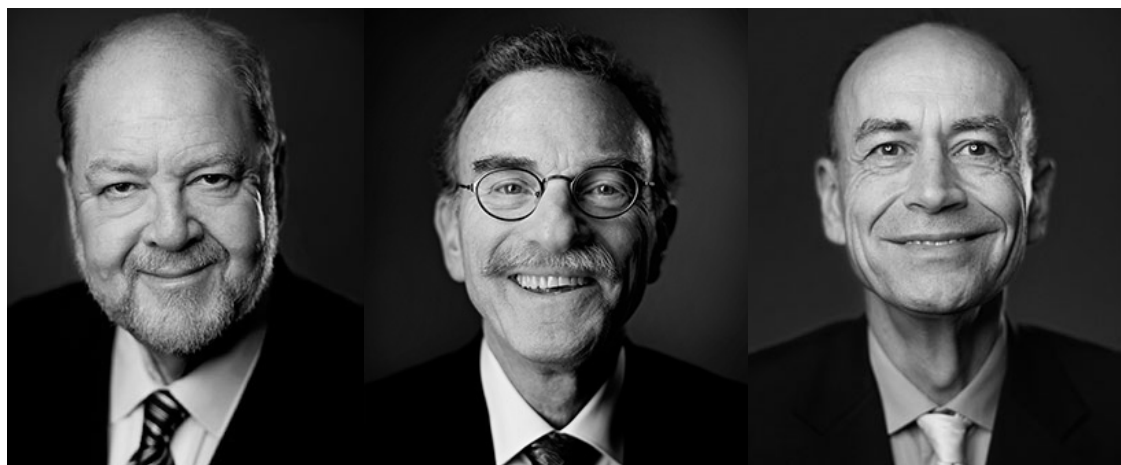
Molekularny mechanizm, który reguluje transport pęcherzyka z konkretną zawartością do danego miejsca i we właściwym czasie, przez długi czas pozostawał niewyjaśniony. Laureatom nagrody udało się jednak w dużym stopniu wyjaśnić tę zagadkę. Każdy z nich wniósł swój wkład w rozwikłanie tego problemu.

Schekman, zajmujący się biologią komórkową na Uniwersytecie Kalifornijskim w Berkeley, zidentyfikował zestaw kluczowych genów, regulujących proces transportu pęcherzykowego i podzielił je na trzy klasy – wpływające na transport pozakomórkowy, na transport w obrębie aparatu Golgiego oraz na transport związany z retikulum endoplazmatycznym. Naukowiec dokonał swoich odkryć prowadząc żmudny screening genetyczny drożdży *Saccharomyces cerevisiae* z defektem systemu transportowego. Dokonania Schekmana nie tylko umożliwiły lepsze zrozumienie funkcjonowania komórki, ale także przyczyniły się do osiągnięć w dziedzinie biotechnologii, takich jak

efektywne pozyskiwanie insuliny czy hormonu wzrostu ze zmodyfikowanych genetycznie hodowli drożdży, produkujących te substancje.

Kolejny z noblistów, Rothman, biolog komórkowy z Uniwersytetu Yale, ustalił, że za możliwość fuzji pęcherzyka transportowego z miejscem jego przeznaczenia, odpowiada rodzina białek SNARE. Cząsteczki te były znane już wcześniej, jednak dopiero Rothmanowi udało się ustalić ich funkcję w komórce. Co więcej, wykazał on, że białka SNARE są wysoce specyficzne – cząsteczka SNARE na powierzchni membrany docelowej może oddziaływać tylko z jednym lub kilkoma typami białka SNARE na powierzchni pęcherzyka. Okazało się również, że niektóre spośród genów zidentyfikowanych przez Schekmana u drożdży, kodują białka odpowiadające tym odkrytym przez Rothmana u ssaków, co wskazuje na wysoką konserwatywność ewolucyjną systemu transportu pęcherzykowego.

Z kolei Südhof, biochemik pracujący na Uniwersytecie Stanford, odkrył w jaki sposób regulowany i koordynowany w odpowiedzi na sygnał jest transport pęcherzyków przekazujących neurotransmitery w synapsie nerwowej. W przekaz sygnału nerwowego zaangażowane są jony wapnia i, jak odkrył Südhof, to również one wpływają na transport pęcherzyków w synapsie, poprzez stykulowanie wrażliwych na wapń białek – kompleksyny i synaptotagminy-1, których aktywność umożliwia uwolnienie pęcherzyków zawierających neurotransmitery w odpowiedzi na sygnał. Odkrycia dokonane przez trzech amerykańskich badaczy łączą obie dziedziny, które składają się na kategorię „Fizjologia i Medycyna”. Nie tylko



wyjaśniają mechanizmy kierujące transportem pęcherzykowym, ale także w przyszłości mogą przyczynić się do skuteczniejszego leczenia takich chorób jak cukrzyca, choroba Alzheimera, choroba Parkinsona czy choroby autoimmunologiczne, gdyż podejrzewa się, że zaburzenia w procesie transportu pęcherzykowego leżą u podstaw powstawania tych schorzeń. Przed ogłoszeniem nazwisk laureatów nagrody, agencja Thomson Reuters, która zajmuje się

przewidywaniem nazwisk zwycięzców na podstawie liczby cytowań prac, spekulowała, że Nobel trafi do naukowców badających raka piersi oraz nowe możliwości jego leczenia, zjawisko metylacji DNA lub autofagii. Jednak wyróżnienie Rothmana, Schekmana oraz Südhofa za ich dokonania jest w pełni uzasadnione, gdyż ich wkład w kształt współczesnej wiedzy na temat biologii komórki nie mógł pozostać niedoceniony.

Barbara Szewczyk

Novick P, Schekman R: Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:1858-1862
Balch WE, Dunphy WG, Braell WA, Rothman JE: Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. Cell 1984; 39:405-416.
Kaiser CA, Schekman R: Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. Cell 1990; 61:723-733.
Perin MS, Fried VA, Mignery GA, Jahn R, Südhof TC: Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to

the regulatory region of protein kinase C. Nature 1990; 345:260-263.

Sollner T, Whiteheart W, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE: SNAP receptor implicated in vesicle targeting and fusion. Nature 1993; 362:318-324.

Hata Y, Slaughter CA, Südhof TC: Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. Nature 1993; 366:347-351.

Artykuł na podstawie materiałów udostępnionych przez Fundację Nobla (www.nobelprize.org).

KOMÓRKI MACIERZYSTE: NOWY SPOSÓB REPROGRAMOWANIA KOMÓREK

Pierwszym wielkim wydarzeniem w świecie medycyny regeneracyjnej w 2014 roku okazał się innowacyjny sposób indukcji stanu pluripotencji w komórkach somatycznych. W przeciwieństwie do stosowanych powszechnie sposobów reprogramowania komórek zróżnicowanych opracowana metoda opiera się na czynnikach fizykochemicznych, a cała procedura trwa 30 minut.

Odkąd w 2006 roku Takahashi i Yamanaka pokazali, iż mysie komórki zróżnicowane zarówno pochodzenia zarodkowego jak i z dorosłego organizmu mogą uzyskać charakter komórek macierzystych (iPSCs, komórki iPS) grupy badawczej na całym świecie prześcigają się w opracowywaniu coraz to nowszych, bezpieczniejszych i łatwiejszych sposobów indukcji stanu pluripotencji. W oryginalnej pracy autorzy stosują nadekspresję 4 czynników transkrypcyjnych: Oct4, Sox2, Klf4 oraz c-Myc, wprowadzanych do komórek za pomocą wektorów retrowirusowych. Późniejsze badania pokazują, że niektóre z nich są zbędne i wskazują na cząsteczki alternatywne dla nich, jednak ich kombinacja wystarczająca do zajścia procesu reprogramowania jest zależna od typu komórek transdukowanych (gatunku i tkanki). Dodatkowo, stosowanie wektorów retrowirusowych (a w późniejszych pracach – również lentiwirusowych) rodzi niebezpieczeństwo mutagenyzy insercyjnej, co jest poważną przeszkodą na drodze do zastosowania terapeutycznego uzyskiwanych komórek iPS. Alternatywne sposoby to wprowadzenie do komórek rekombinowanych białek (piPSCs), syntetycznych cząsteczek mRNA (RiPSCs), a także cząsteczek mikroRNA. Okazuje się ponadto, że obiecującym wektorem dla czynników transkrypcyjnych może być wirus Sendai, który nie integruje w genom gospodarza. Wszyst-

kie wymienione metody są jednak wolne i nieefektywne lub charakteryzuje je niska powtarzalność. Niestety, wydaje się, że im więcej potencjalnie niebezpiecznych czynników jest wyeliminowanych z procesu tym trudniej przeprowadzić reprogramowanie.

W 2008 roku kolejne prace wskazały, iż niewielkie, chemiczne cząsteczki, jak np. kwas walproinowy, mogą zwiększać efektywność reprogramowania, lub stanowić substytut niektórych czynników transkrypcyjnych. Cząsteczki te wpływając na stan chromatyny lub ścieżki przekazywania sygnałów wewnątrz komórki. W 2013 roku raport chińskiej grupy opublikowany w czasopiśmie Science pokazał możliwość skutecznego reprogramowania komórek mysich z wykorzystaniem wyłącznie 7 drobnocząsteczkowych związków chemicznych (CiPSCs). Efektywność tego procesu jest porównywalna ze standardowym protokołem z wykorzystaniem czynników transkrypcyjnych w wektorach wirusowych (< 1%). Był to pierwszy krok w kierunku porzucenia genetycznych modyfikacji na korzyść aktywacji konkretnych szlaków sygnalizacyjnych.

30 stycznia tego roku, wraz z nowym numerem magazynu Nature, światło dzienne ujrzały 2 prace dr Obokaty i współpracowników – obie prezentujące nowy sposób otrzymywania komórek o charakterze macierzystym z komórek zróżnicowanych.

wanych: STAP (stimulus-triggered acquisition of pluripotency). Należy tutaj zaznaczyć, iż autorzy pracowali na komórkach tygodniowej myszy, a nie dorosłego organizmu i, jak na razie, nie wiadomo, dlaczego tylko takie komórki podlegają temu procesowi. W opracowanej metodzie czynnikiem reprogramującym nie są cząsteczki o właściwościach biochemicznych, lecz stężenie jonów wodorowych. Okazuje się, że w odpowiedzi na stres komórkowy wywołany niskim pH (optymalnie: 5.4 – 5.7, 30 minut) ekspresja markerów komórek różnicowanych spada. Ważna tutaj wydaje się być obecność LIF (leukemia inhibitory factor) oraz suplementu B27 w pożywce hodowlanej, umożliwiając one bowiem zajście procesu, w wyniku którego powstają komórki o charakterze macierzystym (STAP-cells). Co ciekawe, proces ten trwa tylko 7 dni, a po upływie tego czasu w hodowli in vitro widoczna jest ekspresja markerów mysich komórek zarodkowych (Oct4, SSEA1, Nanog, Sox2), a same komórki tworzą charakterystyczne sfery. Efektywność tej metody (~7%) znacznie przewyższa 'tradycyjne' reprogramowanie. Co najważniejsze, STAP-cells pozytywnie przeszły wszystkie testy na potwierdzenie ich pluripotencjalnego fenotypu: utworzyły potworniki w myszach o upośledzonym układzie immunologicznym, znacząco przyczyniły się do organogenezy ekto-, endo-, i mezodermalnej w chimericznych zarodkach a także były zdolne do odtworzenia całego organizmu po ich połączeniu z tetraploidalną blastocystą. Na koniec warto zaznaczyć, że STAP-cells mają ograniczony potencjał proliferacyjny i bez pomocniczych związków w pożywce tracą zdolność samoodnowy. Komórki reprogramowane poprzez STAP, które po uprzedniej hodowli w określonych warunkach charakteryzuje ta zdolność określane są jako STAP-stem cells.

Druga praca tej grupy wywołała równie wielkie zainteresowanie. W 60% przypadków komórki wstrzyknięte bezpośrednio do zarodka skolonizowały również tkankę pozazarodkową. Zjawisko to jest bardzo rzadko spotykane w przypadku tworzenia chimery z wykorzystaniem zarodkowych komórek macierzystych (ESCs) lub iPSCs, co wydaje się naturalne, biorąc pod uwagę ich ograni-

czoną plastyczność. Analiza qPCR pokazała, iż STAP-cells charakteryzuje również ekspresja genów markerowych trofoblastu (np. Cdx2). Cechy tej nie wykazują jednak STAP-stem cells, co sygnalizuje, że warunki hodowli komórek po szoku pH mogą być kluczowe dla ich zdolności do różnicowania. Wydaje się, iż konkretne związki promują rozwój tkanek zarodkowych lub pozazarodkowych, lecz nigdy obu równocześnie. Czynnikiem promującym rozwój tkanki pozazarodkowej in vitro okazał się Fgf4 (w wyniku stymulacji otrzymano Fgf4-induced stem cells). Na razie jest jednak zbyt wczesnie, by spekulować o totipotencji STAP-cells i lepiej mówić o różnicowaniu w kierunku tkanek zarodkowych i trofoblastu.

Odkrycie to otwiera nowe możliwości w uzyskiwaniu autologicznych komórek macierzystych. Kolejnym etapem wydaje się być otrzymanie STAP-stem cells z komórek pochodzących z dorosłego mysiego organizmu, by potem opracować protokół reprogramowania komórek ludzkich. Bezsprzecznym plusem nowej metody jest brak ingerencji w genom komórki, co wiąże się z brakiem ryzyka nowotworzenia indukowanego insercją transgenów. Z drugiej strony, należy bezwzględnie pamiętać, iż komórki macierzyste (ESCs, iPSCs oraz STAP-stem cells) właśnie ze względu na swój charakter pluripotencjalny stwarzają niebezpieczeństwo dla zastosowań terapeutycznych. Pod żadnym pozorem nie wolno podawać pacjentom komórek, które mogłyby wytworzyć potwornika. Efektywny proces różnicowania wraz z odpowiednią selekcją to jedno z głównych wymagań stawianych jakiegokolwiek terapii z użyciem komórek macierzystych. Nowe ekscytujące odkrycie wymaga jeszcze potwierdzenia przez niezależne grupy badawcze. Możliwość odtworzenia wyników w innych laboratoriach stanowi konieczność uznania badań za wiarygodne. Na szczęście prawdopodobnie nie będziemy musieli długo czekać na kolejne wiadomości dotyczące STAP-cells.

Maciej Bąk
Prezes KNSB "Mygen"

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.

2. Thomson JA, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1917-20.

3. Yamanaka S, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008 Jan;26(1):101-6.

4. Zhou H, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 2009 Apr 23;4(5):381-4.

5. Kim D, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*. 2009 Jun 5;4(6):472-6.

6. Warren L, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010 Nov 5;7(5):618-30.

7. Anokye-Danso F, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2011 Apr 8;8(4):376-88.

8. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based

on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences*. 2009;85:348-362.

9. Shi Y, Despons C, Do JT, Hahm HS, Schöler HR, Ding S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*. 2008 Nov 6;3(5):568-74.

10. Huangfu D, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*. 2008 Jul;26(7):795-7.

11. Lin T, et al. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods*. 2009 Nov;6(11):805-8.

12. Deng H, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*. 2013 Aug 9;341(6146):651-4.

13. Obokata H, et al. Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature*. 2014 Jan 30;505(7485):641-7.

14. Obokata H, et al. Bidirectional developmental potential in reprogrammed cells with acquired pluripotency. *Nature*. 2014 Jan 30;505(7485):676-80.

WYPOSAŻENIE LABORATORIÓW NAUKOWYCH I BADAWCZYCH

Dla biologii komórk

- Komory laminarne Biohazard
- Inkubatory CO₂ i CO₂/O₂
- Wytrząsarki z inkubacją
- Wirówki laboratoryjne
- Systemy anaerobowe i do hypoksji
- Dezintegratory ultradźwiękowe
- Mieszadła
- Pipety
- Pipetory/Dozowniki

Do przechowywania prób

- Zamrażarki niskotemperaturowe - 86°C szafowe i skrzyniowe
- Zamrażarki -60°C do -20°C szafowe i skrzyniowe
- Lodówki laboratoryjne
- Zbiorniki i pojemniki do przechowywania prób w LN₂
- Urządzenia chłodnicze niestandardowe na zamówienie
- Dewary do transportu prób w LN₂
- Stelaze, pudełka i próbki do głębokiego mrożenia
- Rękawice ochronne

Dla biologii molekularnej

- Systemy dokumentacji żeli
- Systemy elektroforezy
- Oprogramowanie do dokumentacji i analizy żeli
- Transiluminatory UV, WL
- Komory PCR
- Spektrofotometry UV/Vis
- Termocyklery
- Spektrofotometry dla mikroobjętości
- Kalkulatory DNA/RNA

Dla mikrobiologii

- Systemy identyfikacji drobnoustrojów
- Systemy badania drobnoustrojów
- Liczniki kolonii

Dla metody *In vitro*

- Systemy kontrolowanego zamrażania
- Inkubator przenośny IVF
- Stołki grzejne do mikroskopu
- System aktywacji fuzji
- System wtryfikacji

Dla immunologii i badań metodą ELISA

- Czytelniki absorbancji - ELISA
- Czytelniki fluorescencji
- Czytelniki luminescencji
- Płuczki ręczne i automatyczne
- Dyspensery automatyczne
- Wytrząsarki dla ELISA
- Oprogramowanie do analizy badań metodą ELISA

Hodowla roślin i owadów

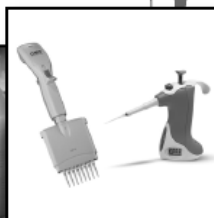
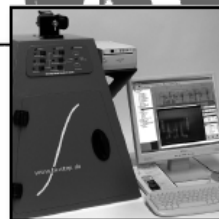
- Fitotrony (małe, wielkogabarytowe, kontenerowe)

Badania nad zwierzętami i wyposażenie zwierzętarni

- Izolatory dla zwierząt
- Stacje zmiany klatek, podłoża
- Stacje transferu zwierząt
- Systemy klatek wentylowanych

Dla hematologii

- Agregometry
- Odczynniki do agregometrów



www.biogenet.com.pl

ul. Parkingowa 1, 05-420 Józefów k./Otwocka
tel.: +48 22 463 80 40 do 49, faks: +48 22 417 31 98
e-mail: biogenet@biogenet.com.pl

16-18 maja 2014 r.

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Warszawskie Stowarzyszenie Biotechnologiczne "Symbioza" ma przyjemność zaprosić wszystkich czytelników Ogólnopolskiego Czasopisma Acta Mygenica na trzecie Międzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne "Symbioza" imienia prof. dr hab. inż. Krzysztofa Szewczyka!

Odbędzie się ono w dniach 16-18 maja 2014 roku w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Skierowane jest przede wszystkim do studentów i doktorantów kierunku biotechnologia, ale także do wszystkich sympatyków z kierunków pokrewnych. Głównym celem Sympozjum jest integracja środowiska naukowego związanego z tematem sze-



roko pojętej biotechnologii, popularyzacja tej dziedziny i umożliwienie podzielenia się wynikami swojej pracy naukowej poprzez wystąpienie ustne lub prezentację posteru.

Sympozjum organizowane jest już po raz drugi przez WSB "Symbioza" jednoczące studentów trzech największych warszawskich uczelni mających w swym programie kierunek Biotechnologia. Tak duża impreza naukowa dotycząca jednej dziedziny - ale nie faworyzująca żadnego z jej aspektów - pozwala na poszerzenie horyzontów naukowych przez starszych studentów oraz na obranie najbardziej interesującej do zgłębiania ścieżki biotechnologii przez studentów dopiero rozpoczynających swoją naukową karierę. Oprócz wielu godzin wystąpień uczestników, będzie można także wysłuchać wykładów szanowanych naukowców, wymienić się opiniami i dyskutować podczas przerw kawowych oraz zintegrować się z uczestnikami z całej Polski w trakcie imprezy i gry terenowej.

Serdecznie zapraszamy!

Więcej informacji na temat zapisów można szukać tutaj
<http://msb.symbioza.edu.pl/>

i tutaj
<https://www.facebook.com/msbsymbioza>

Z życia Mygeny

Rok akademicki właściwie dopiero się rozpoczął, ponieważ, choć od października upłynęło już sporo czasu, liczne przerwy świąteczne i „długie weekendy” nie pomagały studentom przejść z wakacyjnego rozleniwienia do studenckiej rzeczywistości pełnej egzaminów i zaliczeń. Jednak wydawać by się mogło, że pośród laboratoriów i sali wykładowych pełnych zaspanych uczniów, jest jeden pokój, którego drzwi otwierają się o samym świcie, a zamykają późną nocą. Mygen już od początku roku rozpoczął próby uczynienia tego semestru jeszcze bardziej owocnym. Jeden z dowodów ukazuje się właśnie - jest to Zeszyt Naukowy Acta Mygenica zawierający publikacje

studentów, w tym opisującą projekt naszego Koła. Jakiś czas temu ruszył projekt naukowy „Drabinka DNA” prowadzony przez Dawida Denekę. Jego celem jest stworzenie markera masy DNA do elektroforezy. Liczymy, że efekt działań naszych członków będzie widoczny nie tylko w naukowej dokumentacji, ale również w laboratoriach, w których mógłby być używany, by usprawnić pracę naszych naukowców.

Jan Kierzyk

Jesteśmy też na [facebook.com/mygenuj](https://www.facebook.com/mygenuj)



**Masz pomysł na nowatorski biznes w life science?
Best of Biotech jest szansą na urzeczywistnienie twojej innowacyjnej idei.**

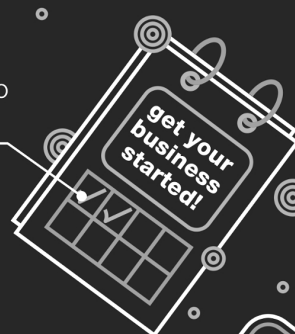
Do wygrania nawet 16 500 €!

**Każdy uczestnik może skorzystać z warsztatów,
szkoleń oraz indywidualnych spotkań z ekspertami.**

3 x 1,500 Euro

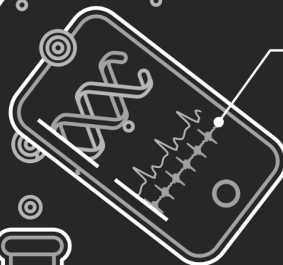
Business Idea

Phase 1
2.6. – 27.11.2014



10,000 Euro

**LISAvienna
Medtech Award**



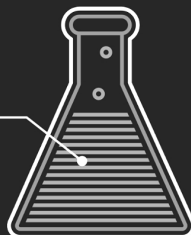
1. 15,000 Euro

2. 10,000 Euro

3. 5,000 Euro

Business Plan

Phase 2
28.11.2014 – 6.5.2015



www.lifescience.pl

www.bestofbiotech.at

Spis treści:

DARPinS - obiecująca alternatywa dla przeciwciał

Sara Przetocka 14

Wprowadzenie do sekwencjonowania nowej generacji (NGS)

Agnieszka Fatałska i inni 20

Mikrofragmenty jako obiecujące narzędzie w medycynie regeneracyjnej oraz terapii przeciwnowotworowej

Marcin Luty 23

Podwójne oblicze metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej: od fizjologii do patologii

Adrian Miara 28

Nanotechnologia jako nowe spojrzenie na przyszłość medycyny

Piotr Konieczny 36

Związki flawonoidowe i ich pochodne jako potencjalne produkty o działaniu leczniczym

Edyta Bańcyr i inni 44

Kwas ferulowy, beta-glukan i ksantohumol - bioaktywne składniki o potencjalnym wykorzystaniu prozdrowotnym

Edyta Bańcyr i inni 47

Białko ADAM17 - sojusznik czy wróg?

Marcin Markiewicz 50

Mygenaza - ekspresja i oczyszczenie termostabilnej polimerazy Pfu

Kajetan Sawa i inni 56

DARPinS - OBIECUJĄCA ALTERNATYWA DLA PRZECIWCIAŁ

Sara Przetocka

Pracownia Krystalografii

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński

s.przetocka@gmail.com

Praca napisana pod opieką: dr Bartosza Zięby

Streszczenie: DARPiny (ang. Designed Ankyrin Repeat Proteins) to nowa klasa cząsteczek wiążących z potencjałem do przezwyciężenia ograniczeń przeciwciał monoklonalnych, a tym samym otwierająca nowe możliwości w dziedzinie terapii. DARPiny są małymi (14 kDa), jednodomenowymi białkami, które dzięki nowoczesnym metodom selekcji mogą wiązać się do dowolnego białka z bardzo wysokim powinowactwem i specyficznością. Te cechy czynią je idealnymi kandydatami na leki o działaniu agonistycznym, antagonistycznym lub inhibitorowym. Ponadto DARPiny mogą być zaprojektowane do wykonywania różnych funkcji efektorowych. DARPiny weszły już w etap prób klinicznych i znalazły liczne zastosowania w badaniach dzięki swojej wytrzymałości i stabilności fałdowania, co pozwala na tworzenie wielu unikalnych formatów molekularnych. W niniejszej pracy przeglądowej podsumowane zostaną właściwości DARPin oraz przedstawione będzie kilka ich zastosowań biomedycznych.

Wstęp

Cząsteczkami terapeutycznymi, które obecnie wykazują najszybszą i najbardziej znaczącą ewolucję w badaniach klinicznych, a także dają największe zyski finansowe są przeciwciała monoklonalne (mAbs)[1]. Przeciwciała monoklonalne są naturalnie funkcjonującymi biocząsteczkami, które sprawdzały się w większości przypadków wymagających specyficznego wiązania białek z wysokim powinowactwem oraz bezpośredniej modyfikacji białka efektorowego. Jednakże, jak łatwo się domyślić, również mAbs mają swoje ograniczenia[2]. Ich produkcja jest bardzo droga, duże rozmiary przeciwciał powodują, że klonowanie i ekspresja tych białek staje się wymagającym zadaniem, a ponadto penetracja tkanek przez mAbs jest ograniczona. Dodatkowo cechy charakterystyczne dla przeciwciał, takie jak funkcja efektorowa domeny Fc (ang. Fragment crystallizable – fragment krystalizujący) oraz długi okres półtrwania w surowicy nie zawsze są pożądane. Bardzo często zdarza się również, że komercyjne wykorzystanie przeciwciał wiąże się z ograniczeniami narzuconymi przez prawa własności intelektualnej[1,3]. W ciągu ostatnich kilku lat rozwój nowych metod selekcji in vitro przyczynił się do stworzenia ok. 50 alternatywnych „rusztowań” białkowych mających potencjał do uzupełnienia niedoskonałości przeciwciał. Termin „rusztowanie” opisuje jednołańcuchową polipeptydową konstrukcję, zwykle o zredukowanych rozmiarach (<200 aa), zawierającą wysoce uorganizowany rdzeń połączony z częścią zmienną. Część ta pozwala na wprowadzanie modyfikacji, takich jak: insercje, delekcje lub inne mutacje substytucyjne[4]. Na

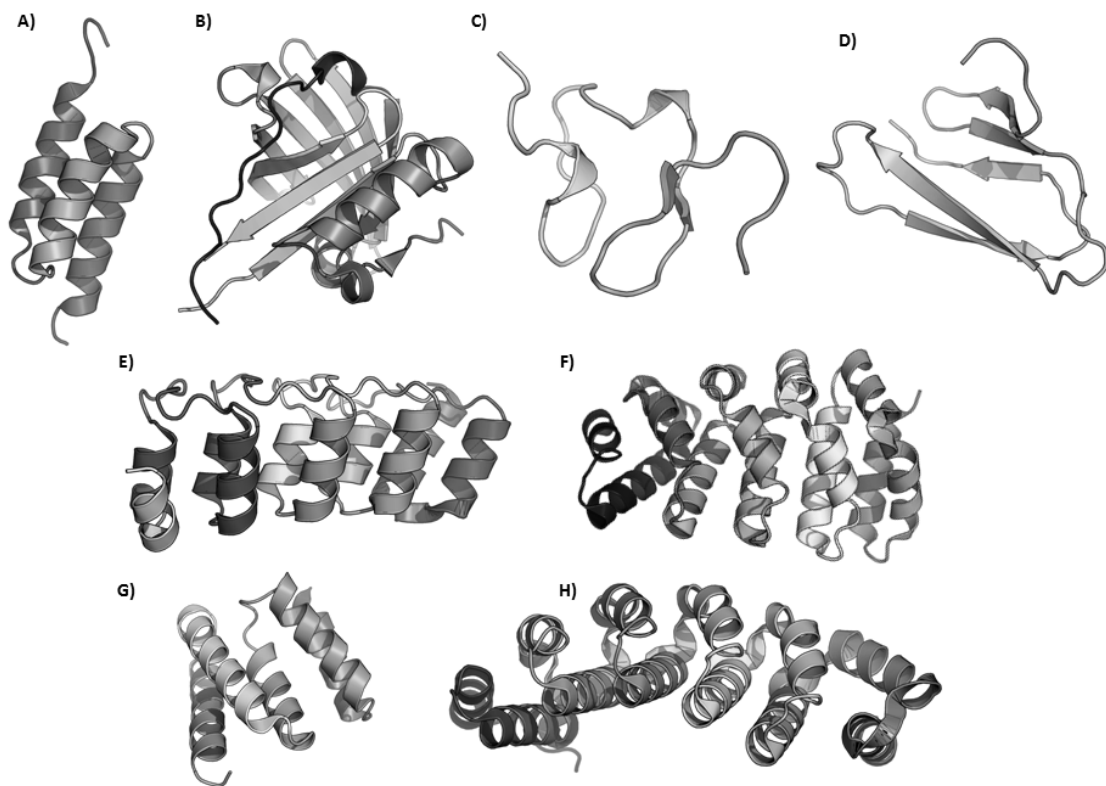
schemacie poniżej przedstawiono najbardziej zaawansowane w badaniach klinicznych białka wiążące.

Powtórzenia ankirynowe (AR)

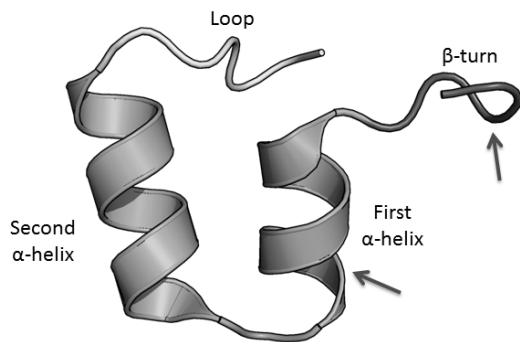
Są zbudowane z połączonych motywów składających się z 33 reszt aminokwasowych. Każdy z motywów posiada zwrot- β oraz dwie antyrównoległe α -helisy, a liczba ich powtórzeń w pojedynczym białku waha się znacznie, jednakże większość białek zawiera 4 – 6 powtórzeń. Potencjalne miejsca oddziaływania znajdują się w zwrocie- β oraz na wklęsłej powierzchni powtórzeń w kształcie litery L (zaznaczone strzałkami na Rys. 2)[5]. Struktura przynajmniej 13 naturalnie występujących białek z powtórzeniami ankirynowymi została poznana przy pomocy metod krystalograficznych. Funkcją biologiczną białek zawierających powtórzenia ankirynowe jest bezpośrednia interakcja z określonymi białkami efektorowymi, a przez to, np. ich inhibicja lub kotwiczenie. Dlatego też biorą one udział w licznych procesach, takich jak: transkrypcja, regulacja cyklu komórkowego, sygnalizacja międzykomórkowa, odpowiedź przeciwpalna czy różne rodzaje transportu[3,6].

Projektowanie i konstrukcja bibliotek DARPin (ang. Designed Ankyrin Repeat Protein)

Kluczowym krokiem podczas budowania biblioteki białek z powtórzeniami jest stworzenie kompatybilnych, powtarzalnych modułów. Jednym ze sposobów wygenerowania biblioteki powtórzeń jest metoda projektowania konsensusowego, w której konserwatywne reszty aminokwasowe szkieletu białkowego pozostają niezmiennie, natomiast potencjalne reszty

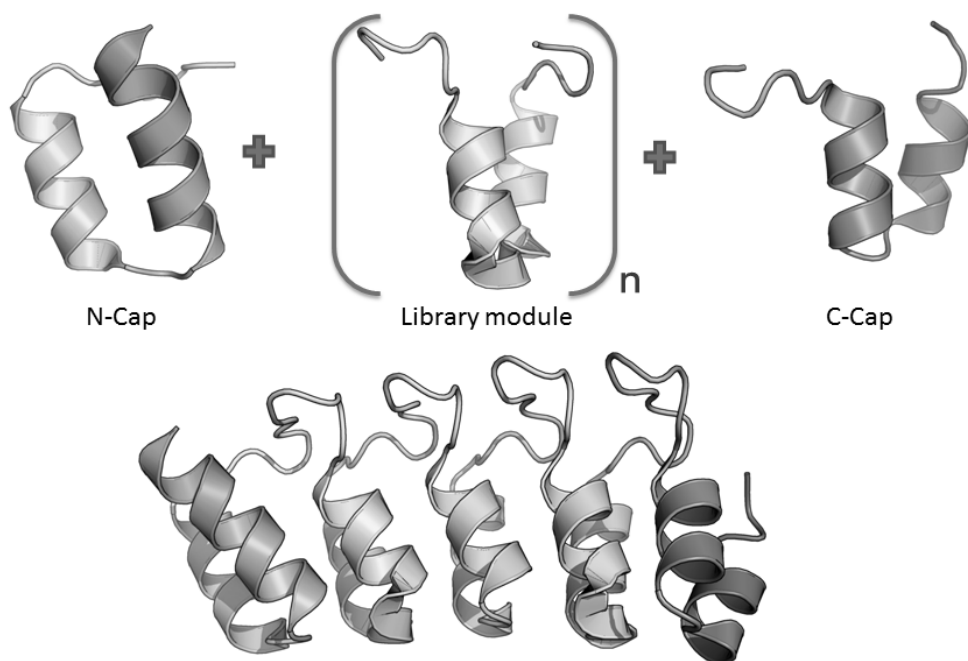


Rys. 1. Trójwymiarowa reprezentacja białkowych rusztowań. A) Affibody otrzymywane z domeny Z białka A bakterii *Staphylococcus* (PDB: 2KZJ). B) Antykalina otrzymywana za pomocą inżynierii genetycznej z lipokalin. Ich wspólna cecha strukturalna to konserwatywna β -baryłka zawierająca 8 antyrównoległych arkuszy- β (PDB: 1LNM). C) Avimer (ang. AVIDitymultiMER) uzyskiwany dzięki genetycznej oligomeryzacji małej domeny A występującej w różnych receptorach na powierzchni komórek (PDB: 1AJJ). D) AdNectin – rusztowanie białkowe będące pochodną domeny typu III z fibronektyny ludzkiej. Swoją strukturą β -kanapki wykazuje podobieństwo do budowy przeciwciał bez mostka disiarczkowego (PDB: 3QWR). E) DARPin (ang. DesignedAnkyrinRepeatProtein) bazujące na ludzkich białkach z powtórzeniami ankirynowymi z rodziny regulatorów interakcji białko-białko (PDB: 1MJ0). F) Armadillo – powtarzająca się sekwencja aminokwasowa występująca w wielu białkach, m.in. w β -kateninie (PDB: 4DB6). G) TPR (ang. tetratricopeptiderepeat) to 34-aminokwasowy motyw występujący zazwyczaj w powtórzeniach tandemowych (PDB: 3MA5). H) HEAT to domena o charakterze solenoidu, występująca w wielu białkach cytoplazmatycznych (PDB: 3LTJ).



Rys. 2. Struktura krystaliczna powtórzenia ankirynowego E3_5 (PDB:1MJ0).

oddziaływania podlegają randomizacji. Projekt modułów oparty jest na analizie konsensusowej sekwencji i struktury powtórzeń ankirynowych, dlatego też pierwszym ważnym zadaniem jest dobór odpowiedniej bazy danych. Następny etap to identyfikacja reszt aminokwasowych biorących udział w wiązaniu. Na końcu procesu projektuje się powtórzenia terminalne. Kolejne moduły są utrzymywane razem dzięki oddziaływaniom hydrofobowym, dlatego pierwsze i ostatnie powtórzenie, tzw. N- i C-czapeczka (ang. N-cap, C-cap) muszą wykazywać specjalne właściwości, m.in. hydrofilową powierzchnię zewnętrzną eksponowaną do rozpuszczalnika. Dodatkowo C-czapeczka posiada modyfikację odpowiadającą za lepszą oporność na denaturację termiczną i chemiczną. Tak zaprojektowane



Rys. 3. Schemat projektowania biblioteki DARPin. Biblioteki DARPin są skonstruowane z dwóch tzw. czapeczek (N- and C-cap) oraz z różnej liczby powtórzeń wewnętrznych. Zaprezentowano również trójwymiarową strukturę DARPin na przykładzie trójmodułowego białka off7 (PDB: 1SVX).

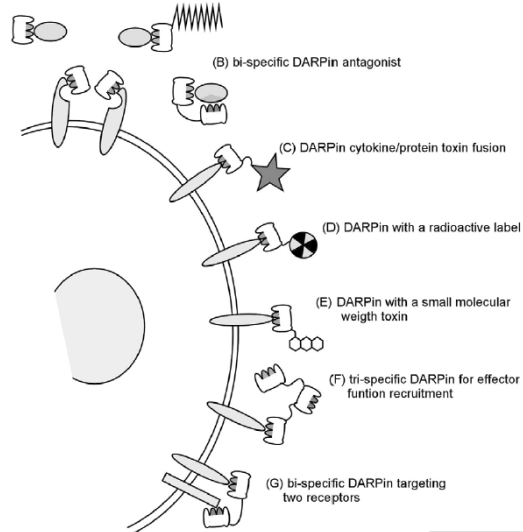
białka są bardzo wydajnie ekspresjonowane jako rozpuszczalne monomery, ich stabilność rośnie wraz z długością, a te białka, które posiadają więcej niż trzy wewnętrzne powtórzenia są odporne na denaturację przez wysoką temperaturę oraz chlorowoderek guanidyny. Teoretyczna różnorodność biblioteki DARPin może wynosić aż $5,2 \times 10^{15}$ dla biblioteki dwumodułowej oraz $3,8 \times 10^{23}$ dla biblioteki trójmodułowej[5,7]. Obecnie najczęściej stosowanymi metodami selekcji DARPin z bibliotek syntetycznych są ekspresja fagowa (ang. phage display) oraz ekspresja w systemie rybosomowym (ang. ribosome display). Istnieje również możliwość selekcji DARPin w wewnątrzkomórkowych systemach, takich jak metoda komplementacji białek (ang. protein complementation assay), a także za pomocą innych powszechnie używanych sposobów selekcji[3].

Potencjalne zastosowania DARPin w medycynie

Siłą napędzającą projektowanie nowych ruszto- wań białkowych jest możliwość ich różnorodnego wykorzystania. Nowe białka wiążące znajdują zastosowanie w terapiach, diagnostyce oraz licznych badaniach. Większość z tych aplikacji została dobrze rozwinięta w przypadku DARPin. Dodatkową zaletą tych białek jest różnorodność form, które mogą zostać wykorzystane. Mono-

walentne DARPiny to proste białka bez żadnych modyfikacji, które charakteryzują się małym rozmiarem znacząco wpływającym na zdolność penetracji tkanek. Dodatkowo nie mają one domeny Fc, a co za tym idzie – nie oddziałują bezpośrednio z układem immunologicznym. Kolejną zaletą jest ich zdolność do szybkiego usuwania

(A) DARPin antagonists - without and with PEG



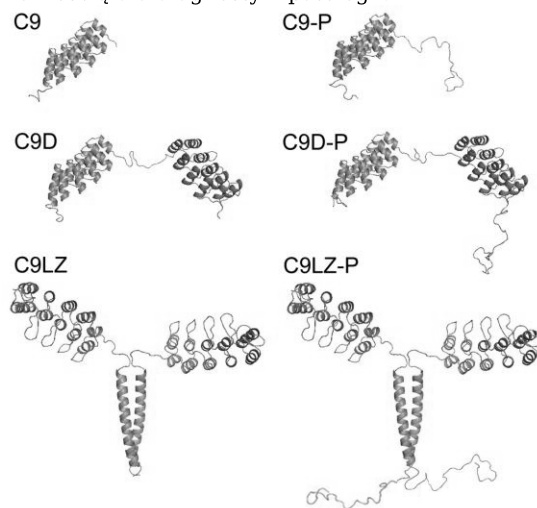
Drug Discovery Today

Rys. 4. Możliwe terapeutyczne sposoby działania DARPin[3].

niechcianych cząsteczek z tkanek oraz układu krążenia. Jednakże w przypadku wielu aplikacji funkcja efektorowa może być wymagana. Istnieje wiele różnych sposobów dodawania funkcji efektorowej do DARPIn, wliczając w to między innymi fuzje z białkami, ich domenami lub peptydami, a także wprowadzenie grup tiolowych umożliwiających sprzężenia chemiczne niewpływające na zdolność wiązania. Taki zabieg jest możliwy, ponieważ DARPiny pozbawione są reszt cysteinowych[3].

DARPiny w diagnostyce

Gen receptora typu 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2 – ang. human epidermal growth factor receptor 2) wykazuje nadekspresję w niektórych typach raka piersi. Mechanizmem nadekspresji jest amplifikacja genu HER2. Status amplifikacji tego genu jest również ważnym kryterium przy doborze odpowiedniej terapii[8]. Stan ekspresji HER2 rutynowo ocenia się za pomocą immunohistochemii. Dość niska wiarygodność i dokładność wyników sprawiły, że zaczęto poszukiwać innych cząsteczek detekcyjnych niż przeciwciała, dlatego też postanowiono przetestować możliwość wykorzystania DARPIn w ilościowych badaniach immunohistochemicznych. DARPina przeciwko białku HER2 została porównana do zatwierdzonego przez FDA (ang. Food and Drug Administration) przeciwciała monoklonalnego. Okazało się, że detekcja z wykorzystaniem DARPIn wykazuje się podobną czułością, ale znacznie większą specyficznością niż detekcja z wykorzystaniem przeciwciał[8]. Tym samym można stwierdzić, że DARPiny charakteryzują się odpowiednią specyficznością dla diagnostyki patologii.



Rys. 5. Formaty DARPiny C9 i ich pochodne użyte w badaniach w reprezentacji wstążkowej. C9 to DARPina wiążąca EpCAM. C9D to dimer zawierający dwie sekwencje C9 połączone elastycznym linkerem. C9LZ to wyniki samodimeryzacji motywu zamka leucynowego dodanego do C-końca C9. P odpowiada białkom fuzyjnym do peptydu z ludzkiej protaminy-1[10].

Metody ukierunkowanej terapii przeciwnowotworowej

DARPiny zostały także wykorzystane jako białka kierujące w przedklinicznych modelach nowotworowych. Jest wiele przykładów takiego zastosowania DARPIn, jednak aby zilustrować ich potencjał wybrano badania opierające się na cząsteczce adhezyjnej komórek nabłonka (EpCAM – ang. epithelial cell adhesion molecule) jako białka celu. Cząsteczka EpCAM ma budowę trójdomenową, bierze udział w szlaku sygnalizacyjnym Wnt oraz indukuje transkrypcję genów c-myc i cyklin. Cząsteczki EpCAM są bardzo często obecne w guzie litym, natomiast ich ekspresja w zdrowych komórkach nabłonka jest ograniczona[9]. Obiecującym ładunkiem z dużym potencjałem biomedycznym jest małe interferujące RNA (siRNA – ang. small interfering RNA) służące do wyciszania genów. Głównym problemem w wykorzystaniu siRNA jest jego specyficzny transport w obręb nowotworu oraz pobieranie kwasów nukleinowych przez komórki. DARPina skierowana przeciwko EpCAM została użyta jako nośnik dla siRNA komplementarnego do mRNA genu bcl-2, który jest czynnikiem antyapoptotycznym. DARPina została poddana genetycznej fuzji do protaminy, aby osiągnąć efekt kompleksowania, dzięki temu 4 – 5 cząsteczek siRNA mogło zostać związanych do protaminy. Dla wszystkich testowanych konstrukcji zaobserwowano spadek ekspresji genu bcl-2 zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. W rezultacie znacząco wzrosła wrażliwość EpCAM-pozytywnych komórek na doksorubicynę. Wzrost ten nie był obserwowany w komórkach EpCAM-negatywnych, co pokazuje, że pobieranie siRNA jest zależne od receptora[10]. Przykład ten ilustruje możliwość wykorzystania DARPIn do transportu ładunku do zmienionych nowotworowo komórek, jednakże zręczne manipulowanie formatem DARPIn może posłużyć do stworzenia multiwalentnych DARPIn, które same w sobie posiadają aktywność biologiczną[9]. DARPiny w wirusowym nakierowywaniu do nowotworów

Wirusowe systemy transportu genów zmagają się z problemem komórkowo- i tkankowo-specyficznego dostarczania genów. Do tej pory DARPiny zostały użyte z sukcesem w kilku metodach wirusowego transportu genów[2]. Jedną z nich wykorzystuje adenowirusy, które są rodziną wirusów bezotoczkowych zawierających jako materiał genetyczny podwójną nić DNA. Zostały one opracowane jako prototypy wektorów genowych w terapii genowej, szczepionkach genetycznych oraz w obrazowaniu molekularno-genetycznym. W wielu badaniach starano się zmodyfikować naturalny tropizm wirusów, tak żeby uczynić dostarczanie transgenów do pożądaných celów komórkowych bardziej wydajnym i specyficznym[9]. W tym przypadku DARPina nie jest prezentowana na powierzchni

wirusa, ale został stworzony bispecyficzny adapter, który może być produkowany w *E. coli*. Najbardziej efektywna forma adaptera zawiera cztery DARPiny, gdzie trzy z nich owinięte są wokół „domeny gałkowej” (ang. knobdomain) włókna białkowego adenowirusa, czwarta natomiast wiąże się do wyznaczonego celu komórkowego, np. receptora HER2. Tak skonstruowane adaptory znacząco wpływają na poprawę komórkowo-specyficznej transdukcji mierzonej aktywnością lucyferazy[11]. Ta nowa strategia jest niezwykle obiecująca dla przyszłych postępów w terapii genowej.

Podsumowanie

Badania nad zastosowaniem białek z powtórzeniami, w szczególności DARPIn, cieszą się wielkim powodzeniem na przestrzeni kilku ostatnich lat. Badania w tej dziedzinie rozpoczęte przez firmy biotechnologiczne obecnie są główną do-

meną firm farmaceutycznych, które podjęły inicjatywę stworzenia leków opartych na białkach. Zakres zastosowań DARPIn zdecydowanie wykroczył poza granice możliwości przeciwciał ze względu na ich różnorodne właściwości biofizyczne oraz łatwość produkcji. Przykłady wymienione w tej pracy przeglądowej pokazują jak wiele istnieje potencjalnych zastosowań dla alternatywnych rusztowań białkowych zarówno jako cząsteczek ukierunkowujących, narzędzi diagnostycznych, jak i innych strategii terapeutycznych. DARPiny znajdują się obecnie w dwóch fazach badań klinicznych (I i II) w chorobach oczu. DARPiny są bardzo obiecującymi i wartościowymi dodatkami do leków opartych na białkach, łączą wiele zalet w jednej rodzinie cząsteczek, pokonują ograniczenia aktualnych, opartych na białkach terapii oraz dostarczają unikatowych korzyści i nowych możliwości medycznych.

Piśmiennictwo:

- [1] Wurch, T. & Pierre, A. Novel protein scaffolds as emerging therapeutic proteins: from discovery to clinical proof-of-concept. *CellPress*. 30, 575-582 (2012).
- [2] Boersma, Y. L. & Plückthun, A. DARPins and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 849-57 (2011).
- [3] Stumpp, M. T., Binz, H. K. & Amstutz, P. DARPins: a new generation of protein therapeutics. *Drug Discov. Today* 13, 695-701 (2008).
- [4] Nuttall, S. D. & Walsh, R. B. Display scaffolds: protein engineering for novel therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8, 609-15 (2008).
- [5] Binz, H. K., Stumpp, M. T., Forrer, P., Amstutz, P. & Plückthun, A. Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *J. Mol. Biol.* 332, 489-503 (2003).
- [6] Zahnd, C. et al. Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size. *Cancer Res.* 70, 1595-605 (2010).
- [7] Kohl, A. et al. Designed to be stable: crystal structure of a consensus ankyrin repeat protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1700-5 (2003).
- [8] Theurillat, J. et al. Methods in Pathology Designed ankyrin repeat proteins: a novel tool for testing epidermal growth factor receptor 2 expression in breast cancer. 1289-1297 (2010). doi:10.1038/modpathol.2010.103
- [9] Tamaskovic, R., Simon, M., Stefan, N., Schwill, M. & Plückthun, A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPins) from research to therapy. *Methods Enzymol.* 503, 101-34 (2012).
- [10] Winkler, J., Martin-Killias, P., Plückthun, A. & Zangemeister-Wittke, U. EpCAM-targeted delivery of nanocomplexed siRNA to tumor cells with designed ankyrin repeat proteins. *Mol. Cancer Ther.* 8, 2674-83 (2009).
- [11] Dreier, B. et al. Development of a generic adenovirus delivery system based on structure-guided design of bispecific trimeric DARPin adaptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, (2013).

WPROWADZENIE DO SEKWENCJONOWANIA NOWEJ GENERACJI (NGS)

**Agnieszka Fatalska, Anna Czerwoniec, Joanna Kasprzak,
Kaja Milanowska, Anna Phillips, Tomasz Puton**

VitalnSilica Sp. z o. o. , Krzemowa 1, Złotniki, 62-002 Suchy Las, Polska
office@vitainsilica.pl

*Vita***InSilica**

Wprowadzenie: Od dłuższego czasu w świecie biotechnologii, a w szczególności w przypadku metod do identyfikacji zmian w genach, dużo słyszy się o sekwencjonowaniu. Wszystko rozpoczęło się od opublikowania wstępnej, niekompletnej wersji sekwencji ludzkiego genomu w 2001 roku.[1] Od tego momentu nastąpił gwałtowny rozwój w genomice, w tym również w metodach sekwencjonowania. Czym właściwie jest sekwencjonowanie? Najprościej ujmując jest to technika odczytywania sekwencji, czyli kolejnych nukleotydów w cząsteczce DNA. Jedną z pionierskich metod sekwencjonowania została opracowana w 1977 r. przez Fredericka Sangera (stąd też nazwa – sekwencjonowanie Sangera) i jest oparta o syntezę DNA katalizowaną przez enzym polimerazę DNA. [2,3] Obecnie sekwencjonowanie Sangera jest techniką historyczną, wypieraną przez nowsze metody. Niewątpliwie najbardziej innowacyjną metodą odczytywania sekwencji jest Sekwencjonowanie Nowej Generacji (NGS, ang. Next Generation Sequencing), któremu został poświęcony ten artykuł. Wprowadzenie metod NGS było wielkim przełomem, który zrewolucjonizował świat technik biologii molekularnej. [4] Jak szybko sekwencjonowanie stanie się standardem w diagnostyce wad genetycznych? Nie wiadomo, ale z pewnością w niedalekiej przyszłości NGS będzie niezbędnym narzędziem w rozpoznawaniu chorób dziedzicznych i doborze odpowiedniej farmakoterapii.

Po co właściwie NGS?

Diagnostyka genetyczna wielu chorób jest stosunkowo prosta i niedroga. Problemem staje się badanie wykonywane u pacjenta z chorobą wielogenową, w której kilka czy też nawet kilkadziesiąt genów determinuje dane schorzenie. Trudności w diagnostyce pojawiają się również, gdy dany gen składa się z kilkudziesięciu czy też nawet >100 egzonów i w każdej rodzinie, w której wystąpiła dana choroba, obecne są inne mutacje. W takich przypadkach konwencjonalne badania genetyczne (np. testy genetyczne do wykrywania konkretnych mutacji, mikromacie-rze, czy też tradycyjna metoda sekwencjonowania) wymagają dużego nakładu pracy, czasu i funduszy. Dlatego też szuka się nowych, wysokoprzepustowych technik, takich jak NGS. Główną ideą NGS było stworzenie zminiaturyzowanej technologii służącej do sekwencjonowania, która umożliwiłaby redukcję kosztów, oszczędność czasu i zwiększenie przepustowości. Stało się to możliwe dzięki masowemu równoległemu sekwencjonowaniu (ang. massive parallel sequencing) pofragmentowanej matrycy DNA. [5] Należy pamiętać, iż niepodważalną zaletą tej metody jest niemalże nieograniczony wgląd w głąb informacji genetycznej. Daje to

możliwość odkrycia nowych genów, których mutacje mogą prowadzić do chorób o podłożu genetycznym.

Zastosowanie NGS do celów diagnostycznych

Przykładem dowodzącym słuszności i skuteczności stosowania NGS w celach diagnostycznych jest detekcja zespołu Alporta. Zespół Alporta jest chorobą dziedziczną kolagenu typu IV, będącego głównym składnikiem błony podstawnej. Dziedziczenie tego schorzenia może wystąpić w sposób dominujący w sprzężeniu z chromosomem X i w sposób autosomalny recesywny. Zespół Alporta cechuje się postępującym zaburzeniem funkcjonowania nerek, zaburzeniami w narządzie słuchu, a także uszkodzeniami oczu. Diagnostyka zespołu Alporta za pomocą konwencjonalnych technik (DHPLC, sekwencjonowanie Sangera) jest długotrwała i kosztowna. Zwykle zajmuje ona kilka miesięcy i jest utrudniona w sytuacji, gdy nie ma wystarczająco dużo informacji dotyczących rodowodu pacjenta. Trudności i czasochłonność diagnostyki są spowodowane brakiem gorących miejsc (ang. hot

spots) i dużą liczbą egzonów poszczególnych genów, w których mutacje skutkują wystąpieniem choroby. Ograniczenia te są eliminowane dzięki zastosowaniu NGS, który umożliwia szybką detekcję mutacji u pacjentów. Technika ta pozwala na jednoczesne wykrywanie wszystkich możliwych wariantów w wybranych genach. [6]

Na czym polega NGS?

NGS jest jedną z najnowocześniejszych technik biologii molekularnej i posiada szeroki wachlarz zastosowań. Obecnie jest ona wykorzystywana do sekwencjonowania genomów i transkryptomów, badania interakcji białko-DNA/RNA, sprawdzania stopnia metylacji, a także do badań metagenomowych.

Przebieg sekwencjonowania nowej generacji podzielić można na trzy główne etapy. Pierwszym z nich jest izolacja i stworzenie biblioteki DNA, kolejnym amplifikacja matrycy, zaś ostatnim masowe równoległe sekwencjonowanie. [7] Obecnie na rynku istnieje kilka komercyjnie dostępnych platform do NGS, m.in. Illumina, Roche454, SOLiD, IonTorrent oraz Pacific Biosciences. Cechami wspólnymi każdej z nich są izolacja DNA i tworzenie biblioteki jednoniciowych DNA. Kolejne etapy sekwencjonowania różnią się w zależności od wybranej platformy. Każda z nich ma inne przeznaczenie i poszczególne parametry techniczne.

Kilka słów o Platformach

Illumina. Pierwszym etapem pracy platformy Illumina jest losowa fragmentacja genomowego DNA. Do obu końców fragmentów DNA zostają przyłączone adaptory. Pojedyncze fragmenty nici są losowo immobilizowane do podłoża (ang. flow cell). Następnie, odbywa się amplifikacja („mostkowanie”, ang. bridge amplification), w wyniku której zostają wygenerowane dwuniciowe fragmenty DNA. Dzięki temu na każdym szkiełku istnieją ich miliony kopii. Kolejnym etapem jest synteza cząsteczek z wyznakowanych fluorescencyjnie nukleotydów przy wykorzystaniu polimerazy. Nukleotydy, które nie zostałyłączone do sekwencji zostają wymyte. Ostatnim krokiem jest detekcja fluorescencji. Platformę Illumina cechuje największa popularność, stosunkowo niski koszt eksploatacji oraz duży wachlarz zastosowań. Podstawowym minusem jest wyższa w stosunku do pozostałych platform cena maszyny (ok. 690 tys. USD). [8]

Roche454. Oparty jest na równoległym pirosekwencjonowaniu. Podobnie jak w innych platformach, zaczyna się od losowej fragmentacji genomowego DNA oraz ligacji adaptorów. Następnie fragmenty DNA, do których zostały dołączone adaptory, zostają umocowane na „ziarnach” (ang. beads). Kolejnymi etapami są: amplifikacja (emPCR), pirosekwencjonowanie (sekwencjonowanie przez syntezę) na „ziar-

nach”, a następnie odczyt wyników przez luminescencję. Platforma ta pozwala na długie odczyty (do 1 tys. nt) i jest często wykorzystywana do sekwencjonowania genomów prokariotycznych oraz analiz RNA-seq. Wadami są natomiast wysoki koszt zakupu maszyny (ok. 500 tys. USD) i jej eksploatacji oraz podwyższony współczynnik błędu w przypadku sekwencjonowania homopolimerów. [9]

SOLiD. W przypadku platformy SOLiD, która opiera się na sekwencjonowaniu przez ligację, w pierwszym etapie konstruowana jest biblioteka DNA. Następnie dochodzi do amplifikacji materiału za pomocą techniki emPCR oraz losowego deponowania „ziaren” na szklanej płytce. Kolejno odbywa się sekwencjonowanie i hybrydyzacja sond ze starterami. Wyznakowane fluorescencyjnie sondy kodują nukleotydy. Plusami platformy SOLiD są: stosunkowo niewielki koszt eksploatacji (w przeliczeniu na nukleotyd) oraz szeroki wachlarz zastosowań (np. sekwencjonowanie małych genomów, badanie oddziaływań białko-DNA, określanie miejsc startu transkrypcji), zaś minusem możliwość jedynie krótkich odczytów (2 x 60 nt). [10]

IonTorrent nawiązuje również do standardowego sekwencjonowania opartego o syntezę, jednakże platforma ta wyposażona jest w nowy system detekcji. Został on stworzony na bazie półprzewodników, co daje możliwość wykrywania jonów wodorowych H⁺ uwalnianych w trakcie reakcji wydłużania łańcucha DNA. Do roztworu matrycowego DNA dodawane są nukleotydy i w komplementarnych regionach zostają one wbudowane do nici. Kolejno dochodzi do uwolnienia jonu wodorowego (w wyniku wydłużania łańcucha DNA), a zmiany w poziomie pH świadczą o zajściu reakcji. W sytuacji, kiedy w nici występują powtórzenia w postaci homopolimerów, sygnał będzie odpowiednio wzmocniony. IonTorrent ma kilka bardzo istotnych zalet, m.in. najniższy koszt sprzętu (ok. 150 tys. USD), bardzo szybka analiza, duży potencjał technologii, a także miniaturyzacja. Natomiast wciąż jedną z istotnych przeszkód są trudności związane z sekwencjonowaniem homopolimerów. [11]

Pacific Biosciences. Technika ta umożliwia bardzo długie odczyty oraz wykrycie metylacji nukleotydów. Jest to platforma, którą klasyfikuje się podobnie jak IonTorrent, do technik sekwencjonowania trzeciej generacji. Od platform drugiej generacji (Illumina, Roche 454, SOLiD) różni ją przede wszystkim brak konieczności początkowego namnażania DNA. DNA w próbówce jest sekwencjonowane bezpośrednio na poziomie pojedynczych cząsteczek przy użyciu polimerazy. Dużymi zaletami tej techniki jest unikanie błędów podczas amplifikacji techniką PCR oraz możliwość bardzo długich (do 23 tys. bp) odczytów. Platforma ta ma również pewne wady, m.in. najwyższy współczynnik błędu oraz stosunkowo wysoką cenę maszyny (ok. 700 tys.

USD). [12]

Zapewne NGS i jego rozwój stanowi przyszłość biologii molekularnej, genomiki oraz medycyny. Niesie ono ze sobą wiele możliwości, mnogość zastosowań oraz przełom w sposobach diagnostyki i leczenia schorzeń. Wszystkie metody sekwencjonowania nowej generacji są bardzo wydajne w dostarczaniu surowych danych. Problemem jest jednak analiza informacji uzyskanych bezpośrednio z NGS. Proces ten wymaga użycia odpowiednich programów, wydajnych komputerów i przede wszystkim pracy bioinformatyków, którzy potrafią te dane właściwie zanalizować, wysunąć poprawne wnioski i wykorzystać do planowania dalszych badań.

Istnieją w Polsce profesjonalne firmy świadczące usługi analizowania danych pochodzących bezpośrednio z NGS. Jedną z nich jest np. VitaInSilica Sp. z o. o. (<http://www.vitainsilica.pl/>). VitaInSilica jest firmą bioinformatyczną świadczącą usługi analizy danych biologicznych i rozwoju oprogramowania naukowego. Oferujemy naszym Klientom wiedzę i doświadczenie w wykorzystaniu narzędzi bioinformatycznych do tworzenia nowej jakości w badaniach naukowych. Pomagamy naszym Klientom podnieść wartość badań, co pozwala na publikację w lepszych czasopismach, a także dzięki odpowiedniemu oprogramowaniu umożliwiamy zarządzanie danymi biologicznymi w laboratorium.

Piśmiennictwo:

- [1] Venter, J.C. Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., et al. The sequence of the human genome. *Science*, 291: 1304-1351. 2001.
- [2] Sanger, F. et al. *Nature* 24, 687-695 (1977).
- [3] Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467 (1977).
- [4] Stephan C Schuster, Next-generation sequencing transforms today's Biology, *Nature Methods*, 2008
- [5] Jorge S Reis-Filho, Next-generation sequencing, *Breast Cancer Research* 2009, 11(Suppl 3):S12
- [6] Rosangela Artuso, Chiara Fallerini, Laura Dosa, Francesca Scionti, Maurizio Clementi, Guido Garosi, Laura Massella, Maria Carmela Epistolato, Roberta Mancini, Francesca Mari, Ilaria Longo, Francesca Ariani, Alessandra Renieri, and Mirella Bruttin, *Advances in*

- Alport syndrome diagnosis using next-generation sequencing*, *European Journal of Human Genetics* (2012) 20, 50-57
- [7] Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A., Sequencing technologies and genome sequencing., *J Appl Genet.* 2011 Nov;52(4):413-35
- [8] www.illumina.com
- [9] <http://www.454.com/>
- [10] <http://www.lifetechnologies.com>
- [11] http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_marketing/documents/generaldocuments/cms_094273.pdf
- [12] <http://www.allseq.com/knowledgebank/sequencing-platforms/pacific-biosciences/>

MIKROFRAGMENTY JAKO OBIECUJĄCE NARZĘDZIE W MEDYCYNIE REGENERACYJNEJ ORAZ TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Marcin Luty

Zakład Biologii Komórki

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński

Pracę napisano pod opieką dr hab. Ewy Zuby-Surmy

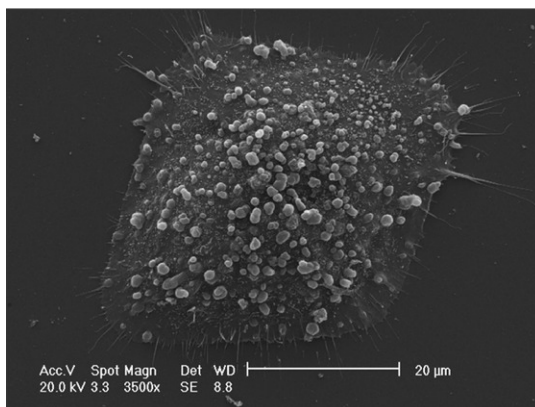
Streszczenie: Mikrofragmenty to niewielkie pęcherzyki wydzielane przez większość komórek, zawierające między innymi mRNA i miRNA. Mogą oddziaływać z innymi komórkami, a efekt ich oddziaływania jest zależny od ich pochodzenia. W przypadku mikrofragmentów wydzielonych z komórek macierzystych oddziaływanie to prowadzi, między innymi, do wzmożenia proliferacji oraz indukcji procesu różnicowania komórek poddanych działaniu mikrofragmentów. Badania na modelach zwierzęcych dowodzą, że mikrofragmenty z komórek macierzystych podawane dożylnie gromadzą się w miejscach uszkodzenia, prowadząc do regeneracji uszkodzonych tkanek i organów – co sprawia, że mikrofragmenty mogą mieć potencjalne zastosowanie kliniczne. Zostało również udowodnione, że mikrofragmenty pochodzące z mezenchymalnych komórek macierzystych wykazują właściwości przeciwnowotworowe, działając jako inhibitory wzrostu nowotworów.

Wstęp

Medycyna regeneracyjna zajmuje się naprawą oraz usprawnianiem procesów regeneracyjnych uszkodzonych tkanek i organów, dla których proces regeneracji zachodzi z niewystarczającą wydajnością. Należy do nich na przykład serce, w którym w czasie regeneracji obumarłe kardiomiocyty zastępowane są bezkomórkową blizną pozawałową.

W medycynie regeneracyjnej wykorzystywane są między innymi komórki macierzyste. Są to komórki posiadające zdolność do niemal nieograniczonej proliferacji oraz zdolność do różnicowania się w inne komórki, która jest zależna od ich pluripotencji. Najbardziej obiecującą grupą wydawałyby się być embrionalne komórki macierzyste (ESC, ang. Embryonic Stem Cells) oraz indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPS, ang. Induced Pluripotent Stem Cells) ze względu na ich nieograniczony potencjał do różnicowania. Jednakże zastosowanie komórek embrionalnych natrafia na przeszkody natury zarówno etycznej jak i prawnej. Ponadto możliwość zastosowania obydwu wspomnianych grup komórek jest jednak ograniczona ze względu na formowanie potworniaków[1]. Drugą opcją jest wykorzystanie częściowo zróżnicowanych komórek występujących u osób dorosłych. Do grupy komórek, których użycie rozpatruje się w medycynie regeneracyjnej, zalicza się między innymi hematopoetyczne komórki macierzyste (HSC, ang. hematopoietic stem cells) oraz mezenchymalne komórki macierzyste (MSC, ang. mesenchymal stem cells)[2]. Wiele przeprowadzonych doświadczeń wykazało, że

MSC podawane in vivo prowadzą do regeneracji uszkodzonych organów takich jak serce, nerki czy mózg[3]. Znacząca część tych doniesień sugeruje, że proces regeneracji nie występuje jednak na drodze odróżnicowania MSC do innych komórek, a poprzez podział i różnicowanie komórek rezydujących w uszkodzonym organie, co prowadzi do powstania nowej populacji komórek specyficznej dla danego organu[2]. Wykazane zostało, że proces ten jest związany z parakrynnym oddziaływaniem komórka mezenchymalna-komórka uszkodzonego organu, między innymi poprzez małe cytoplazmatyczne pęcherzyki, którymi są mikrofragmenty[3][4]. Podobne oddziaływanie zostało wykazane in vitro dla embrionalnych komórek macierzystych[5].



Rysunek 1. Mikrofragmenty wydzielane przez komórkę[11]

Mikrofragmety (MV, ang. microvesicles) są heterogenną grupą niewielkich (30 nm – 1 µm) pęcherzyków cytoplazmy otoczonych fragmentami błony komórkowej[6][7](Rysunek 1). Oprócz komórek macierzystych mogą być wydzielane przez wszystkie inne komórki. Wydzielanie może się odbywać konstytutywnie lub pod wpływem indukcji takimi czynnikami jak niedotlenienie czy napromieniowanie[8]. Zawierając białka, mRNA oraz miRNA, mikrofragmety są w stanie nie tylko prowadzić syntezę białek na podstawie dostarczonej matrycy, ale także indukują ekspresję genów w komórce, do której zostały dostarczone[6][9].

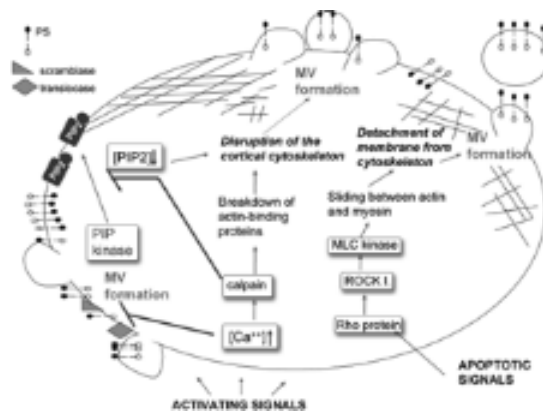
Mechanizmy wydzielania mikrofrAGMENTÓW

Ze względu na sposób wydzielania oraz właściwości mikrofrAGMENTÓW można podzielić je na trzy grupy: egzosomy, ektozomy nazywane również złuszczaćcami się pęcherzykami (ang. shedding vesicles) oraz ciała apoptotyczne, powstające w obumarłych komórkach[10].

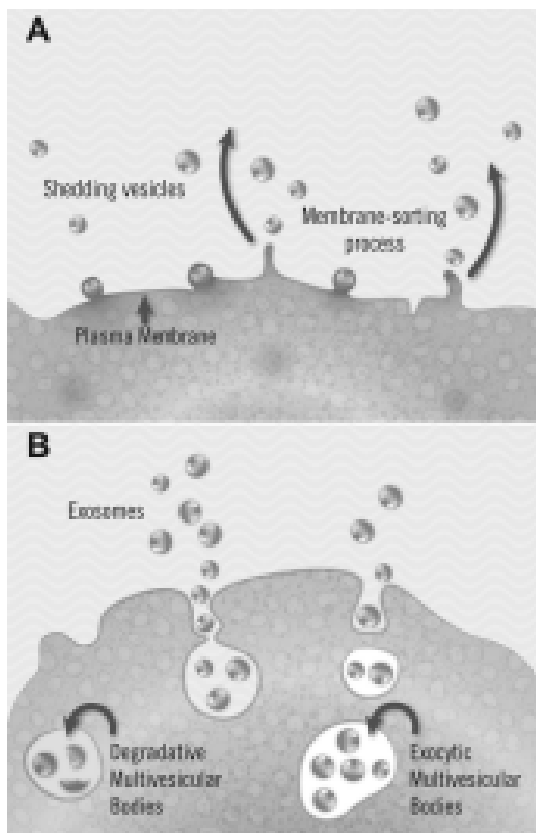
Ektosomy są heterogenną grupą mikrofrAGMENTÓW, powstającą przez odcinanie się od powierzchni błon komórkowych małych pęcherzyków cytoplazmatycznych o wymiarach 100-1000 nm. Proces ich uwalniania jest związany ze zmianami wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Rosnące wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia skutkuje między innymi inhibicją translokaz. Prowadzi to do zaburzenia asymetrii błony komórkowej poprzez przeniesienie fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy, w wyniku czego formują się cytoplazmatyczne pęcherzyki na powierzchni błony. Ponadto rosnące wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia prowadzi do aktywacji proteaz cytoplazmatycznych, które biorą udział w reorganizacji cytoszkieletu, co umożliwia uwolnienie mikrofrAGMENTÓW[7] (Rysunek 2).

Błona otaczająca mikrofragmety powstaje z błony komórkowej, zawiera więc duże ilości fosfatydyloseryny oraz białek tratw lipidowych[6]. Do markerów stosowanych w celu wyznakowania ektozomów należą: integryny, selektyny, metaloproteiny, CD40 oraz flotillina-2n. Do tej pory jednak nie został odkryty marker specyficzny dla ektozomów[11].

Kolejnym rodzajem mikrofrAGMENTÓW są egzosomy. Są one grupą mniejszych (30-120 nm) i mniej heterogennych pęcherzyków, powstających jako wewnątrzkomórkowe ciała wielopęcherzykowe (ang. - multivesicular bodies). Wydzielane są zazwyczaj konstytutywnie poprzez fuzję ciałek wielopęcherzykowych z błoną komórkową(Rysunek 3). Egzosomy otoczone są błoną zawierającą cholesterol, ceramidy oraz niewielkie ilości fosfatydyloseryny. Mechanizm sortowania zawartości pęcherzyków nie został jeszcze dokładnie zbadany[6][7].



Rysunek 2. Przedstawienie mechanizmów uwalniania ektozomów[7]



Rysunek 3. Porównanie mechanizmów powstawania ektozomów (A) oraz egzosomów (B)[6]

Bioaktywna zawartość mikrofrAGMENTÓW

W skład mikrofrAGMENTÓW wchodzi białka, mRNA, miRNA oraz lipidy budujące ich błonę. Jakkolwiek dokładny skład mikrofrAGMENTÓW jest ściśle zależny od komórek, z których zostały wydzielone, nie jest on ścisłym odwzorowaniem składu białek oraz transkryptów zawartych w komórkach[3]. Świadczy to o tym, że mikrofragmety nie powstają poprzez czysto stocha-

styczne wydzielenie części cytoplazmy otoczonej przypadkowym fragmentem błony komórkowej, tylko że proces ten jest sterowany[11]. Dokładny mechanizm odpowiadający za pakowanie mikrofragmentów nie został jeszcze poznany[7]. Do białek zawartych w mikrofragmentach mogą należeć m.in.: czynniki wzrostu, chemokiny, cytokiny oraz proteazy. Bogate w nie są zwłaszcza mikrofragmenty pochodzące z komórek nowotworowych[11]. Oprócz białek zamkniętych wewnątrz mikrofragmentów występują również białka powierzchniowe, pochodzące z oderwanych fragmentów błony komórkowej. Białka te odpowiadają za interakcję mikrofragmentów z komórkami poddanymi działaniu mikrofragmentów[3]. Należy również podkreślić, że wśród powierzchniowych białek mikrofragmentów pochodzących z komórek MSC nie stwierdzono obecności antygenów HLA (białek głównego układu zgodności tkankowej)[3], co ma duże znaczenie w ich potencjalnym zastosowaniu klinicznym, ze względu na zmniejszenie zagrożenia odrzutów w przypadku podawania mikrofragmentów pochodzących z MSC od innego dawcy.

Mikrofragmenty oprócz białek zawierają również materiał genetyczny w postaci mRNA oraz miRNA. Badania nad mikrofragmentami wydzielonymi z embrionalnych komórek macierzystych wykazały obecność transkryptów genów odpowiedzialnych za pluripotencjalność, takich jak Nanog, Oct-4 oraz Gata-4. Dodatkowo obecne były czynniki kodujące powierzchniowe ligandy szlaku sygnałowego Notch – Jag-1 oraz Jag-2. Jednakże ich relatywna ilość była znacznie mniejsza niż w komórkach. Co więcej, w badaniach zostało wykryte relatywnie dużo miRNA, stanowiącego znacznie większy udział w puli RNA niż w komórkach embrionalnych[9]. Potwierdzona została również obecność transkryptów genów odpowiadających za proliferację oraz różnicowanie w mikrofragmentach pochodzą-

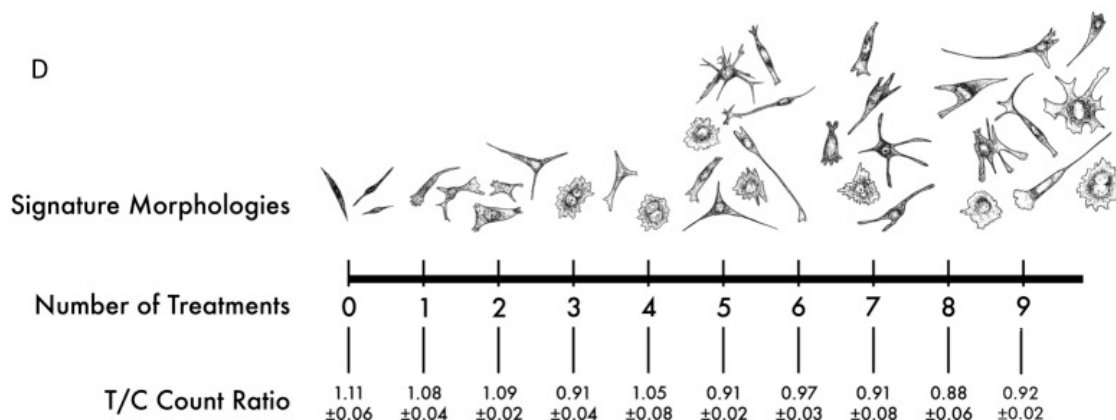
cych z mezenchymalnych komórek macierzystych[3]. Równocześnie została wykryta obecność tych transkryptów genów odpowiedzialnych za pluripotencjalność w komórkach iPS[12].

Mechanizmy oddziaływania MV z komórkami

Mikrofragmenty mogą oddziaływać z komórkami zarówno przez bezpośrednią stymulację za pomocą dostarczonych ligandów dla receptorów komórek[5] (do tych ligandów mogą należeć m.in. czynniki wzrostu takie jak VEGF)[11], ponadto mikrofragmenty mogą również działać pośrednio, dostarczając transkrypty genów do komórki. Transkrypty te ulegają ekspresji w komórkach docelowych. Co więcej, mikrofragmenty mogą również dostarczać czynniki transkrypcyjne w formie miRNA, prowadząc do indukcji ekspresji własnych genów komórki, wyłączonych podczas procesu różnicowania komórek[9]. Aby transfer RNA był możliwy, musi dojść do adhezji mikrofragmentów do komórek, co dzieje się dzięki białkom adhezyjnym znajdującym się na ich powierzchni. Do białek tych mogą należeć m.in. integryny ($\alpha 4$ oraz $\alpha 5$), CD 29, CD44 oraz CD73[3]. Wykazane zostało, że mikrofragmenty pozbawione białek powierzchniowych nie są w stanie dostarczyć transkryptów do komórek[3].

Mikrofragmenty dostarczone z komórek macierzystych indukują proliferację i różnicowanie

Mikrofragmenty pochodzące z komórek macierzystych zawierają zarówno transkrypty genów odpowiedzialnych za pluripotencjalność jak i proliferację[9][3]. Komórki traktowane takimi mikrofragmentami wykazują nasiloną proliferację oraz zwiększoną żywotność[3]. Udowodnione również zostało, że komórki Müllera izolowane



Rysunek 4. Schemat różnicowania i rozwoju komórek Müllera pod wpływem mikrofragmentów[5]

z oka, oddziałujące z mikrofragmentami dostarczonymi z embrionalnych komórek macierzystych nie tylko proliferują z wyższą wydajnością, ale także przechodzą proces odróżnicowania. Proces ten prowadzi następnie do namnażania komórek oraz ich ponownego przejęcia procesu różnicowania z wytworzeniem komórek specyficznych dla siatkówki oka[5](Rysunek 4).

Udział mikrofragmentów w procesach regeneracyjnych

Regeneracja jest procesem odtworzenia tkanki lub organu. W wielu przypadkach zachodzi naturalnie (skóra, kości), natomiast w przypadku wielu organów proces ten musi być przeprowadzony sztucznie. Indukcja regeneracji może się odbywać poprzez wyhodowanie zróżnicowanych komórek *in vivo*, a następnie podanie ich w miejsce uszkodzenia.

Drugim sposobem jest pobudzenie komórek progenitorowych znajdujących się w miejscu uszkodzenia do proliferacji lub odróżnicowanie komórek uszkodzonej tkanki, nadając im zdolność do podziałów oraz różnicowania.

Zostało udowodnione, że podawanie komórek MSC w miejsce uszkodzenia prowadzi do nasilenia podziałów komórek oraz prowadzi do regeneracji organu lub tkanki[2]. Takie samo działanie zostało wykazane w przypadku mikrofragmentów. Podawane *in vivo* nasilają proliferację oraz różnicowanie komórek w miejscu uszkodzenia, przez co umożliwiają pełną regenerację na poziomie histologicznym[3][10]. Zostało to zademonstrowane na przykładzie mysiego modelu uszkodzenia kanalików nerkowych, w którym podanie mikrofragmentów powodowało przywrócenie prawidłowego funkcjonowania nerek oraz odbudowy kanalików nerkowych[3](Rysunek 5).

Ponadto mikrofragmenty pochodzące z mezenchymalnych komórek macierzystych indukują ekspresję genów antyapoptotycznych takich jak: Bcl-xL, Bcl2, co skutkuje zwiększeniem przeży-

walności, w efekcie czego regeneracja może zachodzić z większą wydajnością[10].

Mikrofragmenty w chorobach nowotworowych

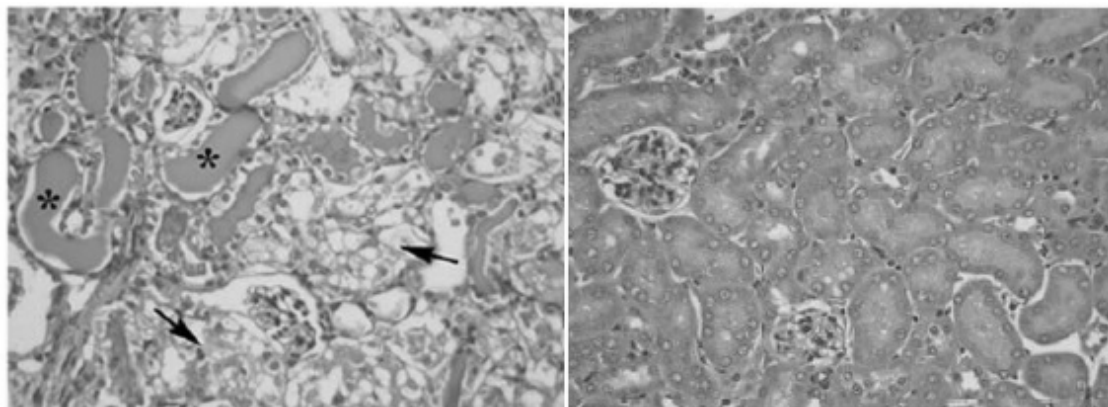
Mikrofragmenty mogą znaleźć również zastosowanie w walce z chorobami nowotworowymi. Można je wykorzystać zarówno jako markery nowotworów[11] oraz w celu zatrzymania rozwoju chorób nowotworowych[16].

Mikrofragmenty odgrywają ważną rolę w progresji nowotworów. Zawarte w nich czynniki wzrostu oraz receptory tychże czynników promują rozrost guza oraz angiogenezę. Natomiast proteazy ułatwiają penetrowanie macierzy zewnątrzkomórkowej, co sprzyja przerzutowaniu. Mogą również indukować apoptozę limfocytów cytotoksycznych. Mikrofragmenty wydzielone z komórek nowotworowych przedostają się do układu krwionośnego, co czyni je potencjalnymi biomarkerami chorób nowotworowych. Szereg badań wskazuje na możliwość zastosowania jako markerów zarówno białek powierzchniowych (takich jak CD133) oraz miRNA. Pozwalałoby to na wcześniejsze wykrycie chorób nowotworowych, a przez to lepsze prognozy terapii[11].

Liczne badania wskazują na rolę mezenchymalnych komórek macierzystych jako supresorów rozwoju niektórych nowotworów[15], zostało również wykazane, że mikrofragmenty pochodzące z mezenchymalnych komórek macierzystych pełnią podobną funkcję[16]. Dodawane do hodowli komórek nowotworowych linii T24 znacząco obniżały przyrost komórek nowotworowych oraz prowadziły do nasilenia apoptozy. Ponadto podawane *in vivo* znacznie zmniejszały przyrost guza[16].

Podsumowanie

Szereg badań prowadzonych zarówno *in vitro* jak i *in vivo* potwierdziło, że poprzez horyzontalny transfer miRNA mikrofragmenty pochodzące z komórek macierzystych są w stanie prowadzić do zmian epigenetycznych w komórce, wiodą-



Rysunek 5. Regeneracja kanalików nerkowych: A – przed podaniem MV, B – po podaniu MV[14]

cych do zwiększenia żywotności. Ponadto łatwość ich zastosowania oraz szerokie i wszechstronne działanie czynią je idealnymi kandydatami do zastosowania w medycynie regeneracyjnej. Równocześnie wykazują one znaczny potencjał jako suplement terapii przeciwnowotworowej.

Jakkolwiek skuteczność mezenchymalnych komórek macierzystych jest porównywalna do działania mikrofragmentów, to ich zastosowanie natrafia na pewne trudności związane z ograniczonym występowaniem MSC w organizmie dorosłego człowieka oraz problemem zgodności tkankowej w przypadku ewentualnych przeszczepów allogeniczných w związku z występującymi na ich powierzchni antygenami HLA. W przypadku mikrofragmentów brak owych antygenów pozwala rozpatrywać możliwość podawania mikrofragmentów pochodzących z komórek niespokrewnionego dawcy. Pozwala-

łoby to na produkcję mikrofragmentów na skalę przemysłową, w efekcie zwiększając ich potencjał w zastosowaniu klinicznym.

Pomimo szerokich możliwości mikrofragmentów potwierdzonych w licznych doświadczeniach niezbędne jest ich dalsze badanie, zwłaszcza nad możliwością stosowania allogenicznego oraz nad ewentualnymi skutkami ubocznymi.

Uwagi:

W nazewnictwie grup mikrofragmentów istnieją dwie różne nomenklatury, jedna z nich zakłada nazywanie mikrofragmentami całej grupy pęcherzyków wydzielanych przez komórki[6][5][10], druga terminem mikrofragmenty określa tylko podgrupę większych pęcherzyków, natomiast całą grupę (mikrofragmenty i egzosomy) określa mianem wydzielanych pęcherzyków (ang. cell release vesicles, extracellular vesicles)[11][3][14]. Na potrzeby artykułu została wykorzystana pierwsza wersja nomenklatury.

Piśmiennictwo:

- [1] Tumorigenesis in cells derived from induced pluripotent stem cells. *Hum Cell.* 2013 Oct 12 Nishimori M, Yakushiji H, Mori M, Miyamoto T, Yaguchi T, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E.
- [2] The emerging role of microvesicles in cellular therapies for organ/tissue regeneration *Nephrol Dial Transplant* (2011) 26: 1453–1456 Mariusz Z. Ratajczak
- [3] Mesenchymal Stem Cell-Derived Microvesicles Protect Against Acute Tubular Injury *J Am Soc Nephrol* 20: 1053–1067, 2009 Stefania Bruno, Cristina Grange, Maria Chiara Deregibus, Raffaele A. Calogero,† Silvia Saviozzi,† Federica Collino, Laura Morando, Alessandro Busca,‡ Michele Falda,‡ Benedetta Bussolati, Ciro Tetta,§ and Giovanni Camussi
- [4] Mechanisms for the formation of membranous nanostructures in cell-to-cell communication *Cellular & Molecular Biology Letters* Doi: 10.2478/S11658-009-0018-0 Karin Schara1,2, Vid Janša1, Vid Šuštar1, Drago Dolinar1,2, Janez Ivan Pavlič3,4, Maruša Lokar4, Veronika Kralj-Iglič1, Peter Veranič5 And Aleš Iglič
- [5] Embryonic Stem Cell-Derived Microvesicles Induce Gene Expression Changes in Müller Cells of the Retina *PLoS ONE* 7(11): e50417. doi:10.1371/journal.pone.0050417 Diana Katsman, Emma J. Stackpole, Daniel R. Domin, Debora B. Farber
- [6] Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells *Am J Cancer Res* 2011;1(1):98-110 Giovanni Camussi, Maria-Chiara Deregibus, Stefania Bruno, Cristina Grange, Valentina Fonsato, Ciro Tetta
- [7] Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer *Inflamm. res.* 58 (2009) 1–81023-3830/09/010001-8 E. Pap1, E. Pállinger2, M. Pásztoi1, A. Falus
- [8] Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription *Exp Hematol.* 2010 March ; 38(3): 233–245. doi:10.1016/j.exphem.2010.01.002 Jason M. Aliotta, Mandy Pereira, Kevin W. Johnson, Nicole de Paz, Mark S. Dooner, Napoleon Puente, Carol Ayala, Kate Brilliant, David Berz1, David Lee, Bharat Ramratnam, Paul N. McMillan, Douglas C. Hixson, Djuro Josic, and Peter J. Quisenberry
- [9] Transfer of MicroRNAs by Embryonic Stem Cell Microvesicles *PLoS ONE* 4(3): e4722. doi:10.1371/journal.pone.0004722 Alex Yuan, Erica L. Farber, Ana Lia Rapoport, Desirée Tejada, Roman Deniskin, Novrouz B. Akhmedov, Debora B. Farber
- [10] Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles *Nephrol Dial Transplant* (2012) 27: 3037–3042 doi: 10.1093/ndt/gfs168 Luigi Biancone1, Stefania Bruno1, Maria Chiara Deregibus1, Ciro Tetta2 and Giovanni Camussi1
- [11] Microvesicles as Potential Ovarian Cancer Biomarkers *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 703048. Ilaria Giusti, Sandra D'Ascenzo, and Vincenza Dolo
- [12] iPS- and ESC-derived microvesicles as carriers of bioactive content to target mature cells: implications for tissue regeneration *Regenerative medicine Poster presentation *S Bobis-Wozowicz1, M Adamiak1, M Bik-Multanowski1, A Madetko-Talowska2, D Borucki-Kowalski3, K Kmietek1, Z Madeja1 & *E Zuba-Surma1*
- [13] Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery *Leukemia* (2006) 20, 847–856 J Ratajczak, K Miekus, M Kucia, J Zhang, R Reca, P Dvorak and MZ Ratajczak
- [14] Microvesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells Enhance Survival in a Lethal Model of Acute Kidney Injury *PLoS ONE* 7(3): e33115. doi:10.1371/journal.pone.0033115 Stefania Bruno1, Cristina Grange1, Federica Collino1, Maria Chiara Deregibus1, Vincenzo Cantaluppi1, Luigi Biancone1, Ciro Tetta2, Giovanni Camussi1
- [15] Suppression of Cholangiocarcinoma Cell Growth by Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A Possible Role of Wnt and Akt Signaling *PLoS One.* 2013 July 2; 8(7): 10.1371 Juan Liu, Guoqing Han, Hui Liu, and Chengyong Qin*
- [16] Microvesicles Derived from Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Attenuate Bladder Tumor Cell Growth In Vitro and In Vivo DOI: 10.1371/journal.pone.0061366 Shuai Wu Guan-Qun Ju Tao Du Ying-Jian Zhu Guo-Hua Liu

PODWÓJNE OBLCZE METALOPROTEINAZ MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ: OD FIZJOLOGII DO PATOLOGII

Adrian Miara

Studenckie Koło Naukowe MEDIGENET przy Katedrze i Zakładzie Genetyki Medycznej

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medyny Laboratoryjnej SUM w Katowicach

Opiekun SKN: dr n. med. Monika Paul-Samojedny

Streszczenie: Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) stanowią liczną rodzinę białek enzymatycznych o charakterze endopeptydaz. MMPs są uważane za jedne z najważniejszych białek degradujących składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), wpływając tym samym zarówno na procesy fizjologiczne, takie jak wzrost komórek, przebudowa tkanek czy apoptoza, jak i na procesy chorobowe, głównie procesy metastazy i inwazji komórek nowotworowych. Liczne badania wykazały także, że MMPs biorą udział w rozwoju chorób OUN czy chorób sercowo-naczyniowych, co dowodzi ich istotnej roli w regulacji funkcji poszczególnych tkanek czy narządów. Celem pracy jest charakterystyka metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej oraz próba nakreślenia czytelnikowi ich roli w procesach fizjologicznego i patologicznego obrotu tkankowego, ze szczególnym naciskiem na wybrane jednostki/zespoły chorobowe.

Budowa, właściwości i regulacja aktywności MMPs

Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) stanowią jedną z grup białek enzymatycznych należących do nadrodziny metaloproteinaz. Obok MMPs w skład tej rodziny enzymów wchodzi serralizyna, astacyna i proteinazy ADAM, które wspólnie tworzą grupę metzincyn [1]. Charakterystyczną cechą wszystkich metzincyn jest wysoce zachowawcza struktura centrum katalitycznego, zawierającego trzy reszty histydylowe [2]. Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej są hydrolazami o charakterze endopeptydaz, które degradują składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) i błony podstawnej, takie jak różnego typu kolageny, glikoproteiny, laminina, elastyna czy proteoglikany. Opisano także proces uwalniania z ECM cytokin i czynników wzrostu (lub ich receptorów) katalizowany przez te enzymy. Cytokiny takie mogą być zarówno aktywowane, jak i rozkładane przez MMPs, co wskazuje na wielokierunkowe działanie tych proteinaz. W zależności od lokalizacji tkankowej ECM mogą w niej występować różne cząsteczki stanowiące substraty dla MMPs [3].

Na chwilę obecną w ludzkich komórkach zidentyfikowano co najmniej 24 MMPs, które wykazują ogólne podobieństwo strukturalne i funkcjonalne, jednak w zależności od różnic w swoistości substratowej i budowie podzielono je na kilka grup [1,4]. Każda MMP posiada w swojej cząsteczce domeny charakterystyczne dla całej rodziny oraz domeny spotykane tylko w konkretnej podgrupie. Podział ten wygląda następująco:

- żelatynazy (MMP-2, MMP-9),
- kolagenazy (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18),
- matrylizyny (MMP-7, MMP-26),
- stromielizyny (MMP-3, MMP-10, MMP-11, MMP-19),
- błonowe MMPs, MT-MMPs (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25)
- „pozostałe” metaloproteiny (MMP-12, MMP-20, MMP-22, MMP-23, MMP-28), które z powodu odmiennej struktury nie zostały sklasyfikowane do żadnej z powyższych grup [5]. Większość MMPs jest zbudowana z N-końcowej prodomeny z dołączonym do niej peptydem sygnałowym, domeny katalitycznej oraz C-końcowej domeny hemopeksynopodobnej, która łączy się za pomocą tzw. regionu zawiasowego z domeną katalityczną. Domena katalityczna jest odpowiedzialna za aktywność biologiczną enzymu i zawiera wysoce konserwatywny motyw HEXHXXGXXH, w którym znajdują się trzy reszty histydylowe wiążące katalityczny jon Zn^{2+} . W domenie tej związany jest także strukturalny jon Zn^{2+} oraz trzy jony Ca^{2+} , które stabilizują strukturę enzymu. Motyw HEXHXXGXXH występuje w cząsteczkach wszystkich MMPs, natomiast w budowie MMP-2 i MMP-9 (żelatynazy) można wyróżnić dodatkowo trzy powtórzenia sekwencji fibronektyny II, co zwiększa spektrum substratowe tych białek. N-końcowa prodomena bierze udział w utrzymywaniu enzymu w formie latentnej i usuwana jest po skierowaniu cząsteczki białka enzymatycznego do ER, przez co enzym ulega aktywacji. W prodomecie tej znajduje się reszta cysteinylowa tworząca tzw. przełącznik cysteinowy, który to właśnie, wiążąc się z jonom Zn^{2+} , umożliwia utrzymanie cząsteczki

w postaci nieaktywnej. C-terminalna część enzymu zawierająca sekwencję hemopeksyny jest odpowiedzialna za rozpoznawanie i wiązanie substratów oraz endogennych inhibitorów metaloproteinaz (TIMPs). Domena ta nie występuje jedynie w cząsteczkach MMP-7 i MMP-26, natomiast w cząsteczce MMP-23 zamiast niej występuje immunoglobulinopodobna sekwencja receptora dla interleukiny-1 bogata w reszty cysteiny i proliny [4-8], która może brać udział w oddziaływaniach białko-białko lub białko-lipid [9]. MT-MMPs zawierają dodatkową domenę transmembranową, która umożliwia ulokowanie enzymu w błonie komórki. Metaloproteinazy błonowe w przeciwieństwie do innych enzymów z rodziny MMPs transportowane są na powierzchnię komórki, podczas gdy pozostali jej członkowie są wydzielani poza komórkę w postaci nieaktywnych zymogenów. Obecność domeny transbłonowej charakteryzuje MMP-14, MMP-15, MMP-16 i MMP-24, natomiast MMP-17 i MMP-25 są kotwiczone w błonie komórki przez cząsteczkę glikofosfatydyloinozytolu (GPI) [1,4,8]. Z domeną transbłonową MMP-14, MMP-15, MMP-16 i MMP-24 związana jest także unikatowa domena cytoplazmatyczna, która przypuszczalnie bierze udział w zależnej od klatryny internalizacji tych enzymów [1]. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej są produkowane i wydzielane przez różne typy komórek. Początkowo sądzono, że białka te są charakterystyczne dla komórek tkanki łącznej, takich jak fibroblasty, lecz z czasem udowodniono, że także komórki zapalne (limfocyty, neutrofile, makrofagi), a nawet komórki śródbłonna, osteoblasty czy komórki glejowe mają zdolność sekrecji tych enzymów [3].

MMPs są tradycyjnie kojarzone z degradacją składników ECM i remodelingiem tej struktury, lecz obecnie wiadomo, że te białka enzymatyczne są zaangażowane w liczne procesy homeostaticzne, a w przypadku nadmiernej aktywności przyczyniają się także do rozwoju różnorodnych patologii. W fizjologicznych warunkach MMPs poprzez trawienie komponentów ECM oraz uwalnianie i regulację biodostępności czynników wzrostu, takich jak np. VEGF czy TGF- β , biorą udział w procesach gojenia ran, obrotu kostnego, modulacji procesu zapalnego oraz prawidłowej angiogenezie. Natomiast w momencie, gdy mechanizmy kontrolujące ich aktywność zawiodą, enzymy te mogą czynnie uczestniczyć w patomechanizmie osteoartrozy, chorób sercowo-naczyniowych, OUN oraz procesach metastazy i nowotworowej angiogenezy [1,10]. Najogólniej ujmując owa kontrola aktywności jest sprawowana na trzech poziomach. Pierwszy mechanizm kontrolujący to regulacja transkrypcji genów MMPs. Większość enzymów z tej grupy nie jest produkowana i wydzielana w sposób ciągły przez komórki, a na proces indukcji lub represji genów MMPs mają wpływ biomolekuły

obecne w środowisku oraz stres komórkowy. To zaś prowadzi do zwiększenia lub zmniejszenia obrotu w macierzy zewnątrzkomórkowej. Dane literaturowe wskazują, że promotory genów metaloproteinaz cechuje polimorfizm, co ma znaczenie w aktywności transkrypcyjnej tych genów. Przykładem może być promotor MMP-1, którego sekwencja zawiera jedną lub dwie guaniny, przy czym obecność dwóch guanin działa wzmacniająco na ekspresję tego genu. Na promotory genów omawianych białek ma wpływ wiele czynników transkrypcyjnych, takich jak AP-1, NF- κ B czy ETS, na które oddziałują cytokiny, czynniki wzrostu, niektóre interleukiny i interferony. Wspomniane molekuly mogą wykazywać działanie hamujące lub aktywujące transkrypcję, np. TGF- β działa jako represor genów MMP-1 i MMP-3, ale pobudza ekspresję genu MMP-13. Zarówno cytokiny, jak i czynniki wzrostu kontrolują aktywność genów poprzez uruchomienie kaskady sygnałowej wielu różnych ścieżek (czynniki AP-1 i ETS są związane ze szlakami kinaz MAP) [5-7]. Kolejny mechanizm regulujący aktywność metaloproteinaz to aktywacja pro-MMPs, gdyż większość z tych enzymów wydzielana jest poza komórkę w postaci nieaktywnych zymogenów. Postać latentna utrzymywana jest dzięki wiązaniu grupy sulfhydrylowej cysteiny w prodomenie z jonem Zn^{2+} domeny katalitycznej. Proteoliza tego wiązania powoduje powstanie natywnej formy białka. MMPs mogą być aktywowane przez inne MMPs, a także inne enzymy (plazmina, katepsyna, trypsyna, kalikreina i in.). Ciekawym przykładem jest mechanizm aktywacji MMP-2, który wymaga utworzenia kompleksu MMP-14, TIMP-2 i pro-MMP-2. Cząsteczka TIMP-2 wiąże się z jednej strony z centrum aktywnym MMP-14 i z drugiej strony z domeną hemopeksynopodobną pro-MMP-2. Inna cząsteczka MMP-14 (niezwiązana z TIMP) następnie powoduje proteolizę prodomeny pro-MMP-2 w określonym miejscu, w skutek czego dochodzi do powstania aktywnej formy enzymu [5,7]. Proces ten zachodzi na powierzchni komórki i może być mediowany przez wszystkie MT-MMPs, za wyjątkiem MMP-17 [4]. W końcu aktywność MMPs jest regulowana przez endogenne inhibitory tkankowe – inhibitory metaloproteinaz TIMPs (działające lokalnie) lub nieswoiste antyproteiny (np. α 2-makroglobulina w płynach ustrojowych) [12]. Zidentyfikowane zostały TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, które różnią się swoistością substratową. Mechanizm inhibicji z udziałem TIMPs polega na odwracalnym wiązaniu N-terminalnej domeny do centrum katalitycznego metaloproteinaz poprzez mostki disiarczkowe. TIMPs wiążą się z MMPs w stosunku 1:1 i blokują aktywność poszczególnych enzymów z różnym powinowactwem. Wykazano, że TIMP-2 i TIMP-3 hamują aktywność MMP-14, podczas gdy TIMP-1 nie wykazuje do niej powinowactwa. Podobnie TIMP-1 jest sła-

bym inhibitorem MMP-16, natomiast TIMP-3 zdaje się silniej hamować aktywność MMP-9 niż inne TIMPs. Inhibitory metaloproteinaz mogą znajdować się także na powierzchni komórek – białko RECK, kotwiczone w błonie przez glikofosfatydyloinozitol, które hamuje silnie aktywność MMP-2, MMP-9 i MMP-14 [1,5,11]. α 2-makroglobulina tworzy z MMPs nieodwracalne połączenia, które są usuwane na drodze endocytozy za pośrednictwem scavenger receptors na powierzchni fagocytów [7].

Wybrane biologiczne funkcje MMPs

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej, trawiąc składniki ECM, mediuje wiele procesów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania ustroju, a także jego rozwoju. ECM występuje w wielu narządach, ponieważ tkanka łączna jest szeroko rozpowszechniona w organizmie człowieka. Od pewnego czasu mówi się o tym, że ECM nie jest jedynie pasywną strukturą, lecz czynnie wpływającym na zachowanie komórek układem biologicznym. To od równowagi w ECM zależą rozmaite procesy, takie jak zachowanie przez komórki kształtu, ich ruch, wzrost i różnicowanie oraz przeżycie. Równowaga ta dokonywana jest poprzez regulację ekspresji cząsteczek adhezyjnych i białek cytoszkieletu. Najważniejsze procesy, które wymagają degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej i tym samym katalizowane są przez MMPs to gojenie się ran, formowanie kości, tworzenie nowych naczyń włosowatych oraz procesy zapalne.

Rola MMPs w gojeniu się ran

Gojenie się uszkodzonej tkanki można przedstawić jako trzy główne procesy: reepitalizacja, różnicowanie komórek i rozwój zapalenia z ziarninowaniem. Reepitalizacja polega na rozluźnieniu połączeń między komórkami oraz między komórkami a ECM na brzegach rany i migracji komórek w jej głąb. Tam następuje proliferacja komórek nabłonka, aż pokryją one całkowicie dno rany. Następnie dochodzi do różnicowania i rozplemu fibroblastów. Krótco po urazie rozwija się także odpowiedź zapalna, która polega na migracji neutrofilów i makrofagów na skutek czynników chemotaktycznych uwalnianych m.in. przez komórki nabłonka. W ten sposób powstaje tkanka ziarninowa, której macierz wytwarzają fibroblasty. Początkowo ziarnina zawiera dużo fibronektyny, która jednak jest trawiona i stopniowo zastępowana przez kolageny, które mają nadać nowej tkance większą wytrzymałość. Podczas ziarninowania dochodzi także do kielkowania nowych naczyń włosowatych. W końcowej fazie gojenia dochodzi do ściągnięcia rany i wytworzenia blizny poprzez ciągły remodeling ECM (synteza i degradacja włókien kolagenowych).

Wiele MMPs (MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-14, MMP-28) jest zaangażowanych w reepitalizację rany. MMP-1 wykazuje dużą ekspresję w ranach skórnych, w których komórki nabłonkowe migrują z błony podstawnej, napotykać macierz skórną bogatą w kolagen typu I, z którym wchodzi w interakcje poprzez integryny α 2 β 1. Takie połączenie następnie skutkuje zwiększeniem ekspresji MMP-1, która trawiąc połączenia integrynowe ułatwia wspomnianym komórkom migrację. Także MMP-3 i MMP-10 są zaangażowane w procesy reepitalizacji i migracji w ranach skórnych [13], natomiast MMP-7 jest szczególnie ekspresjonowana podczas zranień tchawicy i innych narządów wysłanych nabłonkami śluzowymi, wywołanych infekcją bakteryjną, np. w gojeniu się wrzodów żołądka [1,13,14]. Zbadano, że działanie tego enzymu polega na trawieniu połączeń tworzonych przez E-kadheryny, co ma ułatwiać migrację komórek nabłonka i ich proliferację w dnie rany. MMP-9, uwalniając EGF i HGF, także umożliwia migrację komórek nabłonkowych. Ekspresja tego enzymu wzrasta po zadziałaniu TNF- α lub NO na komórki oskrzelików płucnych, prowadząc do zamknięcia rany w tej tkance. Metaloproteinazy biorą udział także w zapalnej fazie gojenia. Są one wydzielane przez migrujące przez nabłonek komórki zapalne, ale także przez komórki zrębu różnych tkanek. MMPs regulują zachowanie komórek zapalnych poprzez regulację aktywności cytokin i chemokin (zwykle przez proteolizę) i tak np. działanie MCP-1, RANTES, MCP-3, MCP-2, MCP-4 jest regulowane najbardziej skutecznie przez MMP-1 i MMP-3. Także aktywność interleukiny-8 jest modyfikowana przez liczne MMPs, szczególnie MMP-8 i MMP-9. Interakcje cytokiny CXCL5 z MMPs, podobnie jak IL-8, prowadzą do wzrostu jej aktywności i tym samym intensyfikacji rekrutacji komórek zapalnych, natomiast cytokina CXCL12 jest negatywnie regulowana przez MMPs i jej aktywność spada. Oprócz proteolizy metaloproteinazy wpływają także na powstanie gradientu chemotaktycznego. Wspomniane komórki nabłonka oskrzelików i pęcherzyków płucnych na swojej powierzchni podstawnej ekspresjonują cząsteczki syndekanu. Po urazie nabłonek ten wytwarza duże ilości CXCL1, który wiąże się z łańcuchami siarczanu heparanu, obecnymi na cząsteczkach syndekanu. Ranny nabłonek wydziela także MMP-7, która odrywa kompleksy CXCL1-syndekan od komórek i powoduje ich przemieszczenie się wzdłuż połączeń komórkowych, aż do światła oskrzelika/pęcherzyka, tworząc tym samym gradient dla neutrofilów. Do właściwego ściągnięcia rany niezbędne jest zachowanie równowagi między syntezą i degradacją kolagenu, do czego zdolne są MMP-1, MMP-3, MMP-13, MMP-14. W ranach rogowki po keratektomii MMP-2, MMP-9 i w mniejszym stopniu MMP-3 są zlokalizowane na powierzchni komórek zrębu, za migrującymi komórkami na-

blonka, co sugeruje ich rolę w przekształcaniu zrębu i błony podstawnej komórek rogówki [13].

Rola MMPs w morfogenezie i obrocie kości

Prawidłowa morfogeneza i remodeling kości u człowieka przebiega jako kościotworzenie na podłożu chrzęstnym (przede wszystkim w kościach długich) lub kościotworzenie na podłożu łącznotkankowym (występuje w kościach płaskich). Procesy te są niezbędne w rozwoju płodowym i w okresie postnatalnym (gojenie się złamań kości). W prawidłowe formowanie kości w zarodku zaangażowane są procesy proliferacji i różnicowania chondrocytów, degradacji macierzy chrzęstnej/kostnej, co wpływa na adhezję i umożliwia komórkom migrację. Wyniki wielu badań przeprowadzonych na myszach (które wykazują analogiczne mechanizmy rozwoju i formowania kości) wykazały, że z prawidłowym wzrostem kości związane są głównie MMP-2, MMP-9, MMP-13, MMP-14 i MMP-16. Na mysich modelach pozbawionych genów kodujących MMP-2 i MMP-9 przedstawiono, że brak aktywności tych enzymów skutkuje deformacjami kości i zaburzeniami ich rozwoju, przy czym brak MMP-2 powodował raczej deformacje w obrębie czaszki i kości płaskich, natomiast brak MMP-9 upośledzał wzrost kości długich [14]. Mutacje genu MMP-2 w ludzkich komórkach manifestują się obniżeniem lub brakiem aktywności białka enzymatycznego i rozwojem tzw. NAO syndrome, który dziedziczony jest jako cecha autosomalna recesywna. Zaburzenie to charakteryzuje się powstawaniem włókniakowych guzków w skórze, zapaleniem stawów i nasiloną osteolizą [7], co wskazuje na istotną rolę tego enzymu w prawidłowej osteogenezie. Brak aktywności MMP-9 powodował u myszy skrócenie kości długich, które wynika z powiększenia stref przerosłych komórek chrzęstnych i upośledzenia kostnienia tych miejsc, co związane jest ze zmniejszeniem uwalniania czynników proangiogennych z ECM i następowym zmniejszeniem penetracji naczyń włosowatych w tych strefach. Nie wykazano natomiast, by deformacje kości były spowodowane zaburzeniami proliferacji czy różnicowania chondrocytów. W komórkach zdrowych myszy MMP-9 jest odpowiedzialna właśnie za tworzenie gradientu sygnałów proangiogennych dla komórek śródbłonna naczyń włosowatych. Skrócenie kości długich u myszy nie jest jednak znaczne (ok. 10%), co może sugerować istnienie mechanizmów kompensujących brak MMP-9 [1,7]. Podobne konsekwencje niesie za sobą brak MMP-13, która – trawiąc głównie kolagen typu I i II oraz agrekan – wpływa na ilość i jakość macierzy kości korowej, a tym samym na wytrzymałość mechaniczną tkanki kostnej [15]. Najbardziej poważne konsekwencje kliniczne, co sugeruje kluczową rolę enzymu w homeostazie

kości, niosą za sobą mutacje genu MMP-14. U myszy pozbawionych genu MMP-14 dochodzi do zaburzeń kostnienia zarówno na podłożu tkanki chrzęstnej, jak i łącznej. Ta błonowa metaloproteinaza jest silnym aktywatorem proMMP-2, dlatego też fenotyp kliniczny braku enzymu przypomina ten wywołany brakiem MMP-2 (NAO syndrome) i prowadzi do szybkiej śmierci. Enzym ten jest ekspresjonowany we wszystkich komórkach kości, ale najobficiej występuje na powierzchni osteoklastów i sugeruje się, że MMP-14 wpływa na różnicowanie osteoblastów oraz ich aktywność [7,16].

Rola MMPs w angiogenezie

Angiogeneza jest złożonym i niezwykle istotnym dla życia procesem. Aby powstały nowe naczynia krwionośne, konieczna jest proteolityczna degradacja błony podstawnej, po czym musi dojść do migracji komórek śródbłonna i ich proliferacji w zrębie tkanki. Na proces ten wpływ ma wiele substancji o działaniu zarówno proangiogennym, jak i antyangiogennym. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej mają znaczny wpływ na komórki śródbłonna, regulując ich migrację i tworzenie kapilar. MMPs trawią składniki ECM i błony podstawnej, uczestniczą zatem w angiogenezie, po pierwsze umożliwiając migrację proliferującym komórkom śródbłonna, po drugie zapewniając w fizjologicznych warunkach równowagę między stężeniami cytokin promujących angiogenezę i tymi, które ją blokują. W tworzenie naczyń mocno zaangażowane są głównie MMP-2, MMP-9 i metaloproteinazy błonowe [14].

MMPs mogą trawić VE-kadherynowe połączenia międzykomórkowe, co prowadzi do przerwania połączeń komórka-komórka. Następnie dochodzi do proteolizy kolagenu typu IV, który stanowi szkielet błony podstawnej naczynia, katalizowanej przez MMPs. To powoduje odkrycie połączeń integrynowych $\alpha v \beta 3$, których następnie wiązanie będzie promować angiogenezę. Trawienie kolagenu typu IV powoduje utratę wiązania integryn $\alpha 1 \beta 1$ i wzrost wiązania do miejsc $\alpha v \beta 3$, co koreluje ze wzrostem ekspresji i aktywności MMP-2, która łączy się z tym miejscem przez swoją domenę hemopeksynopodobną i w ten sposób działa stymulująco na angiogenezę. MMP-2 i MMP-9 są transportowane w pęcherzykach poza komórkę, a otwieranie tych pęcherzyków jest mediowane przez bFGF i VEGF. bFGF, działając na komórki śródbłonna, pobudza ekspresję MMP-9 i uPA, a także integryn $\alpha v \beta 3$, które są zaangażowane w uruchomienie omówionego wyżej procesu. VEGF natomiast pobudza wydzielanie MMP-1.

MMP-2 jest stale wydzielana przez komórkę w swojej nieaktywnej postaci. W celu jest aktywacji niezbędne jest zadziałanie TNF- α lub ekspozycja komórek na włókna kolagenu typu I, co

prowadzi do pobudzenia syntezy MMP-14, która może następnie aktywować proMMP-2 do MMP-2. Metaloproteiny, degradując składniki ECM, nie tylko „torują” drogę migrującym komórkom endothelium, ale także uwalniają z niej wiele cytokin biorących udział w angiogenezie, wzmagając tym samym ich biodostępność. Przykładem może być uwalnianie bFGF po strawieniu perlekanu błony podstawnej przez MMP-1 i MMP-3 czy trawienie CTGF tworzącego nieaktywny kompleks z VEGF, po którym dochodzi do uwolnienia aktywnego VEGF przez MMP-1, MMP-3, MMP-7 oraz MMP-13 [16].

MMPs w wybranych jednostkach chorobowych i grupach chorób

Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej uczestniczą praktycznie we wszystkich procesach mających miejsce w ustroju, przyczyniając się do utrzymania homeostazy. Dokładne omówienie dostojnej roli tych enzymów wykracza poza ramy tego opracowania, a przedstawione powyżej zjawiska, w które zaangażowane są MMPs, mają zobrazować przy-czynek metaloproteinaz do rozwoju różnych chorób, które wynikają z zaburzenia tych procesów.

MMPs są obecnie kojarzone z wieloma jednostkami chorobowymi i patologiami, zaczynając od chorób pęcherzowych skóry, poprzez choroby jamy ustnej, osteoporozę, a na nowotworach i chorobach zapalnych kończąc. Ze względu na licznosc prowadzonych badań i tym samym obfitosc literatury w pracy omówiona zostanie rola MMPs w wybranych chorobach nowotworowych, w chorobach OUN (z naciskiem na glejaki) oraz w chorobach układu naczyniowego.

MMPs w nowotworach

Progresja nowotworu jest uzależniona od warunków mikrośrodowiska. Jednym z czynników, które mogą sprzyjać rozwojowi komórek nowotworach jest macierz zewnątrzkomórkowa. ECM zawiera wiele typów komórek, które mogą znacznie przyczyniać się do przyjęcia przez komórki fenotypu inwazyjnego np. poprzez wydzielanie czynników wzrostu oraz różnych enzymów proteolitycznych, szczególnie MMPs. Zwiększoną ekspresję metaloproteinaz stwierdzono w nowotworach złośliwych przewodu pokarmowego, płuc, sutka, pęcherza moczowego i prostaty [11,18]. Nadmierna sekrecja tych białek silnie koreluje z zaawansowaniem procesu chorobowego, nasiloną inwazyjnością i zdolnością do przerzutowania, a tym samym skróceniem życia pacjentów, ponieważ MMPs, trawiąc składniki podścieliska guza, umożliwiają jego komórkom migrację i zasiedlanie nowych nisz po wniknięciu do krążenia. Poprzez degradację ECM MMPs uczestniczą w procesie patologicz-

nej angiogenezy, która jest niezbędna dla rozrostu guza. Także uwalniane z macierzy czynniki wzrostu (np. IGF) mogą stymulować dalszy wzrost i nadmierną produkcję MMPs, natomiast ekspresja TIMPs jest zwykle zahamowana lub znacznie obniżona. Źródłem metaloproteinaz są nie tylko komórki nowotworowe, ale głównie komórki mikrośrodowiska guza (makrofagi, fibroblasty, mastocyty), które są pobudzane do ich produkcji na drodze parakrynej (np. przez wydzielanie induktora syntezy metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej – EMMPRIN) [6].

Wyniki wielu badań wskazują, że aktywnosc MMPs jest czynnikiem rokowniczym w terapii [11]. Komórki raka jelita grubego wykazują wzmożoną sekrecję MMP-9, która trawiąc kolagen typu IV w błonie podstawnej uczestniczy w naciekaniu i tworzeniu przerzutów. W obszarach guza o dużej aktywności MMP-9 i MMP-2 stwierdzono brak ekspresji kolagenu typu IV, co sugeruje zatem rozprzestrzenianie się komórek rakowych przy udziale żelatynaz. W przypadkach metastaz raka jelita grubego do wątroby zwiększona aktywnosc MMP-9 związana jest ze skróceniem czasu od diagnozy do powstania wtórnych ognisk nowotworowych, a to pozwala rokować o przeżyciu chorych [19]. Także w komórkach raka trzustki wykazano związek pomiędzy MMPs, szczególnie MMP-2 i MMP-9 oraz MT-MMPs, a powstawaniem odległych przerzutów, natomiast niska ekspresja MMP-9 może być odpowiedzialna za łagodniejszy fenotyp komórek tego nowotworu. W raku trzustki stwierdzono korelację między ekspresją i aktywnością MMP-2 i MT-MMPs, a stopniem odczynu desmoplastycznego (rozwój włóknienia wokół guza), charakterystycznego dla tego nowotworu. Zwiększona synteza żelatynaz może być związana ze zdolnością naciekania dużych naczyń krwionośnych i tym samym większym ryzykiem przerzutów do wątroby. Inne badania wskazują, że podwyższona ekspresja MMP-1 w komórkach raka trzustki jest związana z krótszym czasem przeżycia pacjentów. Także pacjenci ze wzmożoną ekspresją MMP-7 w komórkach guza trzustki cechowali się krótszym przeżyciem, co pozwoliło przypuszczać, że enzym ten może być nowym, negatywnym czynnikiem prognostycznym [20]. W innych nowotworach złośliwych profil ekspresji MMPs wygląda podobnie, gdyż charakterystyczny dla złośliwych guzów jest wzrost aktywności żelatynaz, które warunkują ruchliwość komórek nowotworowych, a tym samym możliwość naciekania tkanek okolicznych czy też odległych.

MMPs w chorobach OUN

MMPs w zdrowym układzie nerwowym wykazują niską ekspresję, jednak w różnych chorobach dochodzi do ich wzmożonego wydzielania i nadmiernej aktywności. Wysoka ekspresja tych en-

zymów została zaobserwowana w chorobach zapalnych, nowotworach pochodzenia neuroepitelialnego i wielu innych patologiach OUN. Stwardnienie rozsiane (SM) jest autoimmunologiczną chorobą zapalną, w przebiegu której dochodzi do odcinkowej demielinizacji istoty białej. U pacjentów z SM wykazano obecność metaloproteinaz w płynie mózgowo-rdzeniowym, który u zdrowych osób jest wolny od tych enzymów. Co więcej, udowodniona została korelacja między aktywnością MMP-9 a oligoklonalnymi przeciwciałami IgG i liczbą leukocytów w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z SM. MMPs produkowane są przez makrofagi obecne w ogniskach demielinizacji, limfocyty T i astrocycy. Aktywność metaloproteinaz w surowicy chorych ma charakterystyczny obraz: obserwuje się wzrost aktywności MMP-9 u pacjentów z aktywną postacią choroby, natomiast zwiększona aktywność MMP-2 przemawia za przewlekłą postacią SM [21]. Aktywność proteolityczna MMPs ma duże znaczenie dla rozwoju choroby, ponieważ enzymy te, mając zdolność degradacji białek błony podstawnej w naczyniach mózgowych, powodują zwiększony napływ limfocytów do OUN. Kolejnym punktem działania jest trawienie przez MMPs białka MBP, które buduje osłonki mielinowe [22]. Wykazano, że MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 i MMP-9 mają zdolność degradacji tego białka, prowadząc do odkrycia immunogennych epitopów, które pobudzają autoimmunologiczną reakcję organizmu [21,22]. Wzmocnienie autoreaktywnej odpowiedzi mediuje także cytokiny, które są aktywowane lub uwalniane przy udziale MMPs, jak np. TNF- α , który promuje produkcję innych mediatorów nasilających proces zapalny [21,23]. MMPs pełnią istotną rolę w inwazyjności nowotworów pochodzenia neuroepitelialnego. W konkretnych typach histopatologicznych guzów zaobserwowano charakterystyczny profil ekspresji MMPs. W złośliwych guzach mózgu największa rola w tworzeniu metastaz przypada MMP-2, MMP-9 i MT-MMPs [12]. W złośliwych glejakach (glioblastoma multiforme) produkcja MMP-2 była znacznie podwyższona w stosunku do zdrowej tkanki mózgowej czy glejaków o niskim stopniu złośliwości, ponadto ustalono, że poziom aktywności MMP-2 koreluje ze stopniem inwazyjności *in vitro* [24]. Wzrost ekspresji MMP-2 korelował z nadekspresją angiopoetyny-2, która ma zdolność aktywacji proMMP-2 i proMMP-14 [5]. Podobne wyniki uzyskano badając aktywność MMP-9 w złośliwych glejakach. Także tutaj aktywność enzymu była istotnie wyższa w porównaniu ze zdrową tkanką. W próbkach badanych MMP-9 była obecna przede wszystkim w obrębie proliferujących naczyń krwionośnych, co wskazuje na rolę enzymu w angiogenezie, podczas gdy MMP-2 i metaloproteinazy błonowe wykrywane były głównie w komórkach nowotworowych i otaczającym je podścielisku, co

przemawia za ich rolą w inwazji glejaków. Także nadekspresja MMP-14 jest silnie związana ze stopniem złośliwości i potencjałem inwazyjności w komórkach glioblastoma multiforme, a także wpływa na aktywność MMP-2, dla której MMP-14 jest głównym aktywatorem [24]. Glejaki wielopostaciowe są najbardziej agresywnymi nowotworami mózgu u dorosłych i nadekspresja MMPs, które mają zdolność trawienia komponentów ECM ułatwia zmienionym nowotworowo astrocytom migrację i rozrost, a także tworzenie metastaz.

Udział metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej potwierdzono także w innych chorobach układu nerwowego, takich jak płasawica Huntingтона [25] czy choroba Alzheimer'a [22].

MMPs w chorobach naczyń krwionośnych

Kształt i integralność prawidłowych naczyń krwionośnych zależy od równowagi pomiędzy ekspresją i aktywnością MMPs i ich inhibitorów. Głównymi producentami metaloproteinaz w ścianie naczynia są komórki mięśni gładkich i komórki śródbłonna, a także napływające tam monocyty i limfocyty. Do patologicznej przebudowy ściany naczynia dochodzi z skutków zmian hemodynamicznych, które generują powstanie związków aktywujących proMMPs i unieczynnających TIMPs (stres oksydacyjny). Konsekwencją aktywacji MMPs jest powstawanie zmian miażdżycowych w naczyniach [26], a dodatkowo destabilizacja powstałych już blaszek miażdżycowych, co może sprzyjać ich pękaniu [27]. Miażdżycza jest przewlekłą chorobą zapalną spowodowaną hipercholesterolemią, która zapoczątkowana jest przez uszkodzenie śródbłonna naczyniowego. Podstawowym wykładnikiem progresji miażdżycy są blaszki miażdżycowe, które zbudowane są z lipidowego, płynnego rdzenia i pierścienia włóknistego, zawierającego głównie kolageny i elastynę. Monocyty migrujące do blaszki miażdżycowej są zdolne do syntezy wielu MMPs, do której pobudzane są przez śródbłonek i kontakt z kolagenami. W aktywnych blaszkach miażdżycowych obserwuje się obecność m.in. MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-14. Aktywność MMP-11 wykazano w bardzo zaawansowanych blaszkach miażdżycowych, natomiast zwiększoną aktywność MMP1, MMP-8, MMP-12, MMP-13, MMP-16 w aktywnych, bogatych w lipidy blaszkach. MMP-7 i MMP-12 były wykrywane na granicy między rdzeniem lipidowym, a bogatymi w makrofagi zmianami brzeżnymi, co koreluje ze stopniem niestabilności blaszek miażdżycowych. Aktywacja makrofagów i ich przekształcenie w komórki piankowate powoduje zwiększenie produkcji MMPs. Szczególną rolę przypisuje się tutaj MMP-9, która wykrywana jest w blaszkach o dużym ryzyku pęknięcia. MMPs poprzez degradację naczyniowej ECM umożliwiają w końcu komórkom mięśni gładkich migrację z błony

środkowej do wewnętrznej w naczyniach tętniczych, co jest ważnym procesem w rozwoju zmian aterosklerotycznych [26]. Patologiczny remodeling naczyń krwionośnych spowodowany nadekspresją MMPs wywołaną podwyższonym stężeniem glukozy we krwi, zaobserwowano także u pacjentów cierpiących na cukrzycę z powikłaniami w postaci makro- i mikroangiopatii. W patogenezie tych zmian biorą udział przede wszystkim MMP-2 i MMP-9, których produkcja w komórkach naczyń włosowatych siatkówki czy nerek jest silnie stymulowana właśnie przez wysokie stężenia glukozy we krwi [28].

Zmiany miażdżycowe dotyczą także naczyń wieńcowych i są przyczyną choroby niedokrwiennej serca oraz jej powikłań w postaci zawału mięśnia sercowego. Kardiomiocyty w zdrowym mięśniu sercowym wykazują niską ekspresję MMPs, co skutkuje powolnym obrotem ECM. Sytuacja zmienia się jednak po zawale niedokrwinnym mięśnia sercowego i indukcja MMPs może doprowadzić do nieprawidłowej przebudowy serca [29]. Wzrost produkcji MMPs i spadek syntezy TIMPs wywołane są przez stres oksydacyjny na skutek niedotlenienia i reperfuzy. Brak aktywności TIMPs, szczególnie TIMP-4, prowadzi do ostrego uszkodzenia serca, ponie-

waż MMP-2, której aktywność jest regulowana przez ten inhibitor, powoduje uszkodzenia miokardium po niedokrwieniu i reperfuzji poprzez degradację troponiny I [30]. Skutkiem ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego jest remodeling tkanki prowadzący do rozwoju hipertrofii, zwłóknienia i rozstrzenia niezmienionej chorobowo części serca [31].

Podsumowanie

MMPs są ważnymi regulatorami homeostazy wielu tkanek i narządów. Udowodniono w wielu badaniach, że enzymy te biorą udział w fizjologicznych procesach toczących się w tkankach oraz zmianach patologicznych w przebiegu różnych procesów chorobowych. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej z powodu swoich licznych funkcji mogą stanowić punkt uchwytu dla wielu leków, umożliwiając tym samym terapię chorób, w których patogenezę lub rozwój objawów zaangażowane są MMPs. Szczególnie duże nadzieje budzi zrozumienie molekularnych mechanizmów łączących cechy złośliwości nowotworów z metaloproteinazami w kontekście wydłużenia czasu przeżycia chorych oraz poprawy jakości ich życia

Piśmiennictwo:

- [1] Löffek S., Schilling O., Franke C-W. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *The European Respiratory Journal* 2011; 38(1): 191-208.
- [2] Ethell I.M., Ethell D.W. Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. *Journal of Neuroscience Research* 2007; 85(13): 2813-2823.
- [3] Verma R.P., Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 15(2007): 2223-2268.
- [4] Lipka D., Boratyński J. Metaloproteinazy MMP. Struktura i funkcja. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2008; 62: 328-336.
- [5] Łapka A., Drag J., Goździalska A., et al. Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej w glejakach. *Postępy Psychiatrii i Neurologii* 2008; 17(3): 207-211.
- [6] Fink K., Boratyński J. Rola metaloproteinaz w modyfikacji macierzy zewnątrzkomórkowej w nowotworowym wzroście inwazyjnym, w przerzutowaniu i w angiogenezie. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2012; 66: 609-628.
- [7] Sternlicht M.D., Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2001; 17: 463-516.
- [8] Somerville R.P.T., Oblander S.A., Apte S.S. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biology* 2003; 4: 216.
- [9] Galea C.A., Nguyen H.M., Chandy K.G., et al. Domain structure and function of matrix metalloproteinase 23 (MMP23): role in potassium channel trafficking. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2003; August.
- [10] Binder D.K., Berger M.S. Proteases and the biology of glioma invasion. *Journal of Neuro-Oncology* 2002; 56: 149-158.
- [11] Egeblad M., Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews. Cancer* 2002; 2(3): 161-174.
- [12] Bogaczewicz J., Jasielski P., Mosiewicz A., et al. Rola metaloproteinaz macierzy i tkankowych inhibitorów metaloproteinaz w inwazji nowotworów pochodzenia neuroepitelialnego. *Neurologia i Neurochirurgia Polska* 2006; 40, 5: 404-412.
- [13] Gill S.E., Parks W.C. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2008; 40(6-7): 1334-1347.
- [14] Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 8(3): 221-233.
- [15] Tang S.Y., Herber R-P., Ho S.P., et al. Matrix metalloproteinase-13 is

required for osteocytic perilacunar remodeling and maintains bone fracture resistance. *Journal of Bone and Mineral Research* 2012; 27, 9: 1936-1950.

- [16] Krane S.M., Inada M. Matrix metalloproteinases and bone. *Bone* 2008, 43: 7-18.
- [17] Rundhaug J.E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2005; 9, 2: 267-285.
- [18] Kwiatkowski P., Godlewski J., Śliwińska-Jewsiewicka A., et al. Rola metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w procesie inwazji nowotworu. *Polish Annals of Medicine*, 2008; 15(1): 43-50.
- [19] Groblewska M., Mroczko B., Szmítkowski M. Rola wybranych metaloproteinaz i ich inhibitorów w rozwoju raka jelita grubego. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2010; 64: 22-30.
- [20] Łukaszewicz M., Mroczko B., Szmítkowski M. Rola metaloproteinaz i ich inhibitorów w raku trzustki. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2008; 62: 141-147.
- [22] Yong V.W., Power C., Forsyth P., et al. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nature Reviews. Neuroscience* 2001; 2(7): 502-511.
- [23] Losy J. Rola czynników immunologicznych i zapalnych w patogenezie stwardnienia rozsianego. *Polski Przegląd Neurologiczny* 2009; 5 (4): 159-165.
- [24] Nakada M., Okada Y., Yamashita J. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Frontiers in Bioscience* 2003; 8, 1: 261-269.
- [25] Fujioka H., Dairyō Y., Yasunaga K., et al. Neural functions of matrix metalloproteinases: plasticity, neurogenesis and disease. *Biochemistry Research International* 2012; 2012:789083, 1-8.
- [26] Fic P., Zakrocka I., Kurzepa J., et al. Metaloproteinazy w miażdżycy naczyń krwionośnych. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2011; 65: 16-27.
- [27] Kaźmierczak E., Jablecka A. Zapalne czynniki predykcyjne choroby wieńcowej. *Nadciśnienie Tętnicze* 2008; 13, 4: 286-289.
- [28] Rogowicz A., Zozulińska D., Wierusz-Wysocka B. Znaczenie metaloproteinaz i ich inhibitorów w progresji naczyniowych powikłań cukrzycy – możliwości terapeutyczne. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2007; 117(3): 103-108.
- [29] Żebrowski M., Kiersus-Gudaj A., Żebrowska A. Udział metaloproteinaz w patomechanizmach choroby niedokrwiennej serca. *Forum Kardiologów* 2003; 8, 2: 53-57.
- [30] Urbanowicz I., Woźniak M., Sawicki G., et al. Metaloproteinaza-2 w uszkodzonym śródbłonku naczyń wieńcowych mięśnia sercowego poddanego niedokrwieniu i następującej reperfuzji. *Diagnostyka Laboratoryjna* 2011; 47, 3: 317-321.
- [31] Kukackaa J., Průšaa R., Kotskaa K. Matrix metalloproteinases and

- their function in myocardium. *Biomedical Papers of Palacký University* 2005; 149(2): 225-236.[21] Kurzepa J., Bartosik-Psujek H., Suchożębska-Jesioneck D., et al. Rola metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w patogenezie stwardnienia rozsianego. *Neurologia i Neurochirurgia Polska* 2005; 39, 1: 63-67.
- [22] Yong V.W., Power C., Forsyth P., et al. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nature Reviews. Neuroscience* 2001; 2(7): 502-511.
- [23] Losy J. Rola czynników immunologicznych i zapalnych w patogenezie stwardnienia rozsianego. *Polski Przegląd Neurologiczny* 2009; 5 (4): 159-165.
- [24] Nakada M., Okada Y., Yamashita J. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Frontiers in Bioscience* 2003; 8, 1: 261-269.
- [25] Fujioka H., Dairyō Y., Yasunaga K., et al. Neural functions of matrix metalloproteinases: plasticity, neurogenesis and disease. *Biochemistry Research International* 2012; 2012:789083, 1-8.
- [26] Fic P., Zakrocka I., Kurzepa J., et al. Metaloproteinazy w miażdżycy naczyń krwionośnych. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2011; 65: 16-27.
- [27] Kaźmierczak E., Jabłeczka A. Zapalne czynniki predykcyjne choroby wieńcowej. *Nadciśnienie Tętnicze* 2008; 13, 4: 286-289.
- [28] Rogowicz A., Zozulińska D., Wierusz-Wysocka B. Znaczenie metaloproteinaz i ich inhibitorów w progresji naczyniowych powikłań cukrzycy - możliwości terapeutyczne. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2007; 117(3): 103-108.
- [29] Żebrowski M., Kierus-Gudaj A., Żebrowska A. Udział metaloproteinaz w patomechanizmach choroby niedokrwiennej serca. *Forum Kardiologów* 2003; 8, 2: 53-57.
- [30] Urbanowicz I., Woźniak M., Sawicki G., et al. Metaloproteinaza-2 w uszkodzonym śródbłonku naczyń wieńcowych mięśnia sercowego poddanego niedokrwieniu i następnej reperfuzji. *Diagnostyka Laboratoryjna* 2011; 47, 3: 317-321.
- [31] Kukačka J., Průša R., Kotaškaa K. Matrix metalloproteinases and their function in myocardium. *Biomedical Papers of Palacký University* 2005; 149(2): 225-236.

NANOTECHNOLOGIA JAKO NOWE SPOJRZENIE NA PRZYSZŁOŚĆ MEDYCYNY

Piotr Konieczny

Zakład Biochemii Ogólnej

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński

Praca napisana pod opieką: dr hab. Jolanty Jury, prof. UJ

Streszczenie: Rozwój nanotechnologii nabrał znaczącego tempa ze względu na szerokie zastosowanie nanocząsteczek nie tylko w przemyśle, ale przede wszystkim w branży medycznej. Nanocząsteczki w postaci polimerów, kompleksów metali, liposomów, miceli, dendrymerów, mikrokapsulek oraz lipoprotein odgrywają znaczącą rolę w diagnostyce i terapii wielu chorób. Narzędzia, jakie dostarcza nanotechnologia, umożliwiają rozpoznanie zmian i podjęcie działań naprawczych na poziomie komórkowym i molekularnym oraz zastosowanie technik terapii ukierunkowanych na konkretne struktury w komórce. Wielkie nadzieje wiążą się z zastosowaniem nanotechnologii w medycynie regeneracyjnej czy onkologii. Wymaga to jednak dokładnego poznania i zrozumienia biologii regeneracyjnej oraz procesów nowotworzenia – sygnałów inicjujących, jak również złożonego systemu kontroli przebiegu tych procesów. Dzięki rozwojowi nanotechnologii powstał nowy nurt terapii określony mianem nanoterapii. Znalazła ona także zastosowanie w farmacji, między innymi w badaniach nad drogą podania leku. W poniższej pracy scharakteryzowano nanocząsteczki, które znalazły zastosowanie w medycynie. Przedstawione zostały również możliwości i pierwsze próby zastosowania nanotechnologii w diagnostyce oraz terapii chorób neurodegeneracyjnych i nowotworowych.

Wstęp

Nasz świat materialny składa się z atomów. Stwierdził to już około 2400 lat temu grecki myśliciel Demokryt. W 1959 roku amerykański fizyk Richard Feynman, w pracy zatytułowanej „There’s plenty of room at the bottom” [50], po raz pierwszy zasugerował, iż istnieje możliwość manipulacji materią na poziomie cząsteczkowym i atomowym. Był to pierwszy krok ku nowej technologii, której nazwę – nanotechnologia – nadał profesor Kerie E. Drexel [1], a po raz pierwszy w 1974 roku wprowadził japoński naukowiec Norio Taniguchi [2]. Kilka ostatnich lat badań przyniosło lawinowy wzrost osiągnięć z zakresu nanotechnologii, czyli obszaru nauki, który wykorzystuje techniki i metody atomowe, molekularne i makromolekularne [1, 2]. Zajmuje się ona projektowaniem, otrzymywaniem i nadawaniem pożądanych właściwości strukturom, których co najmniej jeden wymiar wynosi od 1 do 100 nm [4].

Ze względu na przedmiot pracy i wykorzystywane techniki wyróżnia się:

- nanotechnologię „mokrą”, która skupia się na systemach biologicznych istniejących przede wszystkim w środowisku wodnym,
- nanotechnologię „suchą” zajmującą się wytwarzaniem struktur węglowych, silikonów i innych materiałów nieorganicznych,
- nanotechnologię „obliczeniową” umożliwiającą modelowanie i symulację struktur.

Pomiędzy tymi działami istnieją ściśle zależności i postęp w każdym z nich jest związany z osiągnięciami w dwóch pozostałych [5].

Materiały zaliczane do obszaru nanoskali często wykazują szczególne właściwości, np. miedź, która na ogół jest nieprzejrystym materiałem, w nanoskali nabiera nowych właściwości i staje się przezroczysta [8]. Silikon, który powszechnie wykorzystywany jest jako źródło izolacji, nabiera zdolności przewodzenia prądu elektrycznego. Tak bardzo różne właściwości są skutkiem zmian powierzchni styku i dominacji efektów kwantowych [8]. Do metod pozwalających uzyskać pożądany nanomateriał możemy zaliczyć dwa podejścia pozwalające otrzymać:

- produkty I generacji, które otrzymywane są metodą „TOP-DOWN”. Polega ona na zmniejszeniu rozmiarów materiałów już istniejących do nanoskali przez użycie siły mechanicznej, emulgacji, działania ultradźwiękami i mikrofluidyzacji,
- produkty II generacji – otrzymywane metodą „BOTTOM-UP”, polegającą na tworzeniu nowych nanomateriałów przy wykorzystaniu agregacji molekuł [9, 10, 11].

Jednym z wielu obszarów aplikacyjnych badań nanotechnologicznych jest nanomedycyna [3]. Jej rozwój jest ściśle powiązany z rozwojem takich technik jak biologia molekularna, w tym także nanomikroskopia, które umożliwiły zrozumienie wielu mechanizmów patologii subkomór-

kowych [1, 3]. Rozwój tych technik stał się inicjatorem medycyny spersonalizowanej, polegającej na doborze diagnostyki i leczeniu chorego indywidualnie [6]. Nanomedycyna zatem polega na czynnościach diagnostyczno-badawczych i postępowaniu leczniczym w wymiarze nanoskali. W skład nanomedycyny wchodzi m.in. takie dziedziny, jak nanofarmakologia, nanodiagnostyka, medycyna regeneracyjna, nanonkologia czy nanokosmetologia [6, 7]. Najlepszym przykładem nanomedycyny jest nanofarmakologia z głównym kierunkiem badań obejmującym tworzenie systemów selektywnego dostarczania i uwalniania leków do zmienionych patologicznie komórek. Nanocząstki, takie jak biodegradowalne polimery i lipidy, nanocząstki złota i srebra, nanocząstki półprzewodnikowe, nanorurki węglowe i wiele innych, umożliwiają dostarczenie związków leczniczych bezpośrednio do zmienionych chorobowo komórek [3, 6]. Dzięki budowie i średnicy poniżej 100 nm nanocząstki stanowią nanosystem nośnikowy dla nowej generacji leków. Nanofarmakologia ma za zadanie modyfikowanie lub tworzenie nowych leków (nanoleki) tak, aby zwiększyć ich przenikalność, ograniczyć oporność komórkową, a także efekty uboczne. Ma to szczególne znaczenie w onkologii, w której zmieniona nowotworowo komórka ma zdolność do eliminowania wielu leków z jej wnętrza [6].

Zainteresowanie nanotechnologią w okresie ostatnich 10 lat znacznie wzrosło i praktycznie wszystkie znaczące kraje prowadzą w tym zakresie badania. Komisja Europejska w latach 2007-2013 przeznaczyła 3.5 mld euro na badania związane z nanotechnologią. Z 231 programów technologicznych utworzonych na szczelbu europejskim dwa są dedykowane wyłącznie nanoelektronice i nanomedycynie [24]:

- Nanotechnologies for Medical Application / NanoMedicine/,
- European Nanoelectronics Initiative Advisory Council /ENIAC/.

Niektóre produkty na bazie nanotechnologii tzw. nano-related products są już dostępne na rynku. Ostatnie badania w USA informują o występowaniu około 800 nano-related products. Rynek tych produktów w 2007 r. oceniany jest na około 147 mld dol. a w 2008 r. na 310 mld. dol. Dużą część tych produktów stanowi nanoelektronika, lecz dostępne są produkty ogólnego zastosowania, np. kosmetyki, artykuły sportowe, ubrania, farby. Nie można również zapomnieć o produktach z dziedziny pręźnie rozwijającej się nanomedycyny [24].

Według amerykańskiej organizacji Woodrow Wilson Institute na światowym rynku znajduje się ponad 1000 nanoproductów - dane z 25 czerwca 2009 r. Poniższy wykres ilustruje ewolucję liczby nanoproductów na światowym rynku od 2005 r. do 2009 r. Stany Zjednoczone stanowią obecnie awangardę w dziedzinie badań na-

notechnologicznych, co uwidacznia się tym, że prawie 2/3 patentów z dziedziny nanotechnologii z lat 1995-2007 pochodzi z tego kraju [24].

Nanomolekuły wykorzystywane w medycynie

Do najpopularniejszych nanostruktur, które znalazły zastosowanie w medycynie i nie tylko zaliczamy:

1. Nanorurki węglowe - struktury mające kształt cylindra otwartego lub zamkniętego z jednej lub z dwóch stron, który zbudowany jest ze zwiniętych płaszczyzn grafenowych. Wśród nanorurek wyróżnia się jednościenne, czyli te zbudowane z jednej warstwy grafenowej o średnicy od 1 do 2 nm oraz wielościenne mające średnicę od 2 do 25 nm, składające się z licznych cylindrów ułożonych koncentrycznie i oddalonych od siebie o 0,36 nm [12]. Cechuje je duża wytrzymałość mechaniczna na rozciąganie oraz bardzo wysokie przewodnictwo cieplne. Struktury te mogą być wykorzystywane jako nośniki leków, do niszczenia wybranych komórek, np. mikroorganizmów, a w przyszłości może także w terapii fotodynamicznej [13].

2. Fulereny to cała gama struktur o ogólnym wzorze C_{2n} , gdzie $n > 16$, w których atomy węgla znajdują się wyłącznie na powierzchni bryły. Do największych i najciekawszych związków tej rodziny należy zbudowany z 60 atomów węgla fuleren C_{60} . Ma on kształt ściętego dwudziestosiścianu foremnego, składającego się z 20 ścian sześciokątnych i 12 ścian pięciokątnych. Fulereny z umieszczonym we wnętrzu atomem metalu to tzw. metalofulereny endohedralne, które znajdują zastosowanie w diagnostyce obrazowej jako środek kontrastowy. Budowa tych nanostruktur sprawia, że świetnie nadają się też do transportu leków [12]. Hydroksylowe pochodne fulerenów to tzw. fulerenoale. Są one znakomitymi antyoksydantami i mogą być wykorzystane w terapii chorób degeneracyjnych, związanych z nadprodukcją reaktywnych form tlenu (np. w chorobie Parkinsona, Alzheimerza czy Lou Gehriga) [14].

3. Dendrymery należą do cząsteczek trójwymiarowych, silnie rozgałęzionych, które powstały w wyniku polimeryzacji. Możliwość ustalenia liczby i rodzaju grup funkcyjnych znajdujących się na końcach dendrymerów oraz zaplanowania rodzaju rdzenia sprawiają, że struktury te mogą mieć bardzo szerokie zastosowanie w medycynie, m.in. jako nośniki leków, genów oraz w terapii nowotworów [15].

4. Liposomy - są kulistymi strukturami, które mogą być zbudowane z jednej lub wielu dwuwarstw lipidowych ułożonych koncentrycznie. Wewnątrz liposomu można umieścić roztwór lub zawiesinę różnych substancji. [16]. Struktury te można zbudować z obojętnych dla organizmu i występujących w nim naturalnie lipidów, tj. fosfolipidów i cholesterolu. Dzięki właściwościom przenikania przez dwuwarstwę lipidową i błonę komórkową liposomy mogą być wykorzy-

Nanocząsteczki	Cel biologiczny	Ligand	Nowotwór
SPIO	CEA	przeciwciało anti-CEA	rak okrężnicy (mysz)
MION	antygen powierzchniowy	przeciwciało monoklonalne L6	guz wewnątrzczaszkowy LX-1 (szczur)
USPIO	receptor dla transferyny	transferyna	rak piersi (szczur)
CLIO	antygen uMUC-1	peptyd EPPT1	linie komórkowe raka piersi, jelita grubego, trzustki i płuc oraz model myszy różnych nowotworów
Ferumoxides (SPIO)	antygen komórek raka okrężnicy	przeciwciało monoklonalne A7	rak okrężnicy (mysz)
nanokrystaliny tlenku żelaza (Fe ₃ O ₄)	receptor Her-2/ <i>neu</i>	herceptyna	NIH3T6.7 (model myszy wszczepienny)
CLIO	receptor dla bombesyny	peptydy bombesyny (<i>bombesin peptides</i>)	PDAC (mysz)
SPIO kapsułkowany z czynnikiem fotodynamicznym	powierzchniowe antygeny naczyń guza	peptyd F3	glejak (szczur)
SPIO	receptor LHRH	LHRH	linie komórkowe oraz wszczepienny guz piersi (mysz)
USPIO	antygen powierzchniowy CD20	przeciwciało monoklonalne anti-CD20	chłoniak Burkitta (mysz)
SPIO	surowicze białka krzepnięcia	peptyd CREKA	wszczepienny guz piersi (mysz)
USPIO	integryna $\alpha\beta 3$	peptyd RGD	rak naskórkowy (mysz)
MEIO	receptor Her-2/ <i>neu</i>	herceptyna	NIH3T6.7 (model myszy wszczepienny)
CLIO	gen <i>Birc5</i> kodujący surwiwinę	siRNA (<i>siSurvivin</i>)	gruczolakorak jelita grubego (mysz)
PEG-SPIO	receptor dla kwasu foliowego	kwas foliowy	linia komórkowa ludzkiego nabłonkowego nowotworu wargi
Dekstran-IO	receptor Her-2/ <i>neu</i>	Trastuzumab (humanizowane przeciwciało monoklonalne)	mysi model z nadekspresją receptora Her-2/ <i>neu</i>
PEG-IO	MMP-2	chlorotoksyna	glejak (szczur)
CLIO	hepsyna (<i>hepsin</i>)	peptyd IPLVVPL	rak prostaty (mysz)
CLIO	integryna plectyna-1 (<i>plectin-1</i>)	peptyd PTP	PDAC (mysz)
SPIO	receptor EGFR	fragment przeciwciała anti-EGFR	wszczepienne guzy trzustki i nerek (mysz)

SPIO (ang. superparamagnetic iron oxide); MION (ang. monocrystalline iron oxide nanoparticles); USPIO (ang. ultrasmall superparamagnetic iron oxide); CLIO (ang. cross-linked iron oxide); MEIO (ang. magnetism-engineered iron oxide); PEG-IO (ang. poly(ethylene glycol)-magnetic iron oxide); PEG-SPIO (ang. poly(ethylene glycol)-superparamagnetic iron oxide); CEA (ang. carcinoembryonic); uMUC-1 (ang. underglycosylated mucin-1); PDAC (ang. pancreatic ductal adenocarcinoma); LHRH (ang. liberyna uwalniająca hormon luteinizujący); MMP-2 (ang. membrane-bound matrix metallo proteinase-2); EGFR (ang. epidermal growth factor receptor).

Tab.1 Testowane in vivo i in vitro ION z przeznaczeniem do celowanej diagnostyki onkologicznej [49].

stywane jako transportery chemioterapeutyków [12], a także genów [2].

5. Nanopory, to nanostruktury gwarantujące selektywne przechodzenie cząsteczek o określonych rozmiarach. Struktury te stwarzają możliwość, np. nowego sposobu leczenia cukrzycy insulinozależnej. Materiał mający nanopory wykorzystuje się do upakowania komórek trzustki dawcy i wszczepienia ich biorcy. Przeszczepiona tkanka jest niewykrywalna dla układu odpornościowego, a jednocześnie nanopory pozwalają na zaopatrywanie tkanki w składniki odżywcze [12]. Nanopory mogą również być wykorzystywane do bardzo dokładnego i wydajnego sekwencjonowania DNA [17].

Nanotechnologia w medycynie

Zastosowanie nanotechnologii w diagnostyce

Rozwój nanodiagnostyki koncentruje się przede wszystkim na opracowaniu metod rozpoznawania chorób w możliwie najwcześniejszej fazie rozwoju [12]. Najlepiej, gdyby było możliwe wykrycie choroby na poziomie pojedynczej komórki. Nanotechnologia-on-a-chip jest rodzajem technologii *in vitro* (ang. *lab-on-a-chip*) [1]. Zastosowanie nanocząstek w roli wskaźnika lub znacznika w testach biologicznych, wykazujących obecność lub aktywność wybranych substancji sprawia, że pomiary stają się szybsze i bardziej czułe. Do znakowania molekuł, struktur lub mikroorganizmów używa się magnetycznych nanocząstek połączonych z odpowiednimi przeciwciałami. Przyszłością nanodiagnostyki wydają się być biosensory. Są one zbudowane z dwóch typów elementów: biologicznego i fizycznego, zwanego inaczej przetwornikiem. Część biologiczną bioczułnika tworzą: naturalne przeciwciała lub antygeny, enzymy, kwasy nukleinowe, syntetyczne receptory wykonane z materiałów biometrycznych. Przetworniki to czujniki optyczne (wykorzystujące takie zjawiska, jak np. fluorescencja, polaryzacja, absorpcja, luminescencja), elektrochemiczne (konduktometryczne, amperometryczne, potencjometryczne), czujniki wrażliwe na zmianę masy lub czujniki z detekcją termiczną. Składnikami czujników biologicznych mogą być niektóre rodzaje nanocząstek, np. nanorurki węglowe, nanocząstki krzemowe, kropki kwantowe. Optyczne nanosensory wykorzystujące jednocześnie nanorurki węglowe mogą być wykorzystane np. do bieżącego kontrolowania stężenia glukozy u chorych na cukrzycę typu 1. Zastosowanie biosensorów w diagnostyce stwarza też możliwości wczesnego wykrycia markerów niektórych chorób w płynach ustrojowych. Opracowano np. oparty na nanocząstkach test paskowy (ang. *nanoparticle-based biobarcode assay*) służący do pomiaru w płynie mózgowo-rdzeniowym stężenia pochodnej β -amyloidu jako markera choroby Alzheimera. Test ten pozwala wykryć

u chorych już 50 cząsteczek pochodnej β -amyloidu, podczas gdy będący w powszechnym użyciu test immunologiczny (ELISA) umożliwia wykrycie β -amyloidu tylko w tkance mózgowej, gdzie jest go znacznie więcej [18]. Nanocząsteczki znalazły również zastosowanie w diagnostyce oraz obrazowaniu *in vivo*, jako kontrasty ION (ang. *iron oxide nanoparticles*), które stanowią nową generację nośników przeznaczonych do nowotworowo-specyficznego obrazowania metodą MRI. Magnetyczny ION jest dużo bardziej efektywny niż Gd-DTPA, ponieważ możliwa jest modyfikacja jego właściwości magnetycznych poprzez zmianę wielkości krystalitowego rdzenia i zastosowanie specjalnych powłok okrywających ION [43]. Ponadto magnetyczny ION charakteryzuje się długim czasem retencji we krwi, jest biodegradowalny oraz ma niską toksyczność [44, 45-48]. Poniższa tabela przedstawia różnego rodzaju ION z przeznaczeniem do celowanej diagnostyki onkologicznej.

Dzięki nowatorskim rozwiązaniom można znacznie dokładniej zlokalizować nowotwór, między innymi śródoperacyjnie guz mózgu. Jak dotąd głównym problemem był stosunkowo krótki czas nie tylko krążenia nanocząsteczek, ale ich czas półtrwania w masie guza. W prezentacji nowej konstrukcji biocząsteczka swobodnie przekracza barierę krew-mózg, a dodatkowo dołączono do niej światłoczuły komponent umożliwiający lokalizację guza w trakcie operacji neurochirurgicznej. Ma to szczególnie znaczenie w guzach izomorficznych i zlokalizowanych w pobliżu ośrodków korowych i dróg nerwowych. Wcześniej promowana metoda "kortyko" i "traktografii" niestety miała zasadniczą wadę związaną z tzw. przemieszczeniem struktur mózgu w trakcie zabiegu [24].

Nanoterapia oparta na celowanym dostarczaniu leków

Dużym problemem w stosowaniu obecnych terapii jest brak możliwości precyzyjnego dostarczenia leku w pożądane miejsce, czego rezultatem jest oddziaływanie leku na cały organizm. Niezbędne staje się więc stosowanie dawek leku większych niż w rzeczywistości jest to konieczne, co może powodować wiele niepożądanych efektów, w tym śmierć zdrowych komórek [17]. Zastosowanie nanotechnologii nie ogranicza się jedynie do rozwoju i projektowania nowych leków, ale również umożliwia poprawę bezpieczeństwa i skuteczności leków stosowanych od lat [25, 26]. Badania nad tego typu nośnikami prowadzone są od ponad 30 lat. Dzięki temu dostępne już są preparaty zawierające tę zaawansowaną technologię [27, 28]. Korzystając z osiągnięć nanotechnologii możemy z dużą precyzją dostarczyć lek w wyznaczone miejsce, co sprawia, że działa on skuteczniej, a wystąpienie skutków niepożądanych zostaje znacznie ograni-

czony [20]. Dużym wyzwaniem jest też poprawa stabilności leku, zwiększenie jego wchłaniania i zwiększenie stężenia w tkance docelowej [2]. Takie działania pozwalają na zmniejszenie dawek stosowanych farmaceutyków i obniżenie kosztów terapii [1]. Idealny system celowanego dostarczania leków musi zapewnić dotarcie leku dokładnie do celu i kontrolę jego uwalniania. Obecnie wyróżnia się trzy rodzaje systemów dostarczania leków:

- system pierwszej generacji - to mikrokapsułki i mikrosfery używane do kontroli chemoembolizacji oraz uwalniania protein i peptydów; rzadko stosowane z powodu konieczności wprowadzenia nanocząsteczek blisko miejsca przeznaczenia,

- systemy drugiej generacji, do której należą nośniki o średnicy mniejszej od 1 nm (liposomy, nanokapsułki i nanosfery zwane biernymi nośnikami koloidowymi); przenoszą one zawartość i uwalniają ją po otrzymaniu określonego sygnału, którym może być zmiana temperatury w przypadku liposomów wrażliwych na temperaturę lub pole magnetyczne dla nanosfer magnetycznych; są szybko usuwane z krwioobiegu przez komórki fagocytarne i nie mogą przechodzić przez śródbłonek kapilarny, co ogranicza ich zastosowanie,

- systemy trzeciej generacji - to nośniki drugiej generacji sprzężone z przeciwciałami monoklonalnymi, charakteryzującymi się zdolnością do specyficznego rozpoznawania wybranych struktur [21].

Nanocząsteczki nieorganiczne (ceramiczne) zbudowane ze związków nieorganicznych, najczęściej z tlenków i siarczków metali, tworzą struktury o różnych wielkościach, najczęściej niewielkich ok. 50 nm i różnej porowatości. Materiały te są biokompatybilne, a ich powierzchnia może być stosunkowo łatwo modyfikowana przez wiązanie z przeciwciałami monoklonalnymi. Małe rozmiary pozwalają uniknąć wychwytu przez układ siateczkowo-śródbłonkowy (RES) [25]. Mogą one skutecznie chronić związek biologicznie aktywny przed czynnikami zewnętrznymi, ponieważ same nie zmieniają swoich właściwości fizyko-chemicznych pod wpływem czynników zewnętrznych tj. np. pH, temperatury. Ich porowata struktura pozwala na wykorzystanie ich w terapii fotodynamicznej, gdzie czynnikiem aktywnym jest uwalniany tlen singletowy. Pory w nanocząsteczkach ceramicznych pozwalają na uwalnianie jedynie cząsteczki tlenu, cząsteczka będąca donorem tego tlenu pozostaje wewnątrz nanocząstki - zmniejsza to w znaczny sposób efekty toksyczne [25,27].

Obecnie nanonośniki znajdują się głównie w preparatach rynkowych do podania parenteralnego, ale trwają nieprzerwane badania nad wykorzystaniem nanotechnologii w podaniu doustnym, wziewnym, śródskórnym i do oka. Dla leków oftalmicznych nanocząstki muszą charakteryzować się biodegradowalnością, przezierno-

ścią oraz odpowiednią przyczepnością [29]. Przy zastosowaniu nanocząstek obserwuje się przedłużone uwalnianie, a także poprawioną biodostępność w przypadku stosowania takich leków jak piroksikam, indometacyna, dexametazon, triamcinolon i flurbiprofen [30,32]. Badania nad postaciami podawanymi bezpośrednio na gałkę oczną są na razie na etapie laboratoryjnym i wymagają dalszych badań *in vivo* i badań klinicznych. Przy podaniu doustnym na biodostępność wpływają głównie rozpuszczalność i wchłanianie. Te kluczowe czynniki mogą być poprawione poprzez zastosowanie nośników nanocząsteczkowych. Głównymi polimerami wykorzystywanymi w podaniu doustnym są PLA, PGA, PLGA i PCA [29, 31]. Najczęściej stosuje się nanocząstki (ze względu na ich większą stabilność w przewodzie pokarmowym w porównaniu z innymi nośnikami) oraz micelle polimerowe. Zaletami zastosowania nanocząstek jako nośników w doustnych postaciach leku jest ochrona substancji leczniczej przed szkodliwym działaniem soków trawiennych, przedłużony czas bytowania w jelicie wynikający z bioadhezji, endocytoza nanocząstek. Enkapsulacja polimerami jest szczególnie wykorzystywana w przypadku leków trudno rozpuszczalnych, ale także dla białek i peptydów [32]. Wiele badań jest wykonywanych w celu opracowania doustnego systemu zawierającego insulinę. Zastosowanie miceli polimerowych w doustnych postaciach leku ogranicza się w zasadzie do leków trudno rozpuszczalnych [31].

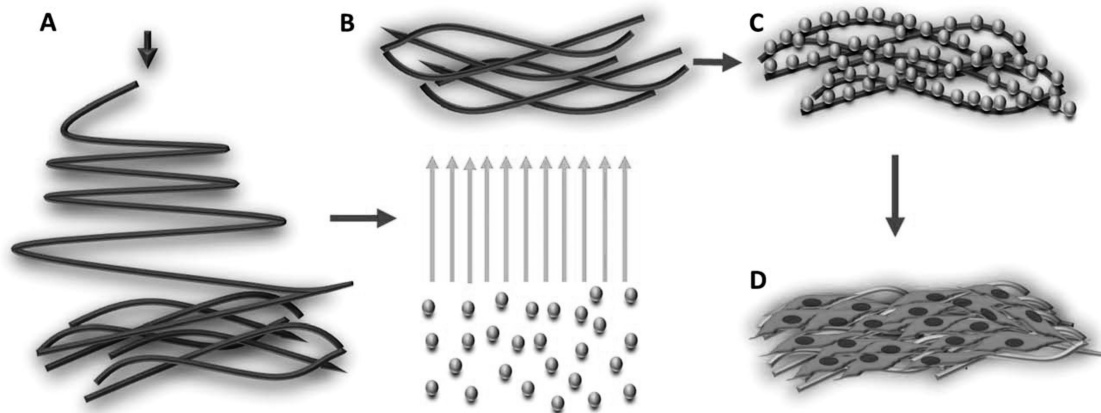
Inżynieria tkankowa i medycyna regeneracyjna

Inżynieria tkankowa jest dziedziną wykorzystującą wiedzę z zakresu inżynierii materiałowej oraz medycyny i nauk pokrewnych do opracowania „biologicznych zamienników” uszkodzonych tkanek [22]. Modyfikacje powierzchni biomateriałów na poziomie nanometrów pozwalają na poprawę kompatybilności biologicznej komórek i implantu. Wyraża się to w lepszej przyczepności komórek, proliferacji i efektywniejszym ich rozprzestrzenianiu się [12]. Są one zwykle tak zaprojektowane, aby stymulowały procesy regeneracji tkanek na poziomie molekularnym, wzmacniały podziały komórek w najbliższym sąsiedztwie, wpływały na ich różnicowanie i organizację macierzy pozakomórkowej. Sekwencja sygnalizacyjna bioaktywnych cząstek, uruchamiająca proces na poziomie molekularnym, jest niezbędna do wytwarzania i naprawy tkanek [1]. Trwające obecnie badania ukierunkowane są na skuteczne wykorzystanie w inżynierii tkankowej potencjału samo naprawczego zaobserwowanego w komórkach macierzystych. Wielkim sukcesem będzie opracowanie sposobu implantacji bezkomórkowej, w której inteligentne biomateriały będą skutecznie dostarczać sygnały pobu-

dzające potencjał samoleczenia poprzez stymulację własnych komórek macierzystych [1]. Coraz bardziej powszechne staje się zastosowanie nanomolekuł do śledzenia przeszczepionych komórek np. komórek macierzystych, które mają posłużyć w regeneracji uszkodzonego fragmentu tkanki czy organu. Między innymi takie badania są wykonywane w The Johns Hopkins University School of Medicine (Baltimore, USA), gdzie badane jest zastosowanie tlenku żelaza w transporcie neuronalnych komórek macierzystych [19]. Podobne badania przeprowadzili naukowcy z Emory University School of Medicine, którzy badają możliwość użycia magnesów do kierowania komórkami macierzystymi naładowanymi namagnesowanymi nanocząstkami tlenku żelaza [33]. Pozwoli to na przenoszenie tych komórek do dowolnego miejsca w organizmie i leczenie różnych schorzeń, głównie chorób układu krążenia i chorób serca. Częsteczki powleczone są nietoksycznym glikolem polietylenowym, który nie ma szkodliwego wpływu na żywotność komórek, a co ważniejsze nie powoduje żadnych zmian ich właściwości, jak zdolność do dyferencjacji [33]. Testy wykonane na myszach wykazały, że można skierować odpo-

wiednią ilość komórek macierzystych do miejsc, które dotąd były dla nich trudno dostępne. Zazwyczaj bowiem mezenchymalne komórki macierzyste miały tendencję do gromadzenia się głównie w wątrobie lub płucach. Naukowcy twierdzą, że będą w stanie przenosić komórki do każdej tkanki wymagającej regeneracji, np. wadliwego naczynia krwionośnego czy nawet serca [33].

Innym przykładem zastosowania nanotechnologii w medycynie regeneracyjnej są badania naukowców z Uniwersytetu Tel -Aviv, którzy badają możliwość wykorzystania nanowłókien wykonanych ze złota do regeneracji tkanki mięśnia sercowego. Zespół stwierdził, że rolę złączy elektrycznych mogą przejąć złote nanowłókna, do czasu wyprodukowania przez komórki swych własnych złączy. Nanowłókna są zespalone z rusztowaniami wykonanymi z biomateriałów, na bazie których tworzy się nową tkankę. Przeprowadzone testy wykazały, że nanocząstki złota poprawiają znacząco sygnalizację elektryczną między komórkami serca, a tym samym usprawniają funkcjonowanie tkanek mięśnia sercowego przeznaczonych do transplantacji [34].



Rys.1 Schemat doświadczenia: (A) rusztowanie wykonane z PCL. (B,C) opłaszczanie rusztowania AgNPs w celu utworzenia nanokompozytu. (D) wysianie komórek serca w celu otrzymania funkcjonalnej tkanki [51].

Terapia nowotworowa

Nowsze terapie nowotworowe wykorzystujące nanotechnologię mają przewagę nad konwencjonalnymi metodami leczenia, gdyż często łączą w sobie więcej niż jedną funkcję (np. równoczesna diagnostyka i terapia) [22], a dla powodzenia leczenia istotne znaczenie ma właśnie wczesna diagnostyka. Stosowane w tym celu nanodrut, charakteryzują się dużą wybiórczością i selektywnością działania. Mogą zostać pokryte cząsteczkami wykrywającymi specyficzne białka lub sekwencje RNA, tj. przeciwciałami lub oligonukleotydami. Przyłączenie protein do nanodrutów powoduje zmianę elektrycznej przewodności czynnej, która mierzona jest przez odpowiedni

detektor. W ten sposób możliwe jest wczesne wykrycie białek wytwarzanych przez komórki rakowe [22]. Kropki kwantowe, które emitują światło, np. po ekspozycji na światło UV, wstrzyknięte pacjentowi przed operacją usunięcia guza, przesączają się do guza i uwiadczenia go ułatwiając tym samym pracę chirurgowi [5]. Do leczenia nowotworów wykorzystuje się nanocząstki, takie jak: dendrymery, liposomy i nanocząstki ceramiczne, jako wycelowane nośniki leków zdolne transportować chemioterapeutyki lub lecznicze geny. Tym samym minimalizuje się problem toksyczności leków i zwiększa wydajność ich dostarczania do patologicznie zmienionych komórek [22]. Nanocząstki magnetyczne, tj. żelazo lub jego tlenki, pozwala-

ją wykrywać i równocześnie niszczyć komórki nowotworowe, oszczędzając przy tym komórki prawidłowe. Nanocząstki magnetyczne wykorzystuje się jako czynnik kontrastowy w badaniu za pomocą rezonansu magnetycznego, a jeśli guz zostanie wykryty zwiększa się moc aparatu, co spowoduje zwiększenie temperatury cząstek kontrastu i zniszczenie komórek nowotworowych. Na podobnej zasadzie oparta jest terapia magnetodynamiczna, jednak tu czynnikiem powodującym zwiększenie temperatury nanocząstek magnetycznych są fale radiowe [23]. W nieinwazyjnej terapii fototermicznej wykorzystywane są również nanomuszelki powodujące wybiórczą destrukcję guza. Nanomuszelki pokryte warstwą złota mają zdolność absorpcji światła z bliskiej podczerwieni, które stosunkowo łatwo penetruje tkankę. Rozpoznawanie komórek nowotworowych jest możliwe dzięki przyłączonemu do nanomuszelki antygenom, a ich niszczenie, dzięki ciepłu powstającemu po zaabsorbowaniu światła. Zaobserwowano, że zwiększenie temperatury w komórkach potraktowanych przez nanomuszelki wynosi 40°C, podczas gdy samo naświetlanie światłem bliskiej podczerwieni (ang. near infrared, NIR) powoduje wzrost tylko o 10°C [22]. Naukowcy z Uniwersytetu w Granadzie i Edynburgu opracowali nową metodę leczenia raka bazującą na nanotechnologii. Może ona znacząco ulepszyć chemioterapię, ponieważ nie powoduje żadnych skutków ubocznych. Owa terapia opiera się na zamknięciu palladu jako katalizatora w mikrosferze, co umożliwia aktywację leku wewnątrz komórki ludzkiej, unikając w ten sposób toksycznego działania medykamentu. Pallad nie jest pierwiastkiem, który naturalnie występuje w naszym organizmie, ale mimo to może być katalizatorem różnych reakcji chemicznych zachodzących wewnątrz komórki, nie powodując żadnych zmian w jej podstawowym funkcjonowaniu. Jest to coś tak nieinwazyjnego jak synteza białek, czy też metabolizm. Pozwala na stworzenie wewnątrz komórki swoistego środka antyrakowego, który może zostać użyty do leczenia nowotworów i zarazem mógłby znacząco ulepszyć obecnie stosowane metody [35].

Nanokosmetologia

Obecny rynek kosmologiczny pełen jest innowacyjnych rozwiązań. W ofercie pojawiają się kosmetyki oparte na naturalnych składnikach, np. algach, wyciągach z ziół, słuźwie ślimaka czy nawet jadzie węża. Jednak prawdziwa rewolucja dokonuje się za pośrednictwem nanotechnologii. Badania „Kosmetyki XXI wieku - nanokosmetyki” opublikowane w najnowszym numerze *Polish Journal of Cosmetology* wskazują, że największym zainteresowaniem wśród ankietowanych cieszą się nanokosmetyki, takie jak kremy zawierające nanokapsułki, w których zamknięte są substan-

cje aktywne [41]. Kosmetyki oparte na nanocząsteczkach wykazują wyjątkowo duży potencjał zastosowania. Związane jest to głównie z pokonaniem największej dotychczasowej bariery jaką była skóra, która nie przepuszcza dużych cząstek substancji aktywnych z kosmetyków. Właśnie dlatego nanokosmetyki, dzięki małym cząsteczkom wody, są najlepszym rozwiązaniem w kwestii pielęgnacji skóry. Technologiczna obróbka wody nadaje substancji zupełnie nowych właściwości oraz zwiększa potencjał jej zastosowania [36]. Dzięki wykorzystaniu najnowszych technologii rozbija się duże skupiska agregatów wody, które prowadzą do powstania niewielkich, uporządkowanych klastrów. Skupione w nich pojedyncze cząsteczki wody charakteryzują się niezwykle małą średnicą, oscylującą w granicach 1 nanometra [37]. W wodzie rozbitej do tej wielkości dodatkowo rozpuszczane mogą być substancje aktywne. Stąd też pochodzi NANO AQUA+ czyli nanowoda, która dzięki swoim rozmiarom, po raz pierwszy na świecie pozwoliła skórze na niemal całkowite wchłonięcie substancji aktywnych i odżywczych, wzmacniając i pielęgnując skórę z nieporównywalnie lepszym skutkiem. Oprócz nanosuwrowców w preparatach kosmetycznych coraz częściej można spotkać także nanokapsułki, określane mianem nanonośników lub promotorów przenikania substancji aktywnych [37,38]. Zamknięte w nich surowce mogą być dostarczane w konkretne miejsca i tam stopniowo uwalniane. Jest to o tyle istotne, iż o właściwościach kosmetyku często decyduje nie tylko zawartość związków biologicznie aktywnych, ale także możliwość ich efektywnego wykorzystania, która w dużej mierze uwarunkowana jest ich zdolnością penetracyjną w głąb skóry [36, 39]. Kiedy duża część zawartych w preparacie składników biologicznie czynnych pozostaje na jej powierzchni, ich stężenie w głębszych warstwach skóry jest zbyt małe aby można było osiągnąć jakiegokolwiek efekty kosmetyczne. Tylko nieliczne związki aktywne charakteryzują się bowiem efektywnym działaniem na powierzchni skóry. Należą do nich między innymi filtry promieniochronne [39]. Z tego też powodu, nieustannie poszukuje się nowych systemów nośnych, których zadaniem jest pokonanie bariery warstwy lipidowej naskórka i umieszczenie przenoszonych substancji aktywnych w miejscu, gdzie mogą być one w kontrolowany sposób uwalniane. Dla osiągnięcia zamierzonego efektu kosmetycznego niezbędne jest nie tylko dotarcie substancji biologicznie aktywnej do jej określonej warstwy ale także pozostanie jej tam przez określony czas [38, 39, 40]. Podstawowa rola w tworzeniu nośników związana jest z zamknięciem aktywnych składników kosmetycznych w otoczkę naturalnych, biodostępnych, biodegradowalnych materiałów. Działanie to ma na celu nie tylko bardziej efektywne ich wykorzystanie, ale także ich przestrzenna i czasowa dystrybucja w tkankach

skóry. Tego typu kapsułki stosuje się także w celu ochrony zamykanych substancji między innymi przed szkodliwym działaniem czynników zewnętrznych (np. tlen, wilgoć) [40]. Powszechnie stosowane w kosmetologii jest złoto nanokoloidalne, które może przyczyniać się do syntezy kolagenu oraz rekonstrukcji tkanki skórnej. Ponadto działa w sposób kojący oraz posiada właściwości antybakteryjne. Niejonowy koloid złota można zewnętrznie stosować w celu przeciwdziałania i zmniejszania już istniejących zmarszczek, wspomaganie leczenia ropni, liszajów, przewlekłych wysypek i trądzików. W medycynie złoto wykorzystywane jest przede wszystkim przy wspomaganiu leczenia rozległych oparzeń, gdyż działa przeciwwzapalnie [40, 41].

Piśmiennictwo:

[1] Gupta J. Nanotechnology applications in medicine and dentistry. *J. Investig. Clin. Dent.*, 2011; 2: 81-88.
 [2] Sahoo S.K., Parveen S., Panda J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2007; 3: 20-31.
 [3] Jain K.K. Role of nanobiotechnology in the development of personalized medicine. *Nanomedicine* 2009; 4: 249-252.
 [4] Surendiran A., et. al. Novel applications of nanotechnology in medicine. *Indian J. Med. Res.*, 2009; 130: 689-701.
 [5] Singh M., Singh S., Prasad S. et al.: Nanotechnology In medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. *Dig. J. Nanomat. Biostruct.*, 2008; 3 (3): 115-122
 [6] Marchant G.E. Small is beautiful: what can nanotechnology do for personalized medicine? *Curr Pharmacogen Personalized Med*, 2009; 7: 231-237.
 [7] Solanki A, Kim J.D, Lee K.B. Nanotechnology for regenerative medicine: nanomaterials for stem cell imaging. *Nanomedicine*, 2008; 3: 567-578.
 [8] Ochekepe N.A., Olorunfemi P.O., Ngwuluka N.C.: Nanotechnology and drug delivery. Part 1: Background and Applications. *Trop. J. Pharmac. Res.*, 2009; 8 (3): 265-274.
 [9] Malinowska-Kapcia B., Sornek R., Poziemba A.: Nanotechnologia w praktyce. *Laboratorium*, 2008; 7-8: 19-20.
 [10] Silva G.A.: Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surg. Neurol.*, 2004; 61: 216-220.
 [11] Waszkiewicz - Robak B., Swiderski F.: Nanotechnologia – korzyści i zagrożenia zdrowotne. *Bromatol. Chem. Toksykol.*, 2008; 3: 202-208.
 [12] Surendiran A., Sandhya S., Pradhan S.C. et al.: Novel applications of nanotechnology in medicine. *Indian J. Med. Res.*, 2009; 130: 689-701.
 [13] Mielcarek J., Kruszyńska M., Sokołowski P.: Zastosowanie nanorekurek w medycynie. *Farmacja Pol.*, 2009; 65 (4): 251-254.
 [14] Grabowska J.: Fullereny – przyszłość zastosowań w medycynie i farmacji. *Gazeta Farmaceut.*, 2008; 6: 38-40.
 [15] Urbańczyk-Lipkowska Z.: Dendrymery w naukach biomedycznych. *Gazeta Farmaceut.*, 2008; 11: 34-36.
 [16] Maurer N., Fenske D.B., Cullis P.R.: Developments in liposomal drug delivery systems. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2001; 1 (6): 1-25.
 [17] Negda D., Rathore K.S., Bharkatiya M. et al.: Bucky balls: a novel drug delivery system. *J. Chem. Pharm. Res.*, 2010; 2(2): 240-248.
 [18] Jain K.K.: Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. *Clin. Chim. Acta.*, 2005; 358: 37-54.
 [19] Mirek Janowski et al.: Personalized nanomedicine advancements for stem cell tracking. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012 October; 64(13): 1488-1507.
 [20] Duggal D.: Role of nanotechnology in new drug delivery systems. *Int. J. Drug Dev. & Res.*, 2011; 3 (4): 4-8.
 [21] Kubik T., Bogunia-Kubik K., Sugisaka M.: Nanotechnology on duty in medical applications. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2005; 6: 17-33.
 [22] Zhang L., Webster T.J.: Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration. *Nano Today*, 2009; 4: 66-80.
 [22] Logothetidis S.: Nanotechnology in medicine: the medicine of tomorrow and nanomedicine. *Hippokratia*, 2006; 10 (1): 7-21
 [23] Jurczyk M.: Zastosowanie osiągnięć nanotechnologii w terapii nowotworowej. *Ginekol. Prakt.*, 2009; 3: 21-26.
 [24] Materialy z NANOTEC 2009 z Rzymu. *Documento Giornalisti*. www.corrierecomunicazioni.it. Artykuł: "Nanotec in Italia, il piatto piange" z 23.11.2011r.
 [25] Parveen S., et al. „ Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging, *Nanomedicine* (2011) article in press.
 [26] Nair H.B., „Delivery of antiinflammatory nutraceuticals by nanoparticles for the prevention and treatment of cancer
 [27] Faraji A.H., Wipf P., "Nanoparticles in cellular drug delivery" *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17 (2009) pp.2950-2962
 [28] Plapied L., et al. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery"

Podsumowanie

Prężnie rozwijająca się nanotechnologia oraz szerokie spektrum jej zastosowania w medycynie budzi ogromne nadzieje na przyszłość zarówno w zakresie diagnostyki jak i terapii wielu schorzeń. Stwarza ona szansę na szybsze i precyzyjne działania naprawy uszkodzonych narządów i tkanek. Rządy wielu krajów uznały tę dziedzinę nauki za strategiczną i wprowadziły ją do rządowych programów, których celem jest wspomaganie nowych i ważnych dla życia technologii. Stany Zjednoczone, Wielka Brytania, Niemcy i Japonia uznają w swoich programach rozwojowych udział nanotechnologii za priorytetowy.

Current Opinion in Colloid and Interfacial Science 16 (2011) pp 228-237.
 [29] Araujo J. et al. „nanomedicines for ocular NSAIDs: safety on drug delivery" *Nanomedicine* 5 (2009) pp349-401.
 [30] Plapied L., et al. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery" *Current Opinion in Colloid and Interfacial Science* 16 (2011) pp 228-237
 [31] Si-Shen F. et al. "Poly(lactide)-vitamin E derivative/montmorillonite nanoparticle formulations for the oral delivery of Docetaxel" *Biomaterials*, 30, 19,(2009) pp 3297-3306
 [32] Cevc G., Vierl U., "Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal" *Journal of Controlled Release*, 141, 3,(2010) pp 277-299
 [33] Landázuri N., et al.: Magnetic Targeting of Human Mesenchymal Stem Cells with Internalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Small*. 2013 Jun 13
 [34] Shevach M., et al.: Nanoengineering gold particle composite fibers for cardiac tissue engineering. *J. Mater. Chem. B*, 2013; 1, 5210
 [35] Rahimi M., et al.: Palladium-mediated intracellular chemistry. *Nature Chemistry*, 2011; 3:239-243
 [36] Waszkiewicz-Robak B., Swiderski F.: Nanotechnologia- korzyści i zagrożenia zdrowotne, *Bromat. Chem. Toksykol. XLI*, 2008.
 [37] C.C. Muller-Goymann, „Physicochemical characterization of colloidal drug delivery system such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration", *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004.
 [38] M. Sikora, „Nanokosmetyki w natarciu", *Plastics Review* 7/2007
 [39] K. Dong-Goon et al., „Retinol - encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles", *Int. J. Pharm.*, 2006; 319(1-2):130-8.
 [40] J. Pardeike, A. Hommoss, R. H. Muller, „Lipid nanoparticles (SLN, NLC) In cosmetics and pharmaceutical dermal products" *Int. J. Pharm.*, 2009; 366(1-2):170-84.
 [41] Chrzastek L, Dondela B.: Kosmetyki XXI wieku - nanokosmetyki. *Pol J Cosmetol*, 2009; 12(4): 283-288
 [42] Omid Veisheh, Conroy Sun, Chen Fang, et al. Resonance Imaging Nanoprobe across the Blood-Brain Specific Targeting of Brain Tumors with an Optical/Magnetic Barrier. *Cancer Res*, 2009;69:6200-6207
 [43] Rogers WJ, Basu P. Factors regulating macrophage endocytosis of nanoparticles: implications for targeted magnetic resonance plaque imaging. *Atherosclerosis* 2005; 178: 67-73.
 [44] Bradbury M, Hricak H. Molecular MR imaging in oncology. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 2005; 13: 225-40.
 [45] Harisinghani MG et al. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 2491-9.
 [46] Funovics MA et al. MR imaging of the her2/neu and 9.2.27 tumor antigens using immunospecific contrast agents. *Magn Reson Imaging* 2004; 22: 843-50.
 [47] Jain TK et al. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Mol Pharm* 2005; 2: 194-205.Montet X et al. Nanoparticle imaging of integrins on tumor cells. *Neoplasia* 2006; 8:214-22.
 [48] Muller RN et al. Relaxation by metal-containing nanosystems. *Adv Inorg Chem* 2005; 57: 239-92.
 [49] Na podstawie Molecular Imaging and Contrast Agent Database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/br.fcgi?book=micad>
 [50] Feynman R. There's Plenty of Room at the Bottom. *Engineering and Science* 1960.
 [51] <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2013/TB/c3tb20584c#divAbstract>

* Rys 1. umieszczona za zgodą wydawcy artykułu .

ZWIĄZKI FLAWONOIDOWE I ICH POCHODNE JAKO POTENCJALNE PRODUKTY O DZIAŁANIU LECZNICZYM

Edyta Bańcyr¹, Isaura Felcenloben¹, Edyta Kostrzewa-Susłow²

¹Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Katedra Immunologii, Patofizjologii i Prewencji Weterynaryjnej, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

²Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Chemii, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Streszczenie: Zainteresowanie związkami flawonoidowymi, sięga wczesnych lat 20-tych XX wieku. Pierwsze publikacje dotyczące wpływu związków flawonoidowych na zdrowie człowieka przedstawili w 1936 roku Rusznyak i Szent-Gyorgy, prezentując wyniki badań nad wpływem hesperydyny na szkorbut (Rusznyak i Szent-Gyorgy, 1936, Noroozi i wsp. 1998). Od tego czasu zainteresowanie związkami flawonoidowymi i ich pochodnymi rosło. W połowie XX wieku sklasyfikowano flawonoidy jako związki NSN czyli naturalne substancje nie odżywcze), które nie są syntetyzowane w komórkach ssaczych. Mimo to, dobroczynne działanie związków flawonoidowych znajduje potwierdzenie w szeregu badań prowadzonych na całym świecie.

W pracy przedstawiona została klasyfikacja związków flawonoidowych, zależność między budową pierścieni aromatycznych a właściwościami biologicznymi. Ponadto, zebrano najnowsze dane dotyczące wpływu związków flawonoidowych na leczenie takich chorób jak miażdżyca, AIDS, choroby sercowo-naczyniowe (Fuhrman i wsp. 2001, Veljkovic i wsp. 2007). W pracy uwzględniono również podstawowe reakcje biotransformacji, jakim mogą ulegać związki flawonoidowe, dzięki czemu nabywają nowych, biologicznych właściwości.

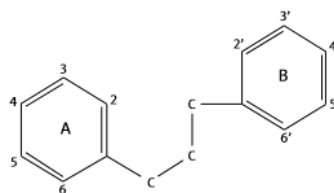
Wstęp

Początki zainteresowania związkami flawonoidowymi sięgają wczesnych lat 20-tych XX wieku. Pierwsze publikacje dotyczące wpływu związków flawonoidowych na zdrowie człowieka przedstawili w 1936 roku Rusznyak S, Szent-György, prezentując wyniki badań nad wpływem hesperydyny na szkorbut (Rusznyak S, Szent-György, 1936; Noroozi i wsp., 1998). Od tego czasu zainteresowanie związkami flawonoidowymi i ich pochodnymi stopniowo rosło. W połowie XX wieku sklasyfikowano flawonoidy jako związki NSN (Naturalne Substancje Nieodżywcze), które nie są syntetyzowane w komórkach ssaczych, przez co nie są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu.

Klasyfikacja związków flawonoidowych

Związki flawonoidowe zaliczane są do pochodnych fenylalaniny. Stanowią naturalny składnik metabolitów roślin, choć mogą być wytwarzane jako swoista odpowiedź na zaistniały stres środowiskowy. Flawonoidy zbudowane są z dwóch pierścieni aromatycznych, posiadających przynajmniej jedną grupę hydroksylową, oraz jednego heterocyklicznego. Ze względu na obecność różnych podstawników czy modyfikacje w pierścieniach dokonano podziału związków flawono-

idowych na podklasy (Beecher, 2003; Clifford, 2001). Pierścienie budujące związki flawonoidowe nazwano zwyczajowo pierścieniami A, B, C (ryc. 1).



Ryc. 1 Podstawowy wzór związków flawonoidowych

Ze względu na liczne modyfikacje w pierścieniu B, dokonano następującej klasyfikacji związków flawonoidowych (tabela 1) (Anonymous, 2003; Beecher, 2003). W obrębie każdej z klas związki różnią się między sobą położeniem podstawników, zwłaszcza grup hydroksylowych, metoksyłowych, acetylowych, sulfonowych czy glikozydowych.

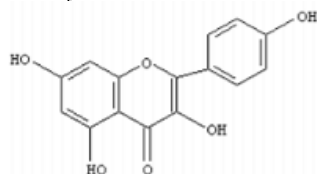
Budowa związków flawonoidowych a właściwości biologiczne

Silne właściwości prozdrowotne związki flawo-

Klasa związków flawonoidowych	Miejsce połączenia pierścieni B i C (pozycja w pierścieniu C)	Obecność wiązania podwójnego w pierścieniu C	Przykłady związków	Produkty spożywcze bogate w wymieniony związek
Flawanony	2	Brak	Hesperytyna	Owoce cytrusowe
Flawony	2	2-3	Apigenina	Seler, oliwki
Izoflawony	3	2-3	Genisteina	Soja, fasola, groch
Flawanole	2	Brak	(+)Katechina (+) Galloekatechina (-)Epikatechina	Czerwone wino, zielona herbata, kiwi
Flawonole	2	2-3	Kwercetyna, moryna, kemferol	Cebula, herbata, jabłko
Antocyjanidyny	2	1-2;3-4	Cyjanidyna, delfidyna	Czarna porzeczka, aronia
Chalkony	Beta	Brak	Luteina, ksantohumol	Jabłko, kora wierzby, piwo
Aurony	Beta	2	Sulfereina	Szczaw

Tabela 1. Klasyfikacja związków flawonoidowych

noidowe zawdzięczają charakterystycznym elementom budowy. Wiązanie podwójne występujące między atomami węgla w pierścieniu C silnie wzmacnia właściwości przeciwutleniające związków flawonoidowych. Sąsiedztwo grupy hydroksylowej i grupy karbonylowej (pierścień C) podwyższa zdolność chelatowania metali. Podobnie, umiejscowienie grup hydroksylowych w pozycjach 3' i 4' (pierścień B) czy obecność grupy hydroksylowej w pozycji C-5 (pierścień A) wzmacnia właściwości przeciwutleniające flawonoidów (ryc. 2). Co ważne, nie liczba a położenie grup hydroksylowych wpływa istotnie na zmianę właściwości związków.



Ryc. 2

Występowanie związków flawonoidowych. Rola flawonoidów u roślin.

Związki flawonoidowe izolowane są z surowców roślinnych. Praktycznie każda roślina syntetyzuje związek flawonoidowy o różnej aktywności biologicznej (Majewska i Czeczot, 2009). W środowisku naturalnym flawonoidy ulegają glikozytacji, przez co wraz ze wzrostem polarności powstałych związków możliwe jest ich przechowywanie w wakuolach komórek roślinnych. Źródłem flawonoidów o udowodnionych właściwościach biologicznych są przede wszystkim takie elementy roślinne jak korzeń tarczycy bajkalskiej, owoc ostropestu plamistego, ziele skrzypu, ziele dziurawca, kwiatostan i owoc głogu, kwiatostan lipy czy owoc miłorzębu japońskiego. Występujące w roślinach flawonoidy pełnią szereg istotnych właściwości, nadając

barwę kwiatom – od pomarańczowo-czerwonej (pelargonidyna), przez żółtą (np. gossypetyna), czerwoną (metylowane pochodne jak petunidyna, malwidyna), po białą (luteolina, apigenina). Flawonoidy wpływają również na walory smakowe roślin, np. naryngina nadaje charakterystyczny, gorzkawy posmak cytrusom. Istotną rolę odgrywa również nobiletyna, która występując na powierzchni liści zabezpiecza je przed chorobami grzybowymi.

Wpływ flawonoidów na organizm człowieka. Badania kliniczne i potencjalne zastosowanie w terapii

Flawonoidy dostarczane są do organizmu głównie z pożywieniem. Wg danych WHO największe ilości związków flawonoidowych spożywają mieszkańcy Japonii (68,2 mg/dzień). Co interesujące, społeczeństwa Europy zachodniej dostarczają średnio do 40 mg flawonoidów/dzień, zaś mieszkańcy Azji wschodniej nawet do 1,5 g/dzień, głównie ze względu na wysokie spożycie roślin strączkowych (Wiczowski i Piskula, 2004). Za główne źródło flawonoidów w diecie człowieka uważane są owoce (cytrusy, jabłko, jagody), warzywa (głównie cebula, brokuły), czerwone wino, herbata czy gorzka czekolada (Hoensch i Kirch, 2005).

Jak do tej pory udowodniono już szereg właściwości biologicznych związków flawonoidowych. Do najistotniejszych należą właściwości antywirusowe, przeciwpalne, przeciwcukrzycowe, przeciwartymiczne, antykancerogenne czy przeciwalergiczne (Aherne i O'Brien, 2002; Majewska i Czeczot, 2009). Steffen i wsp. (2005) wykazali, że flawonoidy skutecznie unieczynnijają NO, będący jednym z głównych związków powodujących o silne działanie prooksydacyjne na komórki organizmu. Wysokie stężenie NO uważane jest za jeden z prekursorów zmian miażdżycowych w organizmie. Flawonoidy unieczynnijają nadreaktywny NO i towarzyszące mu reaktywne formy tlenu (RFT), dzięki czemu zmniejszają stany zapalne i hamują rozwój zmian miażdżycowych. Co ważne, dzięki zmniejszeniu ilości RFT, flawonoidy chronią lipoproteiny osocza krwi (jak np. LDL) przed utlenieniem i powstaniem złożeń miażdżycowych (Valenzuela i wsp., 2003). Potwierdzono również wpływ takich związków jak bajkalina czy kwercetyna na hamowanie odwrotnej transkryptazy wirusa HIV, co stwarza możliwość wykorzystania związków flawonoidowych w terapii AIDS. Ponadto bajkalina hamuje aktywność białka Vpr oraz hamuje namnażanie się wirusa (Veljkovic V. i wsp., 2007).

Związki flawonoidowe oraz ich pochodne coraz częściej wykorzystywane są w leczeniu chorób nowotworowych. Potwierdzone jest ich silne działanie antykancerogenne, wynikające głównie ze zdolności do modulowania struktury enzy-

mów i zmian reaktywności receptorów. Kwercetyna wykazuje silne zdolności do hamowania nowotworów okrężnicy, płuc, piersi oraz jajników (Arts i Hollman, 2005). Przypuszcza się, że związki flawonoidowe mogą wpływać na aktywność polimerazy DNA i czynników transkrypcyjnych.

Niezwykle silna aktywność przeciwutleniająca uwarunkowana jest budową pierścieniową. Działanie antyoksydacyjne oparte jest na reakcji zmiatania wolnych rodników lub dysmutacji i wygaszaniu ich do związków o mniejszej reaktywności. Co ważne, silne właściwości oxy-red wpływają hamująco na agregację płytek krwi, poprzez hamowanie reakcji utleniania lipidów. Aktywność przeciwutleniająca wykorzystywana jest szeroko w kosmetologii. Związki flawonoidowe wykorzystywane są jako składniki odtwarzające barierę ochronną skóry, polepszające nawilżenie, obniżające zaczerwienienie. Działają ściągająco, przez co wykorzystywane są w leczeniu łuszczycy czy łojotoku (Hodgson i Croft, 2010).

Związki flawonoidowe wykazują również stosunkowo silne działanie estrogenne. Pojawiło się

wiele prac obrazujących wpływ daidzeiny czy genisteiny na gospodarkę hormonalną. Genisteina izolowana jest obecnie głównie z soi i janowca barwierskiego. Genisteina, wykazująca silne powinowactwo do receptora estrogenowego, uznawana jest za potencjalny środek w leczeniu menopauzy. Badania kliniczne dowiodły, że w grupie kobiet dotkniętych przedwczesną menopauzą uciążliwe dolegliwości (uderzenia gorąca, duszności) obniżyły się po zastosowaniu terapii wzbogaconej w genisteinę.

Podsumowanie

Związki flawonoidowe stają się coraz popularniejszymi dodatkami do leków czy kosmetyków. Potencjalne wykorzystanie w medycynie staje się coraz większe, przede wszystkim dzięki coraz lepszemu poznaniu mechanizmów rządzących ich przemianami. Zapewne wiele aspektów oddziaływania flawonoidów nadal jest niezbadanych, jednak pewne jest, że związki flawonoidowe mają szansę zrewolucjonizować współczesne metody leczenia wielu chorób.

Piśmiennictwo:

- [1] Aherne S.A., O'Brien N.M. 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 2002, 18, 1, 75-81.
- [2] Anonymous A. 2003 USDA database for the flavonoid content of selected foods—2003.
- [3] Beecher G.R. 2003. Overview of dietary flavonoids. Nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of Nutrition*. October 1, 2003 vol. 133 no. 10 3248S-3254S
- [4] Clifford, M. 2001 A nomenclature for phenols with special reference to tea. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 41[Suppl.]: 393-397
- [5] Hodgson M.J., Croft K.D. 2010. Tea flavonoids and cardiovascular health. *Molecular aspects of medicine*, Vol 12, 2010 :1-8
- [6] Hoensh H.P., Kirch W. 2005. Potential Role of Flavonoids in the Prevention of Intestinal Neoplasia. 2005. *International Journal of Gastrointestinal Cancer*, vol. 35, no. 3, 187-196, 2005
- [7] Majewska M., Czeczot H. 2009. Flawonoidy w praktyce i terapii. *Terapia i leki*. Tom 65, nr 5 :368-377
- [8] Noroozi M., Angerson J.W., Lean B.E.J. 1998. Effects of flavonoids and

- vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 1998;67:1210-8
- [9] Rusznayák S, Szent-György A. 1936. Vitamin nature of flavones. *Nature* 1936;138:798
- [10] Steffen Y., Schewe T., Sies H. 2005. Epicatechin protects endothelial cells against oxidized LDL and maintains NO synthase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2005, 331, 4, 1277-1283.
- [11] Valenzuela A., Sanhueza J., Nieto S. 2003. Cholesterol oxidation: health hazard and the role of antioxidants in prevention. *Biol. Res.* 2003, 36, 3-4, 291-302.
- [12] Veljkovic V., Mouscadet J.F., Veljkovic N. 2007. Simple criterion for selection of flavonoid compounds with anti-HIV activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17, 5, 1226-1232.
- [13] Wiczowski W., Piskula M.K. 2004. Food flavonoids. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2004, 13, 54, 101-114.
- [14] Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomás-Barberán FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS. 2004 Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr.* 2004 Summer;59[3]:113-22.

KWAS FERULOWY, BETA-GLUKAN I KSANTOHUMOL - BIOAKTYWNE SKŁADNIKI O POTENCJALNYM WYKORZYSTANIU PROZDROWOTNYM

Edyta Bańcyr¹, Marcin Żyromski²

¹Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Katedra Immunologii, Patofizjologii i Prewencji Weterynaryjnej, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

²Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Chemii, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Streszczenie: Biologicznie aktywne związki zawarte w piwach od długiego czasu budziły zainteresowanie nie tylko naukowców, ale również producentów żywności. Stworzenie produktu wzbogaconego w dodatkowe związki polepszające jakość życia stało się wyzwaniem współczesnego przemysłu spożywczego (Wolf-Hall i Schwarz, 2002). Dodatek związków o udowodnionych właściwościach biologicznych będzie mógł być krokiem naprzód w prewencji i leczeniu wielu chorób cywilizacyjnych przy wykorzystaniu codziennych składników zbilansowanej diety.

Surowce wykorzystywane do produkcji piwa

Głównymi surowcami wykorzystywanymi w produkcji piwa są: słód, chmiel, woda i tzw. dodatki niesłodowane.

Słód. Ogromną rolę w produkcji odgrywa słód, otrzymywany z odmian jęczmienia browarnego lub pszenicy. Gotowy słód uzyskuje się w wyniku szeregu procesów technologicznych, jakim poddawane jest ziarno (moczenie, kiełkowanie, suszenie). Głównym celem wszystkich etapów jest wytworzenie i uaktywnienie enzymów zawartych w warstwie aleuronowej, które są niezbędne do rozkładu białek i skrobi w czasie kolejnych etapów warzenia piwa. W zależności od produkowanego rodzaju piwa słody dzieli się zwyczajowo na pilzneńskie (jasne), monachijskie (ciemne) i pszeniczne, których kolor uwarunkowany jest zastosowaną metodą suszenia. Ponadto istnieją również słody specjalne, jak karmelowy, który nadaje piwu charakterystyczny smak i barwę.

Woda stanowi jeden z ważniejszych składników niezbędnych do wyprodukowania wysokiej jakości piwa. W procesie technologicznym zużywana jest głównie w czasie zacierania. Najistotniejszym parametrem, który powinna wykazywać woda jest tzw. alkaliczność resztkowa (różnica między właściwościami alkalizującymi anionów a właściwościami zakwaszającymi). Wraz ze wzrostem alkaliczności resztkowej wzrasta twardość wody i pH. Alkaliczność resztkowa wody wykorzystywanej do warzenia piw jasnych (pilzneńskich) powinna być niższa niż 50n, natomiast do warzenia piw ciemnych optymalna alkaliczność resztkowa wynosi 100n. Wysoka alkaliczność resztkowa, podwyższająca pH, zaburza procesy warzenia i zacierania piwa, które powinny odbywać się w pH kwaśnym (Rajkowska i wsp., 2009). Obecnie istnieje wiele sposobów obniżania alkaliczności resztkowej, jak

choćby stosowanie neutralizacji, nowoczesnych systemów uzdatniania wody czy zastosowanie dekarbonizacji.

Chmiel (*Humulus lupulus*) zaliczany jest do rozdzielnopłciowych bylin, należących do rodziny Cannabaceae. W produkcji piwa wykorzystywane są kwiatostany żeńskie (szyszki chmielu), z których izoluje się przede wszystkim olejki chmielowe i gorzkie żywice, nadające piwu gorzkość i odpowiedni aromat. Wyróżnia się dwie odmiany chmielu: gorzki i aromatyczny, klasyfikacja oparta jest na składzie ilościowym gorzkich żywic, zawartych we wnętrzu szyszki (Murakami i wsp., 2006). W żywicach znajdujących się w chmielu występuje wiele związków, których biologiczne właściwości wciąż nie zostały dobrze poznane (Murakami i wsp., 2006; Zanolini i Zavatti, 2008).

	MIEKKIE	TWARDE
	Rozpuszczalne w heksanie	Nierozpuszczalne w heksanie
ŻYWICE	α-kwasy humulon, cohumulon, adhumulon	Nie poznane
	Izo- α-kwasy izohumulon, izocohumulon, izoadhumulon	
	B-kwasy jak lupulon, colupulon, adlupulon	
	Hulupulon	
	Kwasy humowe	

Szyszki chmielowe zawierają przeciętnie 2-12% kwasów, do 1,5% olejków chmielowych, 2-5% polifenoli, do 15% białek, do 50% celulozy. W szyszkach chmielowych znajdują się również chalkony, terpeny, glikozydy flawonowe i katechiny (Nowak i wsp., 2009).

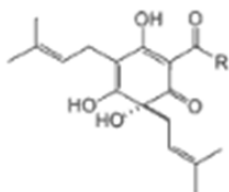
Drożdże piwowskie. Kolejnym istotnym składnikiem w produkcji piwa są drożdże piwowskie. Drożdże piwowskie należą do gatun-

ku *Saccharomyces cerevisiae*. Na podstawie różnic morfologicznych i fizjologicznych, wyróżniono drożdże górnej (*Saccharomyces cerevisiae* var. *Cerevisiae*) i dolnej fermentacji (*Saccharomyces cerevisiae* spp. *uvarum* var. *carslbergensis*). Głównym zadaniem drożdży jest wytworzenie alkoholu etylowego oraz obniżenie pH brzeczki.

Surowce niesłodowane. Ostatnią grupą surowców stosowanych do produkcji piwa są surowce niesłodowane. Surowcami niesłodowanymi są ziarna kukurydzy, ryż, sorgo, pszenica, cukier czy syropy cukrowe. Z uwagi na obecne ustawodawstwo nie istnieją ramy procentowe określające dopuszczalne ilości surowca niesłodowanego w zasypie surowca.

Ksantohumul - główny związek bioaktywny występujący w piwie

Ksantohumul jest zaliczany do najważniejszych związków flawonoidowych występujących w piwie. Ze względu na silne właściwości antyoksydacyjne wzbudził szerokie zainteresowanie w świecie naukowym.



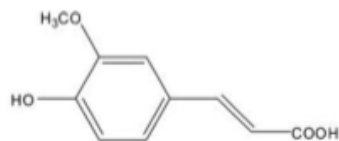
Ryc. 1. Ksantohumul

Biologiczna aktywność ksantohumolu jest zdumiewająca. Związek ten wykazuje nie tylko właściwości antybakteryjne czy antyoksydacyjne, ale również przeciwzapalne, chemoprewencyjne, antyproliferacyjne względem komórek rakowych (potwierdzone badania na liniach komórkowych raka prostaty). Yamaguchi i wsp. (2009) wykazały, że w warunkach in vitro ksantohumul wykazuje bardzo silne właściwości antyoksydacyjne. Zastosowanie metody ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), służącej do oceny właściwości przeciwutleniających pokazało, że ksantohumul wykazuje znacznie wyższe właściwości antyoksydacyjne niż witamina C czy witamina E. Yamaguchi i wsp. (2009) zbadali również zdolność do wygaszania tlenu singletowego (SOAC - Single Oxygen Absorbance Capacity) który z biologicznego punktu widzenia stanowi zagrożenie dla komórek organizmu głównie ze względu na bardzo wysoką reaktywność - może uszkadzać reszty aminokwasowe, wpływać negatywnie na zasady purynowe (Mielczarek i wsp., 2010). Wyniki badań dla ksantohumolu wykazały, że posiada on znacznie wyższą zdolność do wygaszania tlenu singletowego niż chociażby witamina E.

Co interesujące, ksantohumul wykazuje również silne działanie bakteriobójcze, grzybobójcze oraz wirusobójcze (Van Cleemput i wsp., 2009). Potwierdzone jest hamowanie rozwoju kolonii antybiotykoopornych *Staphylococcus aureus* przez dodatek ksantohumolu (Chadwick i wsp., 2006). Liczne badania prowadzone na liniach nowotworowych wykazały, że ksantohumul skutecznie hamuje rozwój linii komórkowych raka prostaty, raka sutka oraz białaczki (Mielczarek i wsp., 2010).

Kwas ferulowy i β -glukan

Kwas ferulowy zaliczany jest do pochodnych kwasu cynamonowego, wykazuje on działanie żółciopędne, lipotropowe. Jest związkiem rozpuszczalnym w wodzie i etanolu (Merdy i wsp., 2000). Zaliczany jest do arabinoksylanów, związków występujących w słodzie. Kwas ferulowy wykazuje bardzo silne właściwości przeciwutleniające, co ma istotny wpływ nie tylko na produkcję piwa, ale również potencjalnie dla przyszłych konsumentów. Właściwości antyoksydacyjne kwasu ferulowego potwierdzone zostały metodami chemiluminescencyjnymi (właściwości kwasu ferulowego zbliżone były do aktywności przeciwutleniającej rutyny czy kwercetyny), czy metodami opartymi na wiązaniu wolnych rodników (Szwajgier i Targoński, 2005). Badania prowadzone w warunkach in vitro potwierdziły silne właściwości antyoksydacyjne kwasu ferulowego, którego aktywność przewyższała aktywność innych znanych przeciwutleniaczy, jak kwasu wanilinowego, syringinowego). Silne właściwości przeciwutleniające kwasu ferulowego wynikają najprawdopodobniej ze specyficznej budowy związku (grupa hydroksylowa w położeniu para, grupa metoksylova w położeniu meta w pierścieniu fenolowym) (Natella i wsp., 1999). Silne właściwości przeciwutleniające uwarunkowane są również obecnością podwójnego wiązania (łańcuch propionowy).

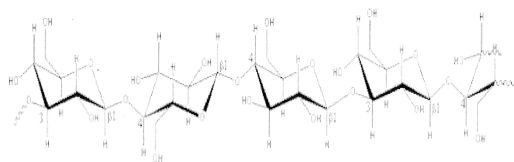


Ryc. 2. Kwas ferulowy

Kwas ferulowy poddany estryfikacji resztą arabinofuranozydową wykazuje wysokie właściwości przeciwutleniające względem lipoprotein LDL (Ohta i wsp., 1997). Co istotne, kwas ferulowy wykazuje silne właściwości antyhiperlipidemiczne, przez co bierze udział w regulacji metabolizmu glukozy. Udowodnione zostało również działanie antymutagenne kwasu ferulowego, który dzięki swoim właściwościom wykazuje zdolność do hamowania uszkodzeń DNA.

Kwas ferulowy skutecznie hamuje reaktywne formy tlenu, redukuje stres oksydacyjny, hamuje rozwój komórek nowotworowych (potwierdzone hamowanie rozwoju komórek nowotworu języka) (Lin i wsp., 2005; Kampa i wsp., 2004).

Beta-glukan należy do grupy polisacharydów nieskrobiowych. Zbudowany jest z cząsteczek glukozy. Roślinne łańcuchy glukanu są liniowymi polimerami głównie o wiązaniach β -(1-3) i β -(1-4), wśród niektórych rodzajów traw oznaczono obecność wiązań β -(1-6) (Gibiński, 2010). Łańcuchy beta-glukanu zbóż składają się z sekwencji reszt glukozowych połączonych wiązaniem β -(1-4) przedzielonych wiązaniem β -(1-3). Konsekwencją liczby wiązań występujących w łańcuchu beta-glukanu jest jego rozpuszczalność w wodzie lub jej brak. Wraz ze wzrostem liczby wiązań β -(1-4) rozpuszczalność zmniejsza się, a wraz z rosnącą liczbą wiązań β -(1-3) rozpuszczalność zwiększa się. Beta-glukan zbóż znajduje się głównie w ścianach komórkowych, najwięcej jest go w ziarnie jęczmienia i owsa (Jurczyńska i wsp., 2012).



Ryc. 3. Budowa strukturalna β -(1-3)(1-4)-D-glukanu (Gibiński i Sikora 2009)

Ze względu na swe właściwości beta-glukan znalazł zastosowanie w wielu branżach przemysłu. Zdolność tworzenia śluzów w układzie pokarmowym wpływa na zmniejszenie poziomu wchłaniania glukozy z posiłku oraz cholesterolu we krwi, co wykorzystywane jest w terapiach leczenia hiperглиkemii, hiperinsulinomii, hiperlipidemii, hipercholesterolemii, chorób krążenia, nowotworów i nadciśnienia tętniczego (Dawkins i Nnanna, 1995; Skendi i wsp., 2003; Anttila i wsp., 2004; Lazaridou i wsp., 2004; Lazaridou i Biliaderis, 2007). Możliwość leczenia wielu dolegliwości jest wypadkową nie tylko wcześniej wspomnianej zdolności, ale także zdolności zwiększania lepkości treści pokarmowych, aktywacji makrofagów i cytokin odpowiedzialnych za układ immunologiczny czy cytotoksyczności względem komórek nowotworowych (Ehrenbergerová i wsp., 2008; Chiani i wsp., 2009; Jurczyńska i wsp., 2012). Beta-glukan w przemyśle piwowarskim jest utrudnieniem technologicznym (Czarnecki i wsp., 2004), natomiast w innych branżach przemysłu spożywczego doceniono jego właściwości. Zdolność do żelowania i zagęszczania wynikająca z budowy i masy cząsteczkowej jest wykorzystywana przy produkcji sosów, dressingów, zagęszczaczy spożywczych, galaretek, ale i także produktów zbożowych jak chleb. Umiejętność tworzenia

cienkich powłok (filmów) jest wykorzystywana przy tworzeniu mikrokapsulek (Vaidya i Singhal, 2008), wypełnionych substancjami smakowo-zapachowymi, dodawanymi do sosów i zup w proszku (Gibiński i Sikora, 2009). Filmy są także wykorzystywane jako bioopakowania żywności. Jednocześnie beta-glukan jest wykorzystywany w produkcji żywności o obniżonej zawartości tłuszczu, gdzie stanowi zamiennik tłuszczowy, nie zmniejszający wartości odżywczej produktu a jedynie jego kaloryczność (Gibiński i Sikora, 2009).

Dodatki bioaktywnych związków do piw

W technologii piwowarstwa wzbogacanie brzozecek lub gotowych piw jest nowym trendem. Dotyczy on jednak w głównej mierze wzbogacania ich w dodatki smakowo-zapachowe aniżeli związki o charakterze bioaktywnym. Stosowanym dotychczas związkiem o potwierdzonych właściwościach biologicznych był kwas askorbinowy oraz jego pochodna – kwas dehydroaskorbinowy. Stosowany był on w postaci przeciwutleniacza dodawanego do gotowego wyrobu.

Prowadzone są badania nad zwiększeniem potencjału biologicznego piw poprzez modyfikację stosowanych procesów technologicznych, jednak rozwój tej ścieżki jest ograniczony charakterem produkcji i składu chemicznego piwa oraz aktami prawnymi określającymi sposoby wytwarzania go. Drugą możliwą ścieżką zwiększania zawartości związków bioaktywnych w piwie jest metoda fortyfikacji ich po zakończeniu właściwej obróbki technologicznej. Wśród możliwych związków zdalnych do wykorzystania surowcem o największym potencjale są związki fenolowe, ze szczególnym uwzględnieniem flawonoidów. Stanowią one grupę związków o potwierdzonym, szerokim spektrum bioaktywnych właściwości. Z uwagi na możliwość wykorzystania ich w przemyśle piwowarskim ustawodawstwo unijne określa, że możliwe jest stosowanie ich z uwzględnieniem zasady quantum satis, tak jak ma to miejsce ze stosowaniem kwasu askorbinowego. Jednakże wstępne badania nad fortyfikacją piw związkami fenolowymi wykazały ich wpływ na jakość sensoryczną gotowego wyrobu (Czybier i Żyromski, 2012). Tematyka wzbogacania piw w związki bioaktywne wymaga szeregu dalszych badań nad zwiększaniem ich potencjału biologicznego bez jednoczesnego ubytku ich cech sensorycznych.

Podsumowanie

Wykorzystanie beta-glukanu, kwasu ferulowego i ksantohumolu może stanowić świetną alternatywę w stosunku do obecnie stosowanych metod leczenia wielu schorzeń. Zastosowanie wyżej wymienionych związków może przynieść wiele

korzyści nie tylko ze względu na obniżenie potencjalnych kosztów terapii, lecz również ze względu na innowacyjność i nietoksyczność na inne komórki organizmu. Pochodne związków będą mogły stanowić świetne uzupełnienie już stosowanych metod leczenia, a być może w przyszłości stanowić będą substrat do otrzymywania leków nowej generacji, ukierunkowanych bezpośrednio na chore komórki.

Zastosowanie powyższych związków w technolo-

gii żywności stwarza nowe możliwości fortyfikacji obecnych na rynku spożywczych produktów. Jednocześnie ze względu na szeroki wachlarz właściwości beta-glukanu, kwasu ferulowego oraz ksantohumolu mogą być wykorzystywane jako związki bakteriostatyczne lub wręcz jako konserwanty naturalnego pochodzenia, neutralne sensorycznie w stosunku do produktu, w którym zostaną zastosowane.

Piśmiennictwo:

- [1] Murakami A, Darby P, Javornik B i wsp. Molecular phylogeny of wild hops, *Humulus lupulus* L. *Heredity* 2006; 97:66-74. 2.
- [2] Czybier, Żyromski "Bezpieczeństwo żywności w aspekcie wzbogacania brzezek piwowskich w egzogenne polifenole"
- [3] Zanolli P, Zavatti M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol* 2008; 116:383-96.
- [4] Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. [hops] with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomed* 2006; 13:119-31.
- [5] Van Cleemput M, Cattoor K, De Bosscher K i wsp. Hop [*Humulus lupulus*] – derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. *J Nat Prod* 2009; 72:1220-30.
- [6] Yamaguchi N, Satoh-Yamaguchi K, Mitsunori O. In vitro evaluation of antibacterial, anticollagenase, antioxidant activities of hop components [*Humulus lupulus*] addressing acne vulgaris. *Phytomed* 2009; 16:369-76.
- [8] 6. Puzanowska-Tarasiewicz H, Starczewska B, Kuźmicka L. Reaktywne formy tlenu. *Bromat Chem Toksykol* 2008; 41:1007-15
- [7] Mielczarek M., Kołodziejczyk J., Olas B. 2010. Właściwości lecznicze chmielu zwyczajnego [*Humulus lupulus* L.]. *Postępy Fitoterapii* 4/2010, s. 205-210
- [8] Czybier, Żyromski M.
- [9] Merdy P., Guillon P., Aplincourt M., Duomonceau J. Interaction of metallic cations with lignins. Part 1: Stability of iron [III], manganese [II] and copper [II] complexes with phenolic lignin model compounds: coumaric, ferulic and sinapic acids and coniferyl alcohol. „*Journal of Chemical Research, Synopses*” 2, s. 76-77, 2000.
- [10] Natella F, Nardini M, DiFelice M., Scaccini C: Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants : structure activity relations. *J Agric Food Chem.* 1999, 47, 1453-1459
- [11] . Ohta T., Yamasaki S.A., Egashira Y., Sanada H. Antioxidant activity of corn bran cellwall fragments in the LDL oxidation system. *J Agric Food Chem.* 1997. 45, 1644-1648
- [12] Lin FH., Lin JY, Gupta RD., Tournas JA., Burch JA., Selim MA., Monteiro-Riviere NA., Grichnik JM., Zielinski J., Pinnell SR. Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of skin.. „*The Journal of Investigative Dermatology*”2005. . 125 [4], s. 826-32,
- [13] . Kampa M., Alexaki VI., Notas G., Nifli AP., Nistikaki A., Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Kouimtoglou E., Blekas G., Boskou D., Gravanis A., Castanas E. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action.. „*Breast Cancer Research : BCR*”. 6 [2], s. R63-74, 2004
- [14] Szwajgier D., Targoński Z. 2005. Arabinoksyłany ze słodu źródłem naturalnego przeciwutleniacza-kwasu ferulowego i błonnika pokarmowego w piwie. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 200, 4[45]:27-41
- [15] . Wolf-Hall C.E., Schwarz P.B.2002. Mycotoxins and fermentation--beer production. *Adv Exp Med Biol.* 2002;504:217-26.
- [16] Rajkowska M., Holak M., Protasowicki M. 2009. Makro i mikroelementy w wybranych asortymentach piwa. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 2009, 2, [63], 112-118
- [17] Nowak J., Paluszkievicz M., Lasik M. 2009. Wpływ pH zacieru i brzezki na przebieg procesu technologicznego i wybrane wyróżniki jakościowe piwa. *Bromat.Chem.Toksykol.*2009, 3, 414-19.
- [18] Anttila H., Sontag-Strohm T., Salovaara H. 2004. Viscosity of beta-glucan in oat products. *Agricultural and Food Science:* 13, 80-87.
- [19] Chiani P., Bromuro C., Cassone A., Torosantucci A. 2009. Anti-β-glucan antibodies in healthy human subjects. *Vaccine:* 27, 513-519.
- [20] Czarnecki Z., Czarnecka M., Śpiewak A. 2004. Zmiany wysokocząsteczkowych β-glukanów i aktywności β-glukanazy w procesie słodowania jęczmienia browarnego. *Acta Sci. Pol. Technologia Alimentaria:* 3 [2], 137-146.
- [21] Dawkins N.L., Nnanna I.A. 1995. Studies on oat gum [(1,3;1,4)-β-D-glucan]: composition, molecular weight estimation and rheological properties. *Food Hydrocolloids:* 1 [9], 1-7.
- [22] Ehrenbergerová J., Březinová-Belcredi N., Psota V., Hrstková P., Cerkal R., Newman C.W. 2008. Changes Caused by Genotype and Environmental Conditions in Beta-Glucan Content of Spring Barley for Dietetically Beneficial Human Nutrition. *Plant Foods Hum. Nutr.:*63, 111-117.
- [23] Gibiński M., Sikora M. 2009. Spożywcze i niespożywcze zastosowanie β-glukanów. Wydawnictwo Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, Kraków.
- [24] Gibiński M. 2010. Rola β-glukanów w ochronie i kształtowaniu zdrowia. Osiągnięcia naukowo-techniczne w słodownictwie i browarnictwie: Kraków, 45-61.
- [25] Jurczyńska E., Sączko J., Kulbacka J., Kawa-Rygielska J., Błażewicz J. 2012. Beta-glukan, jako naturalny antykarcyngen. *Pol. Merk. Lek., XXXIII,* 196, 217-220.
- [26] Lazaridou A., Biliaderis C.G., Micha-Screttas M., Steele B.R. 2004. A comparative study on structure-function relations of mixed-linkage [1,3][1,4], linear β-D-glucans. *Food Hydrocolloids:* 18, 837-855.
- [27] Lazaridou A., Biliaderis C.G. 2007. Molecular aspects of cereal β-glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *Journal of Cereal Science:* 46, 101-118.
- [28] Skendi A., Biliaderis C.G., Lazaridou A., Izidorczyk M.S. 2003. Structure and rheological properties of water soluble β-glucans from oat cultivars of *Avena sativa* and *Avena bysantina*. *Journal of Cereal Science:* 38, 15-31.
- [29] Vaidya B.H., Singhal R.K. 2008. Use of insoluble yeast β-glucan as a support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces:* 61, 101-105.
- [30] Worrasinchai S., Supphantharika M., Pinjai S., Jamnong P. 2006. β-glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food Hydrocolloids:* 20, 68-78.

BIAŁKO ADAM17 - SOJUSZNIK CZY WRÓG?

Marcin Markiewicz

Zakład Biofizyki, Pracownia Radiospektroskopii Nowotworów i Radiobiologii

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński

Artykuł napisany pod opieką dr Krystyny Stalińskiej, Zakład Biochemii Komórki, WBBiB UJ

Streszczenie: Komórki są systemem niezwykle skomplikowanym, na którego prawidłowe funkcjonowanie składa się wiele procesów. Jednym z elementów tej misternej maszyny są przebiegające powszechnie procesy ograniczonej proteolizy. W ich wyniku dochodzi do złuszczenia zewnątrzkomórkowych domen białek transbłonowych z powierzchni komórek. Uwolnione białka mogą mieć zasięg ogólnoustrojowy, pełniąc rozmaite funkcje.

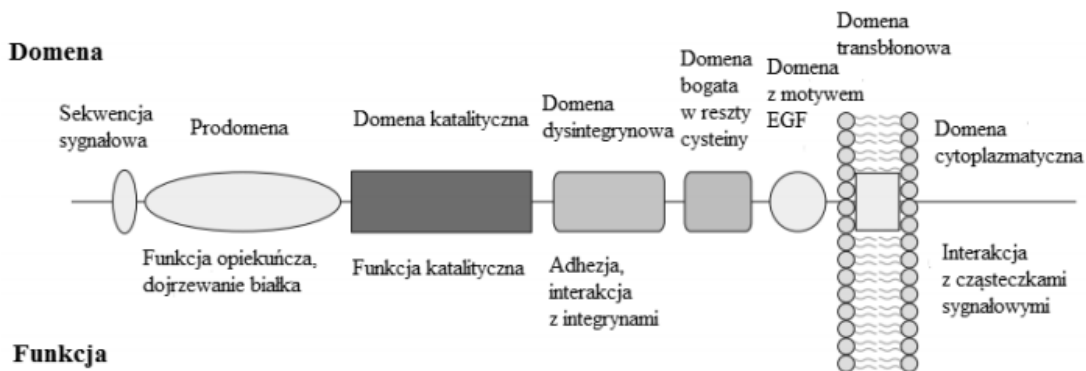
Jednym z najistotniejszych i najlepiej poznanych enzymów odpowiedzialnych za złuszczenie ektodomen białek jest sekretaza ADAM17 – będąca metaloproteazą dysintegrynową, należącą do nadrodziny metaloproteaz cynkowych. Jest to białko transbłonowe o charakterystycznej, konserwatywnej budowie domenowej. Posiada jon cynku związany w centrum aktywnym, a dla uzyskania aktywności proteolitycznej niezbędne jest odcięcie prodomeny. Aktywność ADAM17 regulowana jest przez wiele czynników, m.in. cytokiny prozapalne, czynniki wzrostu czy interakcje z innymi białkami.

Czynniki wzrostu i cytokiny prozapalne są nie tylko regulatorami aktywności, ale też substratami dla białka ADAM17. Mnogość białek poddawanych proteolizie przez tę sekretazę jest ogromna i obejmuje również receptory dla czynników wzrostu, cząsteczki adhezyjne, antygeny powierzchniowe i wiele innych białek. Tak szerokie spektrum substratów skutkuje zróżnicowanym wpływem działalności ADAM17 na organizm. Aktywność ta może wywierać zarówno skutki negatywne, poprzez sprzyjanie rozwojowi nowotworów lub nasilanie stanów zapalnych i związanych z nimi chorób autoimmunologicznych, jak i pozytywne – na przykład neuroprotekcja czy zapobieganie chorobom neurodegeneracyjnym. Trudno więc się dziwić, że ADAM17 znajduje się w kręgu zainteresowań medycyny, stając potencjalny cel wielu terapii.

Wstęp

Komórki żywe kontrolują funkcje i aktywność swoich białek poprzez wiele mechanizmów, m.in. obróbkę potranslacyjną. W jej wyniku białka mogą zostać poddane fosforylacji, acetylacji, metylacji, ubikwitynacji, glikozylacji (i wielu innym modyfikacjom polegającym na dołączeniu dodatkowych grup funkcyjnych), a także proteolizie [1]. Obróbka proteolityczna jest modyfikacją nieodwracalną i zachodzi zarówno wewnątrz komórki, na jej powierzchni, jak i poza komórką. Ma ona fundamentalne znaczenie dla podstawowych procesów życiowych na poziomie komórkowym, takich jak: przebieg cyklu komórkowego, apoptoza czy migracja [2]. Niezwykle ważnym elementem regulacji poprzez proteolizę jest złuszczenie ektodomen białek (ang. shedding). Jest to proces ograniczonej proteolizy, przebiegający na powierzchni komórki [3]. Polega na odcinaniu zewnątrzkomórkowych domen białek transbłonowych, które są następnie uwalniane i mogą pełnić funkcję rozpuszczalnych cząsteczek sygnałowych o zasięgu ogólnoustrojowym, albo też prowadzić do akty-

wacji lub ograniczenia funkcjonalności białek poddanych proteolizie, modulując tym samym wrażliwość komórki na czynniki zewnętrzne [2]. Złuszczenie ektodomen białek zachodzi w komórkach i tkankach zarówno w sposób ciągły, na pewnym stałym poziomie (konstytutywnie), jak i może zostać aktywowane i silnie wzmożone w odpowiedzi na różne czynniki wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe (np. estry forbolu) [3]. Enzymy proteolityczne uczestniczące w złuszczeniu ektodomen białek nazwano, z racji pełnionej przez nie funkcji, konwertazami lub sekretazami (ang. convertases, secretases lub sheddases) [2]. Niezwykle ważną grupą sekretaz są enzymy należące do dużej nadrodziny metaloproteaz cynkowych, w obrębie której wyróżniamy cztery rodziny białek: metaloproteazy dysintegrynowe (ADAM), metaloproteazy dysintegrynowe z domeną trombospondynową, metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) oraz metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej związane z błoną (MT-MMP) [3, 4]. Szczególną rolę wśród metaloproteaz cynko-



Ryc. 1 Budowa białek z rodziny ADAM, wg [5]. Białko ADAM17 zamiast domeny z motywem EGF posiada domenę krambinową [14].

wych odgrywa rodzina ADAM. Należą do niej białka stosunkowo duże, zazwyczaj transbłonowe. Około połowa z nich posiada aktywność proteolityczną i bierze udział w złuszczeniu ektodomen receptorów błonowych i innych białek znajdujących się na powierzchni komórki [5]. Do rodziny tej należy białko ADAM17, będące główną sekretazą czynnika martwicy nowotworu (TNF, ang. tumor necrosis factor). TNF jest jedną z kluczowych cytokin prozapalnych w ludzkim organizmie, wywierającą w formie rozpuszczalnej działanie ogólnoustrojowe [6]. ADAM17 posiada również szereg innych substratów, do których należą m.in. receptory dla TNF typu I i II [7, 8], receptor dla interleukiny 6 [9], L-selektyna [10], czynniki wzrostu [11, 12] i wiele innych białek, o których będzie mowa w dalszej części artykułu.

Budowasekretazy ADAM17

ADAM17 (historyczna nazwa TACE, ang. tumor necrosis factor- α -converting enzyme) to obecnie najlepiej poznana i scharakteryzowana ze wszystkich metaloproteaz z rodziny ADAM [4]. Białka z rodziny ADAM są glikoproteinami typu I [5] i charakteryzują się bardzo konserwatywną budową domenową. Poczynając od N-końca, wyróżniamy następujące domeny: sekwencję sygnałową, prodomenę, domenę metaloproteazową (katalityczną), domenę dysintegrynową, domenę bogatą w reszty cysteiny, domenę z motywem EGF, domenę transmembranową i domenę cytoplazmatyczną [13]. Cechą wyróżniającą konwertazę ADAM17 spośród innych białek z tej rodziny jest brak domeny z motywem EGF, w miejsce której występuje domena krambinowa [14].

Sekretaza ADAM17 charakteryzuje się centrum aktywnym typu repropolizynowego, ze związanym atomem cynku [15]. Znajduje się ono pomiędzy dwoma subdomenami, które składają się na całą domenę katalityczną, mającą strukturę globularną [16]. Jon cynku w centrum aktywnym koordy-

nowany jest przez trzy reszty histydyny His405, His409 i His415. Całe centrum aktywne jest natomiast stabilizowane przez wiązanie disiarczkowe pomiędzy resztami cysteiny Cys225 i Cys333[17]. Ważną rolę w aktywności katalitycznej odgrywa też skręt metioninowy, umiejscowiony zaraz po motywie wiążącym atom cynku – co jest typowe dla białek z klanu met-cynkin [18].

Lokalizacja komórkowa i proces dojrzewania ADAM17

ADAM17 to białko błonowe, występujące w obrębie tzw. tratw lipidowych [19]. Wyróżnia się dwie jego formy o różnych masach cząsteczkowych. Proforma, czyli nieaktywny zymogen, ma masę 120 kDa i stanowi ok. 1/3 całej populacji tego białka w komórce. Natomiast forma dojrzała, o masie 100 kDa, jest aktywna proteolitycznie. W obrębie zewnętrznej błony komórkowej znajduje się jedynie niewielki odsetek całej puli białka ADAM17 obecnego w komórce. Większa część związana jest z wewnętrznymi błonami siateczki śródplazmatycznej przestrzeni okołojądrowej. Tam też ma miejsce synteza i początkowy etap dojrzewania sekretazy, polegający na glikozylacji – dołączeniu do cząsteczki białka bocznych łańcuchów cukrowych [20, 21].

Kolejne stadia mają miejsce w pęcherzykach trans aparatu Golgiego. Dochodzi tam do modyfikacji i dojrzewania dołączonych wcześniej łańcuchów cukrowych. Na tym etapie konieczna jest jeszcze obecność prodomeny, która pełni funkcję białka opiekuńczego i umożliwia uformowanie mostków disiarczkowych oraz prawidłowe sfałdowanie białka [22]. Następnie białko, w zależności od zapotrzebowania, transportowane jest do zewnętrznej błony komórkowej lub pozostaje w regionie systemu błon aparatu Golgiego i siateczki śródplazmatycznej [20].

W obrębie sieci trans aparatu Golgiego ma miejsce aktywacja sekretazy ADAM17. Enzym jest syntetyzowany w formie nieaktywnego zymoge-

nu, zawierającego prodomenę, która, oprócz cech białka opiekuńczego, posiada także funkcję inhibitorową. Dopiero odcięcie prodomeny prowadzi do uzyskania pełnej aktywności proteolitycznej białka. Domena ta odcinana jest w wyniku aktywności konwertazy probiałek, głównie furyiny i PC7, które kolokalizują się wraz z ADAM17 w systemie błon aparatu Golgiego [23]. Obecny w regionie prodomeny motyw przełącznika cysteinowego ma prawdopodobnie wpływ na ochronę białka przed degradacją, nie jest jednak niezbędny dla zachowania przez nią funkcji inhibitorowej [20].

Regulacja sekretazy ADAM17 na poziomie transkrypcji

Początkowo uważano, że konwertaza ADAM17 nie podlega regulacji na poziomie transkrypcji. Obserwowano wprawdzie różnice w poziomie mRNA dla ADAM17, zarówno w różnych stadiach rozwojowych organizmu, jak i w zależności od typu tkanki, jednak nie wykazano doświadczalnie wpływu wielu testowanych czynników na ilość dojrzałego białka obecnego na powierzchni komórki [6]. Kolejne badania obalają jednak tę hipotezę. Jak się okazało, ludzkie komórki traktowane *in vitro* czynnikami takimi jak lipopolisacharyd (LPS, ang. lipopolysaccharide) [24], czy czynnik wzrostu śródbłonna naczyń krwionośnych (VEGF, ang. vascular endothelial growth factor), wykazywały wzrost poziomu mRNA dla ADAM17 [25]. Również w badaniach *in vivo* zaobserwowano podwyższony stopień ekspresji ADAM17, m.in. w tkance chrzęstnej pacjentów ze zwyrodnieniową chorobą stawów i reumatoidalnym zapaleniem stawów [26].

Dzisiaj znamy już wiele cząsteczek zdolnych do regulacji ADAM17 na poziomie mRNA. Należą do nich cytokiny prozapalne, takie jak: TNF, interleukina-1 β (IL-1 β , ang. interleukin-1 β) czy interferon γ (IFN γ , ang. interferon γ) oraz czynniki wzrostu (EGF i VEGF) [27]. Ekspresję konwertazy ADAM17 silnie stymulują też, poprzez aktywację odpowiedzi UPR (ang. unfolded protein response), hipoksja i stres związany z siateczką śródplazmatyczną [28]. Wykazano również wpływ hormonów (m.in. luteinizującego i folikulotropowego) na regulację ADAM17 na poziomie ekspresji [29].

Regulacja aktywności konwertazy ADAM17

Sekretaza ADAM17 może być regulowana na wielu płaszczyznach. Opisana wyżej regulacja na poziomie transkrypcji nie ma bezpośredniego wpływu na aktywność dojrzałego białka. Wpływ taki ma natomiast, również już wspomniana, obecność prodomeny. Ta pełniąca funkcję inhibitorową domena, nawet po odcięciu przez konwertazę probiałek, może pozostać niekowalencyjnie związana z domeną katalitycz-

ną i hamować w ten sposób jej aktywność [30]. Innym ważnym fizjologicznym inhibitorem ADAM17, tym razem zewnątrzkomórkowym, jest białko TIMP3 (ang. tissue inhibitor of metalloproteinases). TIMP3 ma zdolność do wiązania się z domeną katalityczną i hamowania aktywności wielu metaloproteaz, nie tylko z rodziny ADAM [31].

Do fizjologicznych aktywatorów sekretazy ADAM17 można z kolei zaliczyć liczne czynniki wzrostu, LPS oraz f-LMP (ang. muscle LIM protein) [32]. Natomiast istotnym aktywatorem niefizjologicznym jest ester forbolu PMA, który może stymulować ADAM17 niezależnie od obecności domeny cytoplazmatycznej [33].

Na zdolność ADAM17 do wiązania i proteolizy substratów mogą silnie wpływać interakcje z innymi białkami. Białka SAP97 (ang. synapse-associated protein 97) i PTPH1 (ang. protein tyrosine phosphatase) hamują aktywność enzymatyczną konwertazy wiążąc się z jej domeną cytoplazmatyczną, która posiada wiele potencjalnych miejsc wiązania ligandów [34, 35].

Istotny wpływ na aktywność enzymatyczną ADAM17 ma też mikrośrodowisko. Dostęp do substratów w obrębie sztywnych struktur tratw lipidowych, gdzie sekretaza się lokalizuje, jest silnie utrudniony. Logicznym jest zatem, co zostało również potwierdzone doświadczalnie, iż zwiększenie płynności błony (poprzez obniżenie w niej zawartości cholesterolu) wpływa pozytywnie na aktywność proteolityczną ADAM17 [32].

Funkcje białka ADAM17 w organizmie i ich biologiczne implikacje

Jak już wspomniano, pierwszym poznany i jednym z najlepiej scharakteryzowanych substratów dla sekretazy ADAM17 jest TNF [6]. Ta niezwykle ważna cytokina prozapalna od wielu lat znajduje się w kręgu zainteresowań naukowców ze względu na szereg ważnych pełnionych przez nią funkcji biologicznych. Zaangażowana jest m.in. w regulację proliferacji komórek, proces apoptozy, czy stymulację odpowiedzi immunologicznej. TNF produkowany jest głównie przez makrofagi, a jego masa cząsteczkowa wynosi 17 kDa [36]. Syntetyzowany jest w postaci nieaktywnego, związanego z błoną białka prekursorowego (pro-TNF) [37]. W wyniku ograniczonej proteolizy, przeprowadzanej m.in. przez sekretazę ADAM17, dochodzi do uwolnienia z błony dojrzałej, rozpuszczalnej formy białka o zasięgu ogólnoustrojowym [38]. Najistotniejszą funkcją TNF jest stymulacja odpowiedzi zapalnej [36]. Bardzo ważny jest też wpływ tej cytokiny na modulację szeroko pojętej odpowiedzi immunologicznej organizmu. Co za tym idzie, przyczynia się ona do rozwoju i progresji wielu chorób autoimmunologicznych (np. reumatoidalnego zapalenia stawów) [39]. TNF może wywie-

rać efekt hamujący na wzrost komórek rakowych [36], ale też z drugiej strony, we współpracy z innymi cytokinami, sprzyjać wzrostowi nowotworu [40]. Warto również wspomnieć o komplikacjach związanych z odrzucaniem przez pacjentów przeszczepów, w który to proces TNF także jest zaangażowany [36]. Prawidłowy poziom złuszczenia TNF z błony w zdrowym organizmie jest na niskim, stałym pułapie. Pod wpływem czynników stymulujących aktywność konwertazy ADAM17 (takich jak endotoksyna, estry forbolu czy ligandy receptorów związanych z białkami G) ma miejsce znaczące wzmocnienie tego procesu w stosunku do stanu podstawowego [41].

Obróbce proteolitycznej przez sekretazę ADAM17 ulega nie tylko proforma cytokiny TNF, ale także receptory dla TNF typu I (TNFR1) i typu II (TNFR2) [7, 8]. Efektem tego procesu jest mniejsza ilość funkcjonalnych receptorów obecnych na powierzchni komórki i zwiększone stężenie ich rozpuszczalnych antagonistów, zdolnych do wiązania TNF. Skutkuje to znacznie obniżoną reaktywnością komórki na sygnały pochodzące od tej cytokiny [42].

Białko ADAM17 jest również w sposób pośredni zaangażowane w regulację odpowiedzi komórkowej na inne cytokiny prozapalne. Interleukina 6 (IL-6) oddziałuje na komórki nie tylko poprzez swój receptor (IL-6R), znajdujący się na ich powierzchni, lecz także na komórki, które go nie posiadają. Dzieje się tak dzięki oddziaływaniu IL-6 z rozpuszczalnym antagonistą tego receptora, który jest generowany na dwa sposoby: w wyniku alternatywnego składania transkryptów, bądź proteolitycznej obróbki IL-6R przez sekretazę ADAM17 [9]. Podobny proces zachodzi w przypadku interleukiny 15 (IL-15) i jej receptora (IL-15R α) [43].

Układ immunologiczny to system niezwykle złożony, wymagający prawidłowego przebiegu i współpracy wielu procesów do poprawnego działania. Niebagatelną rolę odgrywa tutaj wędrówka białych krwinek i ich osiedlanie się w ogniskach zapalnych, co jest możliwe dzięki oddziaływaniu leukocytów ze śródbłonkiem naczyń krwionośnych [44]. Za oddziaływanie to odpowiedzialne są cząsteczki adhezyjne, występujące zarówno na powierzchni komórek, jak i w formie rozpuszczalnej. Białko ADAM17 bierze udział w proteolitycznej obróbce wielu z tych molekuł, wpływając tym samym na proces wędrówki białych krwinek w krwiobiegu. Wykazano udział sekretazy ADAM17 w złuszczeniu na powierzchni komórki m.in. takich cząsteczek adhezyjnych jak: L-selektyna [10], V-CAM1 (ang. vascular cell adhesion molecule-1) – którego znacznie podwyższony poziom wykazano w nowotworach i stanach zapalnych [45], a także CX3CL1 [46] i JAM-A (ang. junctional adhesion molecule-A) [47], nazbyt intensywnie złuszczone w przypadku wieńcowej choroby serca [48, 49].

W wielu typach nowotworów obserwuje się podwyższony poziom nie tylko rozpuszczalnych form białek generowanych przez ADAM17, ale też i samej sekretazy. Jest to zazwyczaj skorelowane z negatywną prognozą dla pacjenta i wiąże się z faktem, iż konwertaza ADAM17 bierze udział w proteolitycznej obróbce znaczącej ilości czynników wzrostu i ich receptorów [15]. Czynniki te, w formie rozpuszczalnej, mają znacznie wyższy potencjał do aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych w porównaniu z molekułami związanymi z błoną. Efektywniejsza aktywacja szlaków sygnałowych prowadzi do wzmoczonej produkcji czynników transkrypcyjnych, odpowiedzialnych m.in. za proliferację [5]. ADAM17 zaangażowany jest w złuszczenie takich czynników wzrostu jak m.in. epreguina, amfiredulina, transformujący czynnik wzrostu α (TGF α , ang. transforming growth factor α), wiążący heparynę czynnik wzrostu typu EGF (ang. heparin-binding EGF-like growth factor) i epigen [11, 12], jak również receptora ErbB4/HER4 [50]. Nierzadko obserwuje się też produkcję przez komórki nowotworowe autokrynych czynników wzrostowych [5].

Znaczenie ADAM17 w nowotworach jest wieloaspektowe. Uwalnianie przez tę sekretazę cząsteczek adhezyjnych z powierzchni komórek rakowych sprzyja ich wzmoczonej ruchliwości, a więc wzrostowi potencjału migracyjnego i przerzutowaniu [51]. W proces ten zaangażowane są m.in. takie cząsteczki jak: CD44 [52] i ALCAM (ang. activated leukocyte cell adhesion molecule) [53]. Z drugiej strony, ADAM17 może sprzyjać osiedlaniu się migrujących komórek nowotworowych w ogniskach wtórnych. Domena dysintegrynowa tej sekretazy posiada zdolność do interakcji z integrynami macierzy zewnątrzkomórkowej – co jest kluczowe dla tworzenia przerzutów, wzrostu nowotworów i ich angiogenezy [52].

Kolejnym przykładem niepożądanego działania ADAM17 jest udział tej konwertazy w ochronie nowotworów przed rozpoznaniem i zniszczeniem przez układ immunologiczny. ADAM17 złuszcza z powierzchni komórek rakowych antygeny MICA i MICB (ang. MHC class I chain-related molecule). W rezultacie, receptory limfocytów T cytotoksycznych nie są w stanie rozpoznać tych antygenów na danych komórkach i dochodzi do ucieczki komórek nowotworowych spod kontroli immunologicznej [54].

Pozytywną rolę białko ADAM17 odgrywa w układzie nerwowym, gdzie pełni funkcje neuroprotekcyjne. Jego aktywność jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu procesów takich jak: proliferacja, dojrzewanie, różnicowanie i migracja komórek nerwowych. Wpływa też na mielinizację, wzrost i ukierunkowywanie aksonów [55]. Substratami w układzie nerwowym dla sekretazy ADAM17 są m.in. receptor Notch [56] i cząsteczka adhezyjna L1 (ang. immunoglobulin

family recognition molecule-1) [57]. Warto również wspomnieć o udziale tej konwertazy w obróbce proteolitycznej prekursorowego białka amyloidowego (APP, ang. amyloid precursor protein). Dzięki aktywności ADAM17 powstaje forma nietoksyczna APP, nie tworząca złożeń β -amyloidu, co zapobiega rozwojowi choroby Alzheimera [58]. W podobny sposób ADAM17 zapobiega też rozwojowi chorób prionowych, pośrednicząc w prawidłowej proteolizie białka prionowego PrP do nietoksycznej formy [59].

Wnioski końcowe – ADAM17 w medycynie

Sekretaza ADAM17 jest białkiem o szerokim spektrum substratowym i niebagatelnym znaczeniu dla prawidłowego funkcjonowania ludzkiego organizmu, zaangażowanym zarówno w regulację prawidłowych procesów fizjologicznych, jak i mającym wpływ na powstawanie stanów patologicznych. Odpowiednia równowaga na poziomie jego aktywności jest więc o tyle kłuczowa, co niezwykle krucha i łatwa do zachwiania. Z tych też powodów ADAM17 znajduje się od pewnego czasu w kręgu żywionego zainteresowania ze strony medycyny, a zwłaszcza tych jej gałęzi, które zajmują się leczeniem nowotworów i schorzeń autoimmunologicznych. Najintensywniej badane są tutaj inhibitory ADAM17 [60].

W zależności od typu schorzenia, inhibitory metaloproteaz mogą przyczynić się zarówno do zahamowania, jak i przyspieszenia rozwoju

choroby. Nowotwory wydają się być dobrym celem do stosowania takich inhibitorów. Spodziewanym efektem ich działania będzie spowolnienie rozwoju nowotworu, m.in. poprzez zahamowanie proliferacji, obniżenie ruchliwości i inwazyjności komórek nowotworowych czy zapobieganie ucieczce immunologicznej [61]. Inhibitory ADAM17 i innych metaloproteaz są też potencjalnie dobrym kandydatem do zwalczania chorób autoimmunologicznych. Uzyskano już w tej kwestii pewne sukcesy w zwierzęcych modelach zapalenia stawów, gdzie poprzez ograniczenie generowania rozpuszczalnych, aktywnych form cytokin prozapalnych osiągnięto spowolnienie postępu choroby [62]. Zabłokowanie aktywności ADAM17 może również mieć wpływ na zahamowanie procesu migracji i rekrutacji leukocytów do ognisk zapalnych [61]. Równocześnie należy mieć na względzie pozytywne efekty, jakie wywiera białko ADAM17 w organizmie. W układzie nerwowym, a w szczególności w mózgu, aktywność tej sekretazy ma znaczenie neuroprotektoryjne, zapobiegając rozwojowi chorób neurodegeneracyjnych [55]. Stosując inhibitory trzeba więc zwrócić na to szczególną uwagę, odpowiednio dobierając związki nie przekraczające bariery krew-mózg [61]. Optymalnym rozwiązaniem może tutaj okazać się celowane dostarczanie potencjalnego leku do pożądanej tkanki, możliwe do osiągnięcia za pomocą cząsteczek adaptorowych [63].

Piśmiennictwo:

- [1] M. Mann and O. N. Jensen, "Proteomic analysis of post-translational modifications," *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 3, pp. 255–61, Mar. 2003.
- [2] L. L. Kiessling and E. J. Gordon, "Transforming the cell surface through proteolysis," *Chem. Biol.*, vol. 5, no. 3, pp. R49–62, Mar. 1998.
- [3] J. Arribas and A. Borroto, "Protein ectodomain shedding," *Chem. Rev.*, vol. 102, no. 12, pp. 4627–38, Dec. 2002.
- [4] U. Novak, "ADAM proteins in the brain," *J. Clin. Neurosci.*, vol. 11, no. 3, pp. 227–35, Apr. 2004.
- [5] B. S. Zhou, J. S. Fridman, X. Liu, S. M. Friedman, R. C. Newton, and P. A. Scherle, "ADAM proteases, ErbB pathways and cancer," *Expert Opin. Invest. Drugs*, vol. 14, no. 6, pp. 591–606, 2005.
- [6] R. A. Black, C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March, and D. P. Cerretti, "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells," *Nature*, vol. 385, no. 6618, pp. 729–33, Feb. 1997.
- [7] P. Reddy, J. L. Slack, R. Davis, D. P. Cerretti, C. J. Kozlosky, R. A. Blanton, D. Shows, J. J. Peschon, and R. A. Black, "Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- α converting enzyme," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 19, pp. 14608–14, May 2000.
- [8] K. A. Solomon, N. Pesti, G. Wu, and R. C. Newton, "Cutting edge: a dominant negative form of TNF- α converting enzyme inhibits proTNF and TNFR1 secretion," *J. Immunol.*, vol. 163, no. 8, pp. 4105–8, Oct. 1999.
- [9] V. Matthews, B. Schuster, S. Schütze, I. Bussmeyer, A. Ludwig, C. Hundhausen, T. Sadowski, P. Saftig, D. Hartmann, K.-J. Kallen, and S. Rose-John, "Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE)," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 40, pp. 38829–39, Oct. 2003.
- [10] J. J. Peschon, "An Essential Role for Ectodomain Shedding in Mammalian Development," *Science* (80-), vol. 282, no. 5392, pp. 1281–1284, Nov. 1998.
- [11] U. Sahin and C. P. Blobel, "Ectodomain shedding of the EGF-receptor ligand epigen is mediated by ADAM17," *FEBS Lett.*, vol. 581, no. 1, pp. 41–4, Jan. 2007.
- [12] U. Sahin, G. Weskamp, K. Kelly, H.-M. Zhou, S. Higashiyama, J. Pe-

- schon, D. Hartmann, P. Saftig, and C. P. Blobel, "Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands," *J. Cell Biol.*, vol. 164, no. 5, pp. 769–79, Mar. 2004.
- [13] S. Francisco, "Mini-Review: ADAM, a Novel Family of Membrane Proteins Containing A Disintegrin And Metalloprotease Domain: Multipotential Functions in Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions," *J. Cell Biol.*, vol. 131, no. 2, pp. 275–278, 1995.
- [14] "Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17 precursor - Homo sapiens (Human)." [Online]. Available: <http://www.uniprot.org/uniprot/P78536>.
- [15] C. P. Blobel, "ADAMs: key components in EGFR signalling and development," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, no. 1, pp. 32–43, Jan. 2005.
- [16] F. X. Gomis-Rüth, "Structural aspects of the metzincin clan of metallo-endopeptidases," *Mol. Biotechnol.*, vol. 24, no. 2, pp. 157–202, Jun. 2003.
- [17] K. Maskos, C. Fernandez-Catalan, R. Huber, G. P. Bourenkov, H. Bartunik, G. a Ellestad, P. Reddy, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, B. J. Castner, R. Davis, H. R. Clarke, M. Petersen, J. N. Fitzner, D. P. Cerretti, C. J. March, R. J. Paxton, R. A. Black, and W. Bode, "Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor- α -converting enzyme," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 7, pp. 3408–12, Mar. 1998.
- [18] W. Bode, F. Grams, P. Reinemer, F. X. Gomis-Rüth, U. Baumann, D. B. McKay, and W. Stöcker, "The metzincin-superfamily of zinc-peptidases," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 389, pp. 1–11, Jan. 1996.
- [19] E. Tellier, M. Canault, L. Rebsomen, B. Bonardo, I. Juhan-Vague, G. Nalbone, and F. Peiretti, "The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts," *Exp. Cell Res.*, vol. 312, no. 20, pp. 3969–80, Dec. 2006.
- [20] J. D. Schlondorff, J. Becherer and C. P. Blobel, "Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor α convertase (TACE)," *Biochem. J.*, vol. 138, no. 347, pp. 131–138, 2000.
- [21] G. Murphy, "Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the 'Sheddases'," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, no. 2, pp. 138–45, Apr. 2009.
- [22] J. D. Leonard, F. Lin, and M. E. Milla, "Chaperone-like properties of the prodomain of TNF α -converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch," *Biochem. J.*, vol. 387, no. Pt 3, pp. 797–805, May 2005.

- [23] K. Endres, A. Anders, E. Kojro, S. Gilbert, F. Fahrenholz, and R. Postina, "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-converterases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation," *Eur. J. Biochem.*, vol. 270, no. 11, pp. 2386-2393, Jun. 2003.
- [24] T. Ding, L. Li, K. Zhu, W. Huang, and Y. Yang, "Relationship between the increase of secretion of sTNF alpha induced by lipopolysaccharides and the enhanced expression of TACE mRNA in HL-60 cells and adhesive cells from human spleen.," *J. Tongji Med. Univ.*, vol. 21, no. 4, pp. 265-8, 279, Jan. 2001.
- [25] S. Majka, P. G. McGuire, and A. Das, "Regulation of matrix metalloproteinase expression by tumor necrosis factor in a murine model of retinal neovascularization.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 43, no. 1, pp. 260-6, Jan. 2002.
- [26] I. R. Patel, M. G. Attur, R. N. Patel, S. a Stuchin, R. a Abagyan, S. B. Abramson, and a R. Amin, "TNF-alpha convertase enzyme from human arthritis-affected cartilage: isolation of cDNA by differential display, expression of the active enzyme, and regulation of TNF-alpha.," *J. Immunol.*, vol. 160, no. 9, pp. 4570-9, May 1998.
- [27] M. Bzowska, K. Jura, A. Lassak, R. a Black, and J. Bereta, "Tumour necrosis factor-alpha stimulates expression of TNF-alpha converting enzyme in endothelial cells.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 271, no. 13, pp. 2808-20, Jul. 2004.
- [28] T. Rzymiski, a Petry, D. Kračun, F. Rieß, L. Pike, a L. Harris, and a Görlach, "The unfolded protein response controls induction and activation of ADAM17/TACE by severe hypoxia and ER stress.," *Oncogene*, vol. 31, no. 31, pp. 3621-34, Aug. 2012.
- [29] Y. Yamashita, M. Hishinuma, and M. Shimada, "Activation of PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during in vitro maturation of porcine COCs.," *J. Ovarian Res.*, vol. 2, no. 20, Jan. 2009.
- [30] J. Zou, F. Zhu, J. Liu, W. Wang, R. Zhang, C. G. Garlisi, Y.-H. Liu, S. Wang, H. Shah, Y. Wan, and S. P. Umland, "Catalytic activity of human ADAM33.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 11, pp. 9818-30, Mar. 2004.
- [31] a Armour, P. M. Slocumbe, a Webster, M. Butler, C. G. Knight, B. J. Smith, P. E. Stephens, C. Shelley, M. Hutton, V. Knäuper, a J. Docherty, and G. Murphy, "TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3.," *FEBS Lett.*, vol. 435, no. 1, pp. 39-44, Sep. 1998.
- [32] A.-P. J. Huovila, A. J. Turner, M. Pelto-Huikko, I. Kärkkäinen, and R. M. Ortiz, "Shedding light on ADAM metalloproteinases.," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 30, no. 7, pp. 413-22, Jul. 2005.
- [33] J. R. Doedens, R. M. Mahimkar, and R. a Black, "TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 308, no. 2, pp. 331-338, Aug. 2003.
- [34] F. Peiretti, P. Deprez-Beauclair, B. Bonardo, H. Aubert, I. Juhan-Vague, and G. Nalbone, "Identification of SAP97 as an intracellular binding partner of TACE.," *J. Cell Sci.*, vol. 116, no. Pt 10, pp. 1949-57, May 2003.
- [35] Y. Zheng, J. Schlondorff, and C. P. Blobel, "Evidence for regulation of the tumor necrosis factor alpha-convertase (TACE) by protein-tyrosine phosphatase PTPH1.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 45, pp. 42463-70, Nov. 2002.
- [36] P. J. K. Kuppen, L. E. Jonges, C. J. H. Van De Veldel, A. L. Vahrmeijer, R. Tollenaar, and I. H. M. B. Rinkes, "Liver and tumour tissue concentrations of TNF- α in cancer patients treated with TNF- α and melphalan by isolated liver perfusion.," *Br. J. Cancer*, vol. 75, no. 10, pp. 1497-1500, 1997.
- [37] M. Kriegler, C. Perez, K. DeFay, I. Albert, and S. D. Lu, "A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF.," *Cell*, vol. 53, no. 1, pp. 45-53, Apr. 1988.
- [38] a J. Gearing, P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, a H. Davidson, a H. Drummond, W. a Galloway, R. Gilbert, and J. L. Gordon, "Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases.," *Nature*, vol. 370, no. 6490, pp. 555-7, 18-Aug-1994.
- [39] R. M. Locksley, N. Killeen, and M. J. Lenardo, "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology.," *Cell*, vol. 104, no. 4, pp. 487-501, Feb. 2001.
- [40] K. A. Charles, H. Kulbe, R. Soper, M. Escorico-correia, T. Lawrence, A. Schultheis, P. Chakravarty, R. G. Thompson, G. Kollias, J. F. Smyth, F. R. Balkwill, and T. Hagemann, "The tumor-promoting actions of TNF- α involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans.," *J. Chem. Invest.*, vol. 119, no. 10, pp. 34-36, 2009.
- [41] R. A. Black, J. R. Doedens, R. Mahimkar, R. Johnson, L. Guo, a Wallace, D. Virca, J. Eisenman, J. Slack, B. Castner, S. W. Sunnarborg, D. C. Lee, R. Cowling, G. Jin, K. Charrier, J. J. Peschon, and R. Paxton, "Substrate specificity and inducibility of TACE (tumour necrosis factor alpha-converting enzyme) revisited: the Ala-Val preference, and induced intrinsic activity.," *Biochem. Soc. Symp.*, no. 70, pp. 39-52, Jan. 2003.
- [42] F. Porteu and C. Nathan, "Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils.," *J. Exp. Med.*, vol. 172, no. 2, pp. 599-607, Aug. 1990.
- [43] C. Badoual, G. Bouchaud, N. E. H. Aguezny, E. Mortier, S. Hans, A. Gey, F. Fernani, S. Peyrard, P. L. -Puig, P. Bruneval, J. Sastre, A. Plet, L. Garriague-Antar, F. Quintin-Colonna, W. H. Fridman, D. Brasnu, Y. Jacques, and E. Tartour, "The soluble alpha chain of interleukin-15 receptor: a proinflammatory molecule associated with tumor progression in head and neck cancer.," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 10, pp. 3907-14, May 2008.
- [44] T. a Springer, "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.," *Cell*, vol. 76, no. 2, pp. 301-14, Jan. 1994.
- [45] K. J. Garton, P. J. Gough, J. Philalay, P. T. Wille, C. P. Blobel, R. H. Whitehead, P. J. Dempsey, and E. W. Raines, "Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17).," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 39, pp. 37459-64, Sep. 2003.
- [46] K. J. Garton, P. J. Gough, C. P. Blobel, G. Murphy, D. R. Greaves, P. J. Dempsey, and E. W. Raines, "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1).," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 41, pp. 37993-8001, Oct. 2001.
- [47] R. R. Koenen, J. Pruessmeyer, O. Soehnlein, L. Fraemohs, A. Zernecke, N. Schwarz, K. Reiss, A. Sarabi, L. Lindbom, T. M. Hackeng, C. Weber, and A. Ludwig, "Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases.," *Blood*, vol. 113, no. 19, pp. 4799-809, May 2009.
- [48] J. K. Damás, A. Boullier, T. Waehre, C. Smith, W. J. Sandberg, S. Green, P. Aukrust, and O. Quehenberger, "Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, is elevated in coronary artery disease and is reduced during statin therapy.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 12, pp. 2567-72, Dec. 2005.
- [49] E. Cavusoglu, E. Kornecki, M. B. Sobocka, A. Babinska, Y. H. Ehrlich, V. Chopra, S. Yanamadala, C. Ruwende, M. O. Salifu, L. T. Clark, C. Eng, D. J. Pinsky, and J. D. Marmur, "Association of plasma levels of F11 receptor/junctional adhesion molecule-A (F11R/JAM-A) with human arteriosclerosis.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 50, no. 18, pp. 1768-76, Oct. 2007.
- [50] C. Rio, J. D. Buxbaum, J. J. Peschon, and G. Corfas, "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4.," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 14, pp. 10379-87, Apr. 2000.
- [51] K. Reiss, A. Ludwig, and P. Saftig, "Breaking up the tie: disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion.," *Pharmacol. Ther.*, vol. 111, no. 3, pp. 985-1006, Sep. 2006.
- [52] I. Okamoto, H. Tsuiki, L. C. Kenyon, A. K. Godwin, D. R. Emlet, M. Holgado-madruga, I. S. Lanham, C. J. Joynes, K. T. Vo, A. Guha, M. Matsumoto, Y. Ushio, H. Saya, and A. J. Wong, "Short Communication Proteolytic Cleavage of the CD44 Adhesion Molecule in Multiple Human Tumors.," *Am. J. Pathol.*, vol. 160, no. 2, pp. 441-447, 2002.
- [53] O. Rosso, T. Piazza, I. Bongarzzone, A. Rossello, D. Mezzanzanica, S. Canevari, A. M. Oregno, A. Puppo, S. Ferrini, and M. Fabbì, "The ALCAM shedding by the metalloprotease ADAM17/TACE is involved in motility of ovarian carcinoma cells.," *Mol. Cancer Res.*, vol. 5, no. 12, pp. 1246-53, Dec. 2007.
- [54] G. Murphy, "The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 8, no. 12, pp. 929-41, Dec. 2008.
- [55] P. Yang, K. A. Baker, and T. Hagg, "The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair.," *Prog. Neurobiol.*, vol. 79, no. 2, pp. 73-94, Jun. 2006.
- [56] C. Brou, F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J. R. Doedens, a Cumano, P. Roux, R. a Black, and a Israël, "A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE.," *Mol. Cell*, vol. 5, no. 2, pp. 207-16, Feb. 2000.
- [57] T. Maretzky, M. Schulte, A. Ludwig, S. Rose-john, C. Blobel, D. Hartmann, P. Altevogt, P. Saftig, and K. Reiss, "L1 Is Sequentially Processed by Two Differently Activated Metalloproteases and Presenilin / Gamma -Secretase and Regulates Neural Cell Adhesion , Cell Migration , and Neurite Outgrowth.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 20, pp. 9040-9053, 2005.
- [58] J. D. Buxbaum, K. N. Liu, Y. Luo, J. L. Slack, K. L. Stocking, J. J. Peschon, R. S. Johnson, B. J. Castner, D. P. Cerretti, and R. a Black, "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor.," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 43, pp. 27765-7, Oct. 1998.
- [59] B. Vincent, E. Paitel, P. Saftig, Y. Frobert, D. Hartmann, B. De Strooper, J. Grassi, E. Lopez-Perez, and F. Checler, "The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 41, pp. 37743-6, Oct. 2001.
- [60] J. Arribas and C. Esselens, "ADAM17 as a therapeutic target in multiple diseases.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 15, no. 20, pp. 2319-35, Jan. 2009.
- [61] J. Pruessmeyer and A. Ludwig, "The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer.," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, no. 2, pp. 164-74, Apr. 2009.
- [62] Y. Zhang, M. Hegen, J. Xu, J. C. Keith, G. Jin, X. Du, T. Cummons, B. J. Sheppard, L. Sun, Y. Zhu, V. R. Rao, Q. Wang, W. Xu, R. Cowling, C. L. Nicolson-Nutter, J. Gibbons, J. Skotnicki, L.-L. Lin, and J. Levin, "Characterization of (2R, 3S)-2-([(4-(2-butynyloxy)phenyl)sulfonyl]amino)-N,3-dihydroxybutanamide, a potent and selective inhibitor of TNF-alpha converting enzyme.," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 4, no. 14, pp. 1845-57, Dec. 2004.
- [63] M. Tanaka, D. Nanba, S. Mori, F. Shiba, H. Ishiguro, K. Yoshino, N. Matsura, and S. Higashiyama, "ADAM binding protein Eve-1 is required for ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 40, pp. 41950-9, Oct. 2004.

MYGENAZA - EKSPRESJA I OCZYSZCZENIE TERMOSTABILNEJ POLIMERAZY PFU

Kajetan Sawa¹, Monika Filipiak¹, Weronika Serafin¹, Dawid Żyła^{1,2}

¹Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Koło Naukowe Studentów Biotechnologii „Mygen”

²Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Zakład Biochemii Fizycznej

Praca napisana pod opieką: dr Magdaleny Tworzydło

Streszczenie: Termostabilne polimerazy DNA znajdują szerokie zastosowanie w biologii molekularnej od 1976 roku, kiedy z termofila *Thermus aquaticus* wyizolowano polimerazę Taq. Polimeraza Taq zrewolucjonizowała biologię molekularną, ponieważ pozwalała na szybkie i łatwe powielenie DNA w łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. PCR – Polymerase Chain Reaction). Dawniej prowadzenie takiej reakcji było trudne, czasochłonne i kosztowne. Kolejne odkrycia zaowocowały polimerazą Pfu, wyizolowaną z archeobakterii *Pyrococcus furiosus* przez zespół Lundberga. W trakcie badań porównano działanie obu polimeraz i wykazano, że polimeraza Taq jest szybsza, jednak Pfu posiada wyższą nawet kilkuset krotnie dokładność. Wysoka precyzja działania jest czynnikiem, przez który polimeraza Pfu jest częściej wybierana w pewnych przypadkach m.in. sprawy kryminalne czy modyfikacje genetyczne.

Założeniem pracy Koła Naukowego było uzyskanie aktywnej termostabilnej polimerazy DNA przy niskim nakładzie finansowym. Celem projektu była nadekspresja polimerazy Pfu i jej oczyszczenie z wykorzystaniem własności termostabilnych. Kolejne kroki zawierały wysalanie przy użyciu siarczanu amonu oraz dializę do buforu końcowego. Po oczyszczeniu wykonano porównanie z komercyjnie dostępną polimerazą Pfu i zbadano właściwości termostabilne białka, celem zmierzenia jakości produktu i znalezienia miejsca na ewentualne poprawki w przyszłych projektach.

Wstęp

Polimerazy stanowią grupę enzymów, które łączą nukleotydy kwasów nukleinowych w polimery. Gdy mówimy, że enzym posiada aktywność polimerazy DNA (lub RNA), oznacza to, że może on syntetyzować cząsteczki DNA (lub RNA) bazując na matrycy DNA (lub RNA) i wykorzystując komplementarność zasad azotowych. Aby precyzyjnie opisywać te enzymy, mówimy np. o polimerazie RNA zależnej od DNA – bierze ona udział w transkrypcji. Polimerazy DNA i RNA występują we wszystkich organizmach żywych, również w wirusach, ponieważ pełnią niezastąpioną funkcję w rozmnażaniu (replikacja DNA) oraz syntezie białek (transkrypcja).

Termostabilne polimerazy DNA to takie, które nie ulegają denaturacji w temperaturze do 100°C. Od odkrycia polimerazy Taq w 1976r.2 przez Alice Chain, Davida B. Edgara i Johna M. Trelę, którzy wyizolowali ją z ekstremalnego termofila, bakterii *Thermus aquaticus*, znalazły one szerokie zastosowanie w wielu różnych dziedzinach, między innymi: kryminalistyce, genetyce, zoologii, filogenezie, medycynie oraz, przede wszystkim, w biologii molekularnej. Poprzez użycie jej w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR – Polymerase Chain Reaction) zrewolucjonizowała ona tę i inne dziedziny, umożliwiając

klonowanie, modyfikacje DNA i szereg innych czynności, które do tej pory były niemożliwe bądź czasochłonne i drogie. Reakcja łańcuchowa polimerazy [1] służy powieleniu fragmentu DNA do uzyskania bardzo dużych ilości. Znając sekwencję danego fragmentu DNA, np. plazmidu, można wybrać lub stworzyć startery, czyli krótkie fragmenty DNA komplementarne do części powielanej, które pozwolą polimerazie DNA na przyłączenie się i rozpoczęcie procesu wydłużania nici bazując na drugiej. Należy więc przeprowadzić denaturację w wysokiej temperaturze (powyżej 90°C), żeby rozdzielić 2 nici DNA, a następnie ochłodzić próbkę do temperatury odpowiedniej dla przyłączenia starterów do nici macierzystych. Aby rozpocząć wydłużanie nici DNA, trzeba osiągnąć temperaturę optymalną dla działania polimerazy – dla polimeraz Taq i Pfu wynosi ona 70-75°C. Elongacja to ostatni proces w cyklu. Dalej następuje ponowna denaturacja, przyłączanie, wydłużanie etc. Zanim odkryto polimerazę Taq, po każdym cyklu konieczne było dodanie nowej polimerazy, ponieważ wysoka temperatura powoduje denaturację większości enzymów. Utrudniało to znacząco cały proces a także podnosiło jego

koszt i właśnie dlatego termostabilne polimerazy były rewolucją na miarę maszyny parowej w przemyśle.

Polimeraza Taq, mimo swoich wszystkich zalet, miała poważną wadę: stosunkowo często popełniała błędy – 1 błędnie wstawiony nukleotyd na 9 000 [1]. Bariere tę udało się pokonać w roku 1991 [3], kiedy zespół K. Lundberga zauważył wysoką precyzję termostabilnej polimerazy DNA Pfu z *Pyrococcus furiosus*. Każda polimeraza DNA popełnia błędy, tj. z pewną częstością wprowadza niewłaściwy nukleotyd. W naturalnej replikacji istnieją różne mechanizmy naprawcze, między innymi aktywność nukleazy 3'-5'. Taka aktywność, której nie posiada polimeraza Taq, może zwiększyć precyzję replikacji nawet tysiąc-krotnie [1]. Polimeraza Pfu, w przeciwieństwie do Taq, posiada aktywność egz nukleazy 3'-5', co umożliwia jej poprawianie własnych błędów. Jej dokładność jest dwa rzędy wielkości większa, co oznacza 1 błąd na 2 800 000 nukleotydów [1]. Dzięki tym cechom polimeraza Pfu jest częściej wybierana do zadań, gdzie precyzja jest istotna, takich jak badania sądowe czy modyfikacje genetyczne. Wadą polimerazy Pfu jest jednak dużo niższa szybkość prowadzenia reakcji. Aby zniwelować wyżej wymienione wady obu enzymów w praktyce często stosuje się ich mieszaninę uzyskując w ten sposób szybkość wydłużania DNA dużo wyższą niż dla polimerazy Pfu oraz produkty zawierające mniej błędów niż gdyby do ich namnożenia użyto samej polimerazy Taq. Inną metodą jest też wykorzystanie enzymów zmodyfikowanych. Takim enzymem jest polimeraza Phusion. Polimeraza ta jest polimerazą Pfu, która uległa modyfikacji polegającej na wprowadzeniu do białka dodatkowej sekwencji podnoszącej procesywność, w efekcie zwiększającą szybkość i dokładność enzymu. Wedle danych producenta, polimeraza Phusion popełnia 6 razy mniej błędów niż polimeraza Pfu i 50 razy mniej niż polimeraza Taq, zachowując przy tym szybkość polimerazy Taq.

Celem pracy było uzyskanie aktywnej polimerazy DNA dla Koła Naukowego Studentów Biotechnologii „Mygen” przy możliwie niskim nakładzie finansowym, a także wprowadzenie studentów I roku w pracę laboratoryjną i zapoznanie ich z podstawowymi technikami wykorzystywanymi w izolacji białek, oraz z zagadnieniami genetyki molekularnej i mikrobiologii.

Materiały i metody

Przy oczyszczaniu termostabilnych polimeraz skorzystano z metody zaproponowanej przez Richmonda [4]. Do otrzymania białka użyto wektora ekspresyjnego pET11b z genem polimerazy Pfu. Wektor został wprowadzony do szczepu bakteryjnego BL21 DE3 pLysS *Escherichia coli*. Hodowle bakteryjne były prowadzone w po-

żywcze LB w obecności antybiotyków – ampicyliny (100 µg/ml) i chloramfenikolu (34 µg/ml). Chloramfenikol został użyty do selekcji bakterii z plazmidem pLysS, natomiast ampicylina służyła selekcji bakterii *E. coli* posiadających wektor pET11b.

Bakterie po transformacji wysiano na szalki Petriego z pożywką LB, antybiotykami i agarem. Następnie z pojedynczych kolonii założono w małych kolbach hodowle płynne o objętości 50 ml. Całonocne, gęste mini-hodowle zostały w kolejnym dniu wykorzystane do zaszczepienia dużych, 1,5l [półtoralitrowych] hodowli. Produkcja białka prowadzona była w kolbach o obj. 5 l w suchym inkubatorze (temp. 37°C, wytrząsanie 180 obr/min). Przyrost bakterii monitorowano mierząc gęstość optyczną zawiesiny przy długości fali 600 nm. Kiedy OD₆₀₀ osiągnęło wartość 0,6 zaindukowano ekspresję białka poprzez dodanie IPTG do stężenia 1 mM. Po ok. 6 godz. od indukcji zawiesinę komórkową zwirowano (6000 RCF, 30 min.).

Uzyskany osad bakterii zawieszono w buforze A (50 mM Tris-HCl pH 7,9; 50 mM glukozy, 1 mM EDTA) stosując następujący przelicznik: na każdy litr hodowli właściwej – 100 ml buforu. Zawiesinę zwirowano i ponownie zawieszono w buforze A (50 ml buforu na każdy litr hodowli). Następnie dodano bufor lizujący (10 mM Tris-HCl pH 7,9; 50 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 0,5% Tween 20; 0,5% Nonidet P40) (50 ml buforu na litr hodowli) i wymieszano. Lizat sonikowano w cyklach 3x1min, a następnie przeniesiono do plastikowych falkonów, umieszczono w łaźni wodnej o temperaturze 75°C na 60 minut, po czym zwirowano (15 000 RCF, 10 min, 4°C) i przeniesiono do szklanej zlewki. Białko wysolono poprzez dodanie 30 g siarczanu amonu na każde 100 ml lizatu. Zawiesinę mieszano aż do całkowitego wysolenia białka, następnie materiał zwirowano (15 000 RCF, 10 min). Do dalszej pracy zebrano zarówno osad utrzymujący się na powierzchni jak i będący na dnie. Osad zawieszono w buforze A stosując przelicznik: 20 ml buforu na każde 100 ml oczyszczonego lizatu przed wysalaniem.

Uzyskany roztwór białka dializowano wobec buforu S (50 mM Tris-HCl pH 7,9; 50 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 50% glicerol) przez 24 godziny w 4 °C, używając 500 ml buforu na każdy litr właściwej hodowli i wymieniając bufor na świeży po 12 godzinach. W efekcie otrzymano około 50 ml gotowej polimerazy w buforze S.

Aktywność polimerazy sprawdzono przeprowadzając PCR w buforze 10xPfu (200 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM MgSO₄; 100 mM KCl; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 1% Triton X-100; 1 mg/ml BSA wolnego od nukleazy). Jako matrycę wykorzystywano wektor pcDNA3.1+ zawierający gen DRD2 dla receptora dopaminowego lub pGEX3 z genem ludzkiego białka TBP. Do namnożenia genu DRD2 używano starterów D2Sall FOR i D2Xho REV, natomiast do replikacji TBP zastosowano

TBPCGSTfor oraz TBPCGSTrev. Reakcje przeprowadzono w objętości 50 μ l wykorzystując różne ilości polimerazy Pfu oraz następujące ilości pozostałych reagentów: 1 μ l matrycy (100 ng/ μ l), 1 μ l każdego ze starterów (50 μ M), 5 μ l buforu 10xPfu, 1 μ l mieszaniny dNTP (10 mM).

Otrzymane wyniki porównywano z wynikami uzyskanymi dla reakcji przeprowadzonych z wykorzystaniem komercyjnie dostępnej polimerazy PfuUltra II. Doświadczenia przeprowadzono przy zachowaniu identycznych stężeń reagentów (matrycy, starterów, dNTP) oraz ustawień termocyklera: dla TBPC-GST – 1. 5 min. 95 °C 2. 30s 98 °C 3. 30s 60 °C 4. 120s 72 °C 5. 10 min 72 °C, powtarzając kroki od 2. do 4. 31 razy; dla DRD2 – 1. 3 min. 98 °C 2. 30s 98 °C 3. 30s 55 °C 4. 60s 72 °C 5. 10 min 72 °C, powtarzając kroki od 2. do 4. 25 razy.

Aby zbadać termostabilność enzymu, próbki o objętości 50 μ l poddano inkubacji w 95°C przez 15, 30, 60, 120 i 240 minut. Następnie przeprowadzono PCR nie zmieniając wcześniej opisanych warunków reakcji.

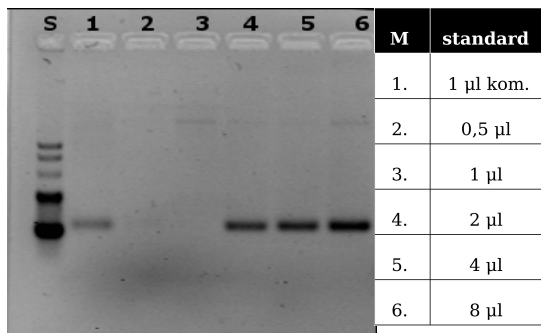
Elektroforezę DNA przeprowadzano w żelach o stężeniu agarozы 0,8% barwionych Midori Green®. Jako referencję wykorzystano standard wielkości GeneRuler® 1kb DNA Ladder.

Wyniki

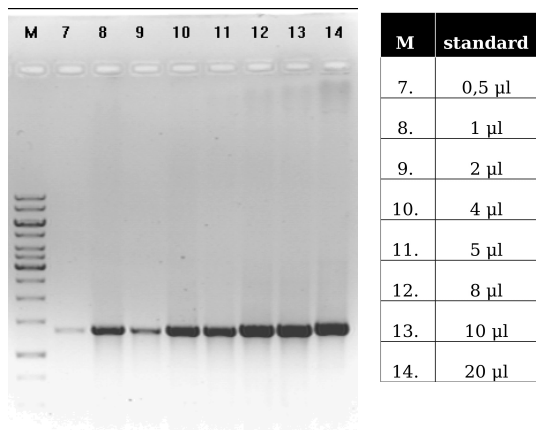
Aktywność polimerazy Pfu zmierzono poprzez użycie w reakcji różnych objętości enzymu. Otrzymany wynik był zgodny z przewidywaniami – wraz ze zwiększeniem ilości użytej polimerazy rosła też ilość produktu (zdjęcie 1). Odstępstwo od tej reguły można zaobserwować jedynie w przypadku reakcji, w której użyto 2 μ l polimerazy. Jest ono jednak najprawdopodobniej efektem błędu przy nakładaniu próbki na żel. Przy wykorzystaniu 0,5 μ l enzymu ilość produktu jest niewielka. Najwięcej produktów otrzymano w reakcji, gdzie użyto 20 μ l polimerazy. W analizowanym zakresie stężeń polimerazy nie wykazano takiego, który hamowałby przyrost produktu.

Porównano również wyniki otrzymane dla polimerazy Pfu z rezultatami uzyskanymi dla polimerazy dostępnej komercyjnie. Po rozdzielu elektroforetycznym nie zauważono produktu o pożądanej wielkości w przypadku użycia 0,5 i 1 μ l polimerazy. Natomiast po zastosowaniu 2 μ l próbek jest wyraźniejszy niż w porównaniu do tego powstałego przy udziale polimerazy PfuUltra II. Dzięki użyciu 2-4 μ l polimerazy Pfu na 50 μ l mieszaniny PCR otrzymuje się zadowalającą ilość produktu, którą w razie potrzeby można podwyższyć poprzez zastosowanie większej objętości enzymu.

W ostatnim z przeprowadzonych doświadczeń zbadano wrażliwość polimerazy Pfu na działanie wysokiej temperatury (zdjęcie 3). Polimeraza praktycznie nie straciła aktywności nawet po 60 minutach inkubacji w temperaturze 95°C. Po 2

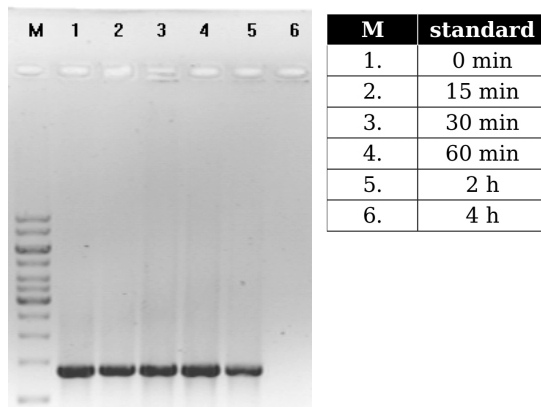


Zdj. 1 Różna ilość produktu w zależności od objętości użytej polimerazy, zawartość studni zgodnie z tabelą.



Zdj. 2 Porównanie wydajności polimeraz Pfu i PfuUltra II od Agilent Technologies. W pierwszej studni użyta komercyjna polimeraza zgodnie z zaleceniami producenta, zawartość studni zgodnie z tabelą.

godzinach inkubacji w wysokiej temperaturze zanotowano istotny spadek ilości produktu PCR, natomiast po 4 godzinach nie stwierdzono śladu produktu. Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, że oczyszczona polimeraza Pfu może być z powodzeniem wykorzystywana do PCR z długimi cyklami.



Zdj. 3 Badanie termostabilnych właściwości polimerazy, czas inkubacji poszczególnych próbek podany w tabeli.

Wnioski końcowe

Projekt Mygenaza 2013 zakończył się sukcesem. Otrzymana polimeraza Pfu jest aktywna. Została rozdana do wielu zakładów na WBBiB, gdzie może być wykorzystywana jako tani zamiennik komercyjnych polimeraz. Jednak aby otrzymać podobne rezultaty należy użyć enzymu w odpowiednim stężeniu (2-4 μ l na 50 μ l reakcji). Biorąc pod uwagę koszty projektu i polimerazy Pfu z New England BioLabs5 otrzymano produkt, który teoretycznie może przynieść oszczędności ok. 30-60 tys. złotych. Aktywność enzymu nie ulega zmianie do godziny w temperaturze 95°C, można więc przeprowadzać reakcje wielocyklowe lub o wydłużonym czasie denaturacji. W przypadku ponownego przeprowadzenia pro-

jektu można podjąć próby optymalizacji procesów ekspresji i oczyszczania celem zwiększenia aktywności polimerazy. Wymagałoby to jednak bardziej doświadczonych pracowników, a opisany projekt miał głównie zadanie edukacyjne. Jako drużyna przeprowadzająca doświadczenie chcielibyśmy podziękować KNSB „Mygen” za przygotowanie i zorganizowanie projektu, a w szczególności Dawidowi Żyle za przewodnictwo nad nami, Janowi Majcie i Dawidowi Denece za wsparcie. Szczególne wyrazy wdzięczności należą się dr Magdalenie Tworzydło z Zakładu Biochemii Fizycznej WBBiB UJ za pomoc w laboratorium oraz całemu Zakładowi Biochemii Fizycznej za udostępnienie miejsca, narzędzi i odczynników do pracy.

Piśmiennictwo:

- [1] Bereta J., Koj A.: Zarys biochemii, Kraków 2009
- [2] Chien A., Edgar D.B., Trela J.M.: Deoxyribonucleic acid polymerase from extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127 [1976] 1150-1156
- [3] Lundberg K.S., Shoemaker D.D., Adams M.W.W., Short J.M., Sorge J.A., Mathur E.J.: High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108 [1991] 1-6
- [4] Protokół oczyszczania - Richmond T.: Rapid purification of high-activity Taq or Pfu DNA polymerase, 2001, na podstawie: Pluthero, F.G.: Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Research* 21 [1993] 4850-4851
- [5] <https://www.neb.com/products/m0530-phusion-high-fidelity-dna-polymerase> - strona producenta

**Otwieramy nabór artykułów do piątego wydania Acta Mygenica!
Zapraszamy do udziału w tym przedsięwzięciu i przesyłaniu publikacji na
adres jan.majta@gmail.com.**

Pisząc artykuły prosimy kierować się wymaganiami redakcyjnymi zamieszczonymi poniżej.

1. Umieszczenie w nagłówku „Praca napisana pod opieką: xx Xxx Xxxxx”

2. Struktura wg schematu

Tytuł

autor

afiliacja

Abstrakt: Treść abstraktu

Treść:

•Treść publikacji z akapitami. Śródtytuły (Materiały i Metody, Dyskusja itp) oddzielone z góry i z dołu wolną linią. **Prosimy nie używać tabulatorów ani sekwencji kilku spacji.**

•Odnosniki do bibliografii zamieszczane powinny być w klamerkach np. [1]

•Prosimy nie pisać dużymi literami tekstu innego niż oznaczenia itp. Jeśli coś ma być napisane w sposób *szczególny* proszę oznaczyć to w tekście komentarzem w następujący sposób // treść komentarza //.

•Wszelkie grafiki, tabele etc. Powinny być zapisane z wysoką rozdzielczością w formacie .jpg z nazwą wg wzoru Nazwisko_Fig1.jpg.

•Prosimy nie umieszczać w tekście obrazków a jedynie podpisy po nimi oddzielone z góry i z dołu wolną linią.

w razie potrzeby można załączyć szczegółowe informacje co do składu.

Bibliografia:

[1] Nazwisko gł. autora Tytuł Czasopismo Rok Vol. Str.

[2] Dumoulin M, et. al. A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme. Nature. 2003 Aug 14;424(6950):783-8

(PubMed -> DisplaySettings -> Summary Text)

Pliki w formacie .doc powinny mieć nazwy Nazwisko_AMIV.doc

**Prosimy o brak formatowania tekstu, zwłaszcza indeksów,
automatycznej numeracji itp - zostanie zmienione w trakcie
składu czasopisma.**

