

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

POSTBAH 33 (4)
(393—656) (1987)

1987

tom 33 nr 4

PL ISSN 0032—5422



Pw

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

TOM 33 ZESZYT 4
1987

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 33 (4)
(393-656) (1987)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: A. Legocki (Poznań)

Zastępca przewodniczącego: I. Szumiel (Warszawa)

Sekretarz: B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa)

Członkowie: S. Angielski (Gdańsk), M. Chorąży (Gliwice), E. Czuryło (Warszawa), M. Fikus (Warszawa), E. Gąsior (Lublin), M. Gumińska (Kraków), D. Hulanicka (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa), J. Kwiatkowska (Wrocław), S. Lewak (Warszawa), A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), K. Raczyńska-Bojanowska (Warszawa),

REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

ZASTĘPCY REDAKTORA NACZELNEGO

G. Palamarczyk

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

A. Jerzmanowski
Instytut Biochemii UW
ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

SEKRETARZ REDAKCJI

B. Kamińska

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

CZŁONKOWIE REDAKCJI: B. Czartoryska (Warszawa), J. Skangiel-Kramska (Warszawa), J. Zborowski (Warszawa)

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1987

Nakład 1720 (1530+90)	Oddano do składania 16.VII.1987 r.
Ark. wyd. 20,5, ark. druk. 16,5	Podpisano do druku w marcu 1988 r.
Pap. druk. sat. kl. III, 70 g, 70×100	Druk ukończono w marcu 1988 r.
Zam. 4664/12/87	Cena zł 160,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa



PROFESOR

MARIA GABRIELA SARZAŁA-DRABIKOWSKA

1936—1987



Dnia 12 lutego 1987 roku zmarła niespodziewanie, w pełni sił twórczych profesor doktor habilitowany Maria Gabriela Sarzała-Drabikowska. Wybitny biochemik, specjalistka w zakresie biochemii błon biologicznych, kierownik Pracowni Biomembran Komórek Kurczliwych w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, z którym związana była przez cały okres swojego życia naukowego.

Urodzona w 1936 roku w Rębowie, jako studentka Wydziału Biologii i Nauki o Ziemi, w 1959 r. wykonała w Instytucie pracę magisterską, a już wówczas ujawnione zdolności i predyspozycje do prowadzenia badań naukowych zdecydowały o przyjęciu Jej do grona stałych pracowników Instytutu. Wczesne Jej prace badawcze dotyczyły enzymów biorących udział w procesach metabolizmu i wchłaniania lipidów w przewodzie pokarmowym zwierząt. Badania nad fosfatazą kwasu fosfatydowego w jelicie były przedmiotem Jej pracy doktorskiej, zakończonej uzyskaniem stopnia doktora nauk przyrodniczych w 1966 r. Duży wpływ na Jej dalszą pracę naukową miał staż w Uniwersytecie w Utrechcie w latach 1968—1969, który skierował Jej zainteresowania na komponentę lipidową błon biologicznych. Badania swe prowadzone nad metabolizmem i rolą lipidów w funkcjonowaniu błon komórki mięśniowej — sarkolemy i błon sarkoplazmatycznego retikulum rozszerzyła też na badania białek błonowych. W 1973 roku M. Gabriela Sarzała-Drabikowska została kierownikiem nowoutworzonej Pracowni Biomembran Komórek Kurczliwych. W roku 1975 uzyskała stopień doktora habilitowanego a w roku 1983 została mianowana profesorem nadzwyczajnym. W ostatnich latach Jej zainteresowania naukowe koncentrowały się na zmianach zachodzących w błonach mięśniowych w czasie rozwoju i w stanach patologicznych. Szczególnie interesujące są Jej badania nad molekularną organizacją błon, zwłaszcza asymetrycznym rozmieszczeniem ich składników. Opublikowała 42 prace eksperymentalne w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i 5 artykułów przeglądowych. W uznaniu Jej zasług naukowych zespół kierowany przez profesor Sarzałę-Drabikowską otrzymał dwukrotnie (w latach 1973 i 1978) nagrodę Sekretarza Naukowego PAN. Była członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Komitetu Cytobiologii. Prowadziła szeroką współpracę z laboratoriami polskim i zagranicznymi. Szczególnie owocne i ważne były Jej kontakty z Uniwersystemem w Londynie i placówkami naukowymi we Włoszech. Jako ceniony i uznany biochemik bywała często zapraszana do udziału w międzynarodowych zjazdach, sympozjach i szkołach biochemicznych.

Miała szerokie zainteresowania i dużą wiedzę, którą się chętnie dzieliła. Wychowała wielu pracowników naukowych. Pod Jej opieką zostało wykonanych 6 prac doktorskich, a 3 dalsze doktoraty Jej wychowanków są kwestią najbliższej przyszłości. Jedna z Jej współpracowniczek uzyskała stopień doktora habilitowanego. Jako kierownik prac doświadczalnych wykazywała wiele inicjatywy, była wymagająca, ale niezwykle wyrozumiała i życzliwa, i potrafiła wytworzyć klimat harmonijnej współpracy.

Tak wczesne odejście Profesor Sarzały-Drabikowskiej jest dotkliwą stratą dla Jej współpracowników i kolegów. Pozostanie w ich pamięci nie tylko jako wybitny biochemik, ale również jako serdeczny opiekun i przyjaciel.

Uczniowie i przyjaciele

ARTYKUŁY

MAGDALENA JUNG*,
WŁODZIMIERZ ZAGÓRSKI**

Genom HIV (HTLV-III, LAV) — ludzkiego wirusa braku odporności immunologicznej

Genome of HIV (HTLV-III, LAV) — human immunodeficiency virus

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Dane epidemiologiczne
- III. Systematyka, izolowanie, nazewnictwo i morfologia wirusów AIDS
- IV. Budowa genomu, charakterystyka czynności poszczególnych genów
- V. Zmienność genomu HIV
- VI. Mechanizmy regulacji ekspresji genów HIV: *tat* — *TAR*; *trs* i składanie genowe
- VII. Miejsce HIV w grupie retrowirusów
- VIII. Odmiany HIV i pokrewne mu wirusy małpie

Table of contents:

- I. Introduction
- II. Epidemiological data
- III. Systematics, isolation, nomenclature, and morphology of AIDS viruses
- IV. Structure of genome, and functions of specific genes
- V. Variability in HIV genome
- VI. Regulation of HIV genes expression: *tat* — *TAR*; *trs* and splicing
- VII. Systemic status of HIV
- VIII. HIV variants and related simian viruses

Wykaz stosowanych skrótów:

HIV, LAV, HTLV-III — ludzki wirus braku odporności GRID, AIDS — zespół nabytego braku odporności HTLV-I, HTLV-II — ludzki wirus limfotropowy typ I i II, HTLV-IV — ludzki wirus braku odporności immunologicznej typ IV, STLV-III_{AGM}, STLV-III_{MAC} — małpi wirus braku odporności immunologicznej typ AGM i MAC, TIAV — wirus białaczki zakaźnej (koński), ALV — wirus białaczki złośliwej (ptasi), BLV — wirus białaczki (cielęcy), Mo-MuLV — wirus białaczki limfatycznej (mysi) szczep Moloneya, RSV — wirus mięsaka Rousa (ptasi), *gag* — gen kodujący białka strukturalne wirusa, *pol* — gen kodujący odwrotną transkryptazę, *env* — gen kodujący glikoproteiny otoczki, *so* — krótka otwarta ramka odczytu (ang. short open reading frame), *3'orf* — otwarta ramka odczytu kodująca

Zakład Biosyntezy Białka, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa 02-532,
ul. Rakowiecka 36

* Mgr, ** prof. dr hab.

białko o masie 27 000, TAR — sekwencja będąca receptorem dla transaktywatora (ang. trans-acting responsive sequence), TAT — regulacja genów poprzez transaktywację, tat-III — peptyd transaktywujący, *trs*, *art* — gen kodujący potencjalny regulator cięcia i składania RNA (ang. trans-acting regulator of splicing), x-LOR — gen kodujący regulator transkrypcji w genomie HTLV-I i HTLV-II, NCR — region kodujący drugi ekson peptydu tat-III

I. Wprowadzenie

Jedną z nowych chorób cywilizacyjnych, znaną nam wszystkim z relacji choćby prasowych jest zespół nabytego braku odporności immunologicznej — wywołowany przez ludzki retrowirus, przekazywany głównie drogą płciową. Artykuł ten jest poświęcony omówieniu budowy genomu tego wirusa.

Badania nad strukturą i funkcją genomu HIV są istotne z punktu widzenia etiologii choroby, jak również dostarczają nowych danych na temat funkcjonowania układu immunologicznego i ekspresji genów w ludzkich komórkach. Zagrożenie nową pandemią spowodowało koncentrację wysiłków wirusologów molekularnych na tych badaniach.

W ciągu dwóch lat (1983—1985) wirus został wyizolowany, a genomy jego szczepów zsekwencjonowane. Uzyskaliśmy względnie pełny obraz czynności poszczególnych fragmentów genomu HIV. Należy to traktować jako jedno z ważnych osiągnięć biologii molekularnej, istotny etap w opracowywaniu strategii zwalczania tej groźnej choroby.

II. Dane epidemiologiczne

Raporty Ośrodka Kontroli Chorób w Atlancie w USA z 1981 r. wykazały nagły wzrost zużycia leków stosowanych przy zapaleniu płuc spowodowanych pierwotniakiem *Pneumocystis carinii*. Ten rzadki rodzaj zapalenia płuc występuje zazwyczaj u pacjentów, u których funkcjonowanie systemu immunologicznego jest poważnie zakłócone. Jednocześnie w Kalifornii stwierdzono wystąpienie tego typu zapalenia płuc u pięciu młodych mężczyzn uprzednio nie wykazujących żadnych objawów spadku odporności. Wszyscy pacjenci mieli jedną wspólną cechę — byli homoseksualistami. W związku z tym początkowo nową chorobę nazwano GRID (gay related immunodeficiency). Później okazało się, że nie tylko homoseksualiści padają jej ofiarą i stąd nowa nazwa określająca wyłącznie medyczny punkt widzenia: AIDS — acquired immune deficiency syndrome czyli: zespół nabytego braku odporności immunologicznej. Wkrótce określono tzw. grupy wysokiego ryzyka, wśród których prawdopodobieństwo zachorowania jest największe. Są to: homoseksualiści, chorzy na hemofilię, narkomani pobie-

rający narkotyki dożylnie, prostytutki, chorzy, u których występuje konieczność stosowania częstych transfuzji, kobiety współżyjące z osobnikami biseksualnymi [1]. Ponieważ infekcja przenosi się w sposób poziomy (nie jest przekazywana genetycznie), podejrzewano występowanie czynnika infekcyjnego odpowiadającego za jej powstawanie [2]. I rzeczywiście, z krwi chorych wyizolowano czynnik uważany za patogeniczny w tej chorobie [3, 4, 5] — jest to wirus z grupy retrowirusów (patrz dalej), a z surowicy krwi — przeciwciała przeciwko antygenom tego wirusa [6, 7]. Choroba jest przenoszona drogą płciową oraz przez krew. Wirus był wyizolowany z krwi [3, 4, 5], szpiku kostnego, gruczołów limfatycznych [3], komórek śledziony, plemników [8, 9], komórek układu nerwowego oraz śliny [9]. Skażenia stwierdzono również w bankach krwi, spermy i narządów używanych do transplantacji (rogówki). Szczególne zagrożenie homoseksualistów nie wynika z samego charakteru kontaktów seksualnych, a raczej z ich częstotliwości, przypadkowości w doborze partnerów, a także znacznej podatności śluzówki rectum na mechaniczne uszkodzenia, co ułatwia przedostawanie się wirusa do krwi. Przypuszczalnie homoseksualiści byli pierwszą grupą w USA i w Europie, która zetknęła się z wirusem i stąd początkowe rozprzestrzenianie się HIV w jej obrębie [10].

Obraz choroby jest bardzo złożony ze względu na mnogość objawów. Chorzy cierpią na ciągle stany podgorączkowe i wysokie temperatury, obrzęki gruczołów limfatycznych, zaburzenia funkcjonowania układu limfatycznego np. trombocytopenię (zmniejszenie liczby płytek krwi), nocne poty, biegunki, utratę wagi. W późniejszych etapach pojawiają się dysfunkcje centralnego układu nerwowego takie jak: encefalopatia, demencja, całkowite osłabienie świadomości, zaburzenia ruchu oraz niedowład mięśni. Końcowej fazie choroby towarzyszą różnego rodzaju nowotwory, w tym również złośliwe jak np. mięsak Kaposi'ego, chłoniaki i białaczki. Symptomatyczne dla przebiegu choroby jest częste występowanie rozmaitych infekcji towarzyszących wywołanych przez bakterie, wirusy, grzyby, pierwotniaki i inne pasożyty zwykle nie chorobotwórcze [11]. Są to tak zwane infekcje oportunistyczne. Obraz morfologiczny krwi u chorych na AIDS wykazuje znaczny spadek liczby limfocytów T, a szczególnie tych, które mają na swej powierzchni receptory T4 [12, 13].

Czynnikiem etiologicznym AIDS jest wirus należący do grupy retrowirusów (nota bene jeden z trzech dotychczas znanych retrowirusów ludzkich), wykazujący tropizm w stosunku do podgrupy limfocytów T zwanych pomocniczymi (helper). Początkowo nazwano go LAV (ang. lymphadenopathy associated virus), lub HTLV-III (ang. human T-cell lymphotropic virus) [1, 10]. Pozostałe dwa ludzkie retrowirusy: HTLV-I [14] i HTLV-II wykazują także powinowactwo do limfocytów T4. HTLV-I powoduje ostrą formę limfoidalnej białaczki u osób dorosłych, natomiast występowanie HTLV-II wiąże się z rzadką postacią białaczki zwanej białaczką włochato-komórkową [10]. Różnica w końcowym efekcie działania tych

trzech wirusów jest bardzo znaczna: podczas gdy HTLV-I i HTLV-II powodują nieograniczoną proliferację limfocytów T4, HIV je zabija — stąd spadek liczby limfocytów T4 u pacjentów z AIDS [1].

Limfocyty T4 odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej organizmu na antygen. Pobudzają one limfocyty T8 — cytotoksyczne — zdolne zniszczyć konkretny cel i stymulują działanie makrofagów oraz produkcję przeciwciał przez limfocyty B. Zakażone przez HIV limfocyty T4 działają nieprawidłowo i nie namnażają się, bowiem nie wytwarzają odpowiedniej limfokiny — interleukiny 2 (IL-2), niezbędnej do podtrzymania ich podziałów. Brak produkcji przeciwciał oraz drastyczny spadek ilości komórek T4 powodują zachwianie funkcji immunologicznych organizmu chorego [1].

HIV to wirus wolno działający — okres latencji AIDS od zakażenia do rozwinięcia wyraźnych objawów choroby wynosi ok. 5 lat [1, 10]. Znane są jednak również przypadki gwałtownego przebiegu choroby, często kończące się remisją [1].

Choroba rozwija się w sposób pandemiczny. Pod koniec 1985 r. stwierdzono, że w USA zetknięto się z HIV od 400.000 do 1.000.000 osób, co znaczy, że wykazano u nich dodatni odczyn serologiczny w stosunku do antygenów HIV [10]. Ale jak dotąd, jedynie u ok. 8—10% tzw. osobników seropozytywnych rozwija się pełna forma choroby [10]. Przewiduje się (dane zaczerpnięte z prasy amerykańskiej), że do roku 1990 liczba osób wykazujących dodatni odczyn serologiczny wzrośnie do 100.000.000. Do chwili obecnej stwierdzono, w USA i w Europie łącznie, ok. 20 000 zachorowań na AIDS [1, 10].

Cztery rejony na świecie są szczególnie dotknięte AIDS: USA (a zwłaszcza regiony wokół miast Los Angeles, New York, San Francisco), Europa Zachodnia, Haiti, Afryka Równikowa, a szczególnie Zair [1].

III. Systematyka, izolowanie, nazewnictwo i morfologia wirusów AIDS

Systematycy wyróżniają trzy podgrupy retrowirusów [15]:

— wirusy onkogenne (*Oncovirinae*) — powodujące leukemie, limfomy i innego typu nowotworzenia;

— wirusy spieniające (*Spumavirinae*) — powodujące wakuolizację komórek w hodowlach tkankowych, ale nie wywołujące żadnej znanej choroby;

— wirusy powolne (*Lentivirinae*) — powodujące cytopatyczne efekty w hodowanych kulturach tkankowych i wolno rozwijające się choroby u ssaków, w tym u człowieka [16].

Wirus HIV po raz pierwszy został wyizolowany przez naukowców z Instytutu Pasteura w Paryżu pracujących pod kierunkiem L. Montaga-

nier'a. Ponieważ wirus zabija limfocyty T4, w których się namnaża — początkowo nie udawało się utrzymać hodowli tkankowej zarażonych limfocytów — toteż wyizolowanie go było poważnym problemem.

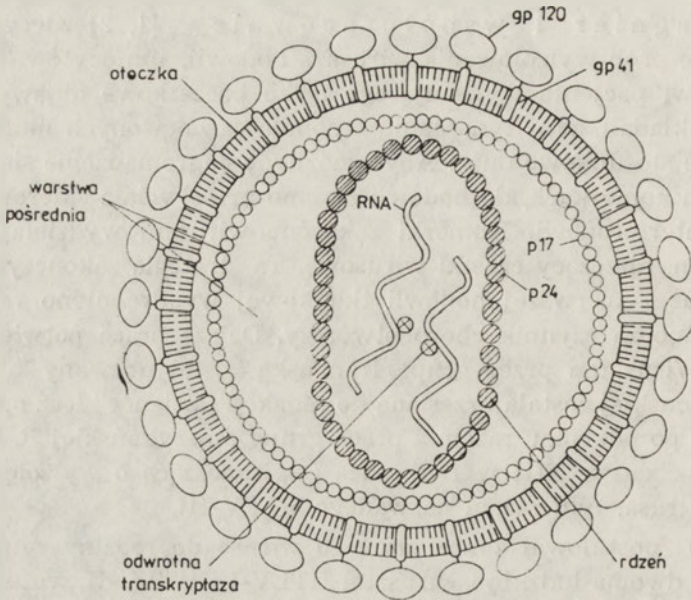
Montagnier i współpracownicy [1, 2] zdecydowali się na podjęcie prób wyizolowania wirusa z hodowli, limfocytów T4 uzyskanych z krwi pacjenta wykazującego tylko początkowe objawy choroby. Badacze zakładali, że w tym stadium populacja zakażonych limfocytów T4 jest jeszcze stosunkowo duża. Aby umożliwić nagromadzenie się wirusa w zakażonych komórkach, do hodowli dodano przeciwciała skierowane przeciwko α -interferonowi. Komórki zakażone wirusem wydzielają bowiem α -interferon, niszczący cząstki wirusowe. Ta strategia zakończyła się sukcesem — już z pierwszej hodowli tkankowej wyodrębniono retrowirusa, który uznano za czynnik chorobotwórczy. Dalsze prace potwierdziły ten wniosek. Wirus ten przez grupę francuską został nazwany LAV. Praca grupy francuskiej została przesłana do redakcji „Science” lecz opublikowana dopiero po pół roku, razem z pracą grupy amerykańskiej R. C. Gallo i M. Essex'a z NIH w Bethesda (2), donoszącą o wyizolowaniu podobnego wirusa, tym razem nazwanego HTLV-III.

Gallo postulował zaliczenie tego wirusa do rodziny retrowirusów, wspólnie z dwoma ludzkimi wirusami HTLV-I i HTLV-II, wcześniej przez niego wyizolowanymi. Wydaje się jednak, że wirus HTLV-III nie wykazuje strukturalnej i morfologicznej homologii do HTLV-I i II (patrz dalej), a więc zaliczenie go do wspólnej z nimi jednostki systematycznej jest raczej błędne. W maju 1986 roku członkowie Podkomisji do spraw Nomenklatury Retrowirusów Ludzkich (ang. Human Retrovirus Subcommittee) z wyjątkiem R. C. Gallo i M. Essex'a zaproponowali nazwę HIV — Human Immunodeficiency Virus. Ta nazwa jest zgodna z wymogami Międzynarodowej Komisji do Spraw Taksonomii Wirusów i zawiera najważniejsze informacje opisujące wirusa, a jednocześnie jest neutralna w sporze do niedawna toczonym przez Gallo i Montagnier'a [17, 18].

Wirion HIV (Ryc. 1) jest cząstką sferyczną o średnicy ok. 1000 angstromów [14]. Otoczka zewnętrzna zbudowana jest z podwójnej warstwy lipoproteinowej o składzie podobnym do składu błony komórkowej gospodarza. Otoczka zaopatrzona jest w wypustki zwane igłami, zbudowane z glikoprotein kodowanych przez gen *env* (patrz dalej), i stanowiące o specyficzności antygenowej wirusa. Białka otoczki wchodzące w skład igły wykazują powinowactwo do białek receptorów T4 [1, 10, 12, 13, 19] na powierzchni ludzkich limfocytów T4, tak więc decydują o możliwości przyłączenia się wirionu do komórki określonego typu, co jest pierwszym etapem infekcji.

Pod otoczką zewnętrzną znajduje się warstwa pośrednia, będąca luźno uorganizowaną strukturą białkową. Otacza ona rdzeń wirusa tzw. nukleoid zawierający genomowe RNA skompleksowane z białkami kodowa-

nymi przez gen *gag*. Rdzeń HIV, oglądany w mikroskopie elektronowym, jest ciemną, wydłużoną strukturą i jest zlokalizowany wyraźnie w centrum cząsteczki [20].



Ryc. 1 Struktura wirionu HIV

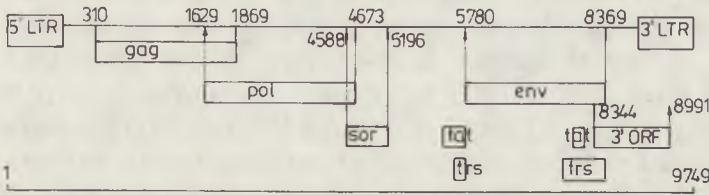
Na podstawie efektów cytopatycznych, jakie wywołuje HIV, podobieństwa do innych znanych wirusów powolnych np do wirusa visna [21] oraz ze względu na jego budowę morfologiczną, można HIV zaliczyć do tej grupy systematycznej.

IV. Budowa genomu, charakterystyka czynności poszczególnych genów

Genom HIV jest najdłuższym ze znanych genomów retrowirusowych [16]; długość cząsteczki prowirusowego DNA różnych szczepów HIV waha się od 9734 do 9749 par zasad. Genom wirusa zbudowany jest z kilku funkcjonalnie zróżnicowanych odcinków. Można w nim wyróżnić trzy typowe dla retrowirusów geny: *gag* — kodujący białka strukturalne wirusa (ang. group specific antigen gene), *pol* — kodujący odwrotną transkryptazę (ang. polymerase), *env* — kodujący glikoproteiny otoczki (ang. envelope), oraz charakterystyczne dla wirusa HIV cztery dodatkowe fragmenty: *Q* i *F* (zwane też odpowiednio *sox* oraz 3'ORF); *tat* — czynnik transaktywujący (transactivator element) i *art*, zwany też inaczej *trs* (ang. odp. anti-repressor activator — aktywator antyrepresorowy lub transacting regulator of splicing — trans-czynny regulator składania genomowego) [22, 23]. Sodroski i wsp. [24] przypuszczają, że kilka innych tzw. otwartych ramek odczytu* (ORF — open reading frame) występujących

* Ramka odczytu — sekwencja kodująca, ograniczona kodonami inicjatorowym i terminacyjnym.

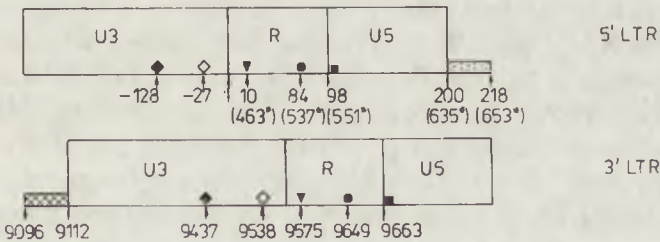
w genomie wirusa, jest zdolnych do kodowania niezidentyfikowanych jeszcze peptydów o masach cząsteczkowych ok. 10 000. Schemat budowy genomu wirusa HIV przedstawia rysunek 2.



Ryc. 2 Schemat genomu HIV (wg. J. Coffin, Cell 46, 1980, zmodyfikowano; numeracja nukleotydów wg. Ratner i wsp., Nature 313, 1985)

Siedmiu otwartym ramkom odczytu HIV, przyporządkowano określone funkcje genetyczne. ORF I odpowiada genowi *gag*, ORF II — genowi *pol*, ORF IV — genowi *env* [25]. ORF III zwany też *sor* — short open reading frame [25] czyli krótka otwarta ramka odczytu — to gen kodujący białko o masie cząsteczkowej 23 000, którego funkcja nie jest jeszcze znana. ORF V koduje białko p27 o również nieznaną dotąd funkcji [26, 27]. Funkcje genowe *tat* i *tr�* występują w dwóch pozostałych otwartych ramkach odczytu, jak dotąd nie określonych kolejnymi numerami [22, 28, 29].

Każda cząsteczka HIV jest z dwóch stron zaopatrzona w sekwencje końcowe zwane LTR (od ang. long terminal repeats) [11, 30]. Odcinki LTR HIV mają długość po 634 par zasad. Składają się z trzech fragmentów [30], (rys. 2A): U3 o dł. 453 par zasad, R o dł. 98 par zasad, U5 o dł. 83 par



Objaśnienia

- ◆ — sygnał wzmacniający U3
- ◇ — segment TATA
- ▼ — sygnał wzmacniający R
- — sygnał poliadenylacji
- — miejsce poliadenylacji
- ▤ — miejsce wiązania tRNA^{lys}
- ▨ — szlak polipurynowy o długości 16 par zasad
- † — strzałki oznaczają pierwszy nukleotyd danej sekwencji regulacyjnej
- * — kolejna numeracja nukleotydów licząc od pierwszego nukleotydu 5'LTR

Ryc. 2A Schemat budowy sekwencji LTR (wg. B. Starcich i wsp., Science 227, 1985)

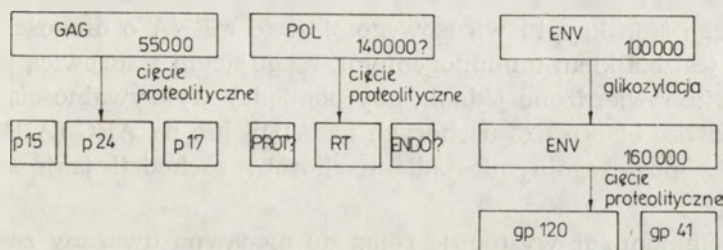
zasad. Odcinek LTR rozpoczyna się od sekwencji TG a kończy się sekwencją odwróconą CA [30].

Odcinek U3 kończy się w miejscu inicjacji transkrypcji RNA. To miejsce zostało eksperymentalnie wyznaczone przy zastosowaniu nukleazy S1 [30]. W U3 nie stwierdzono występowania otwartych ramek odczytu. Pierwszy nukleotyd odcinka R jest tradycyjnie w literaturze określany numerem 1 [24, 30]. Określa on miejsce startu transkrypcji wirusowego mRNA. W pozycji -27 (czyli w odcinku U3) znajduje się segment TATA będący sygnałem promotorowym — sygnałem startu polimerazy RNA. Znajduje się on w pozycji typowej dla promotorów genów eukariotycznych. W obrębie odcinka U3 stwierdzono występowanie sekwencji wzmacniających (ang. enhancer) podnoszących poziom transkrypcji [30]. W obrębie odcinka R także stwierdzono występowanie sekwencji, której fragment TGGGTTA (463—469 nukleotyd) jest homologiczny z sekwencjami wzmacniającymi genów eukariotycznych. Zbieżność lokalizacji tej sekwencji oraz homologia nukleotydów może sugerować, że pełni ona rolę sekwencji wzmacniającej. Oprócz tych przypuszczalnych elementów regulacyjnych, w rejonie R pomiędzy 37 a 82 nukleotydem znajduje się sekwencja zwana TAR. Wiąże ona peptyd tat-III sterujący procesem transaktywacji (patrz dalej) [28]. Granicę pomiędzy R i U5 wyznacza 551 nukleotyd. U5 rozpoczyna się miejscem poliadenylacji CAA. Sygnał poliadenylacji występuje w stosunku do granicy R-U5 w pozycji -24 [30]. Za odcinkiem U5 w 5'LTR występuje komplementarna wobec tRNA^{lys} sekwencja, o długości 18 par zasad [30]. Związany w tym miejscu tRNA^{lys} pełni funkcję primera w syntezie wirusowej nici (-) DNA. W pozostałych retrowirusach, z wyjątkiem MMTV (murine mammary tumor virus), funkcję tę pełni tRNA^{pro} [30]. W 3'LTR brak jest miejsca wiązania primera, ale przed pierwszym nukleotydem U3 występuje w 3'LTR 16 nukleotydowy szlak polipurynowy zaczynający się 8632 nukleotydem [24]. Odgrywa on rolę w inicjacji syntezy nici (+) DNA. Podobnie jak w przypadku innych retrowirusów odcinki LTR komplementują z fragmentami genomu gospodarza, umożliwiają rekombinację DNA wirusowego z komórkowym i odnajdywane są także w prowirusie.

ORF I warunkuje syntezę białek kapsydu i nukleoidu. Białka te są syntetyzowane w formie prekursora gag o masie ok. 55 000 (p55) ulegającego ograniczonej proteolizie, prowadzącej do powstania trzech polipeptydów, a nie czterech jak podczas proteolizy w innych retrowirusach. Są to białka p24, p17, p15 (Ryc. 2B). Białka p24 i p17 są strukturalnymi białkami kapsydu [16, 29]; p15 jest białkiem zasadowym, prawdopodobnie wiążącym się z DNA, podobnie jak analogiczne białka innych retrowirusów [25].

ORF II koduje prekursor enzymów wirusowych, zwany pol. 240 nukleotydów rejonu 5' genu *pol* zachodzi na 3' końcowy fragment genu *gag*.

Gen *pol* koduje odwrotną transkryptazę, umożliwiającą „przepisywanie” informacji genetycznej z RNA na DNA. Przypuszcza się, że gen *pol* koduje także, w swym 5' końcowym rejonie swoistą proteazę odpowiedzialną za dojrzewanie białek wirusa, a od strony 3' endonukleazę i „integrazę” — enzymy, które są odpowiedzialne za integrację HIV z genomem gospodarza [16].



Objaśnienia

PROT — proteaza

ENDO — endonukleaza „integraza”

RT — odwrotna transkryptaza

Ryc. 2B Dojrzewanie białek HIV (wg. F. Wong-Staal i R. C. Gallo, 1985, zmodyfikowane)

ORF IV koduje *env* — prekursor białka otoczki o masie ok. 100 000 (po glikozylacji ok. 160 000), poprzedzone N-kończącym peptydem sygnałowym o długości 30—60 aminokwasów. Z białka *env* w wyniku dojrzewania powstają dwie glikoproteiny: gp120 i gp41. Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej w białku *env* stwierdzono aż 32 miejsca, które mogą ulegać glikozylacji. Obudowanie białka licznymi resztami cukrowymi może tłumaczyć tak znaczny wzrost masy cząsteczki w czasie dojrzewania [12, 13, 16, 25].

Białko gp120 tworzy igły na powierzchni wirionu i rozpoznaje antygen powierzchniowy T4 ludzkich limfocytów T [12]. Białko to wykazuje największą zmienność z białek HIV, w rejonie DNA kodującym gp120 często występują delekcje i insercje.

Białko gp41 jest białkiem transmembranowym [13]. Jego region wystający na zewnątrz otoczki oddziałuje z gp120 ukotwicząc igły w wirionie. W środkowym rejonie gp41 występuje sekwencja 23 hydrofobowych aminokwasów prawdopodobnie tworzących odcinek łańcucha przenikający przez otoczkę. Odcinek C-końcowy gp41 zanurzony jest w cytoplazmie pod pączkującym wirionem i niesie sygnały decydujące o przecięciu prekursora 160 000 przez enzymy komórkowe, w późnych fazach dojrzewania wirionu [13]. W komórkach zainfekowanych HIV wykrywano jedynie obecność białka gp120; co sugeruje, że podczas infekcji do wnętrza komórki nie przechodzi gp41 [25].

ORF III inaczej zwany *sor*, jest fragmentem genomu zdolnym do kodowania białka o masie ok. 23 000 (p23), zbudowanego z 203 aminokwasów [16, 31]. Jego 5' koniec zachodzi na koniec 3' genu *pol* na długości 86 nukleotydów. *Sor* koduje białko bogate w reszty tryptofanowe. Funkcja białka *sor* jest nieznana. Sekwencja genu *sor* nie wykazuje żadnej homologii ze znanymi wirusowymi lub ssaczymi genami komórkowymi [25]. Białko p23 jest odczytywane z mRNA tworzonego w wyniku cięcia i składania pierwotnego transkryptu wirusowego. Jest to mRNA o długości ok. 5 kb [31]. p23 jest białkiem immunogennym, reagującym z surowicą pacjentów z AIDS. Nie stwierdzono jednak, aby pomiędzy wykrywalnością przeciwciał przeciwko białku p23 u chorych na AIDS lub na ARC (AIDS related complex) a poszczególnymi stadiami choroby zachodził jakiś szczególny związek [32].

Za odcinkiem *sor* występuje rejon do niedawna uważany za niekodujący i tak też nazywany (noncoding region-NCR). Ma on długość 440 nukleotydów. Cechą znaną jest występowanie kilku otwartych ramek odczytu [32], które potencjalnie mogą kodować krótkie peptydy. Jedną z nich została scharakteryzowana jako drugi ekson peptydu *tat-III* (patrz dalej). Region NCR styka się bezpośrednio z początkiem genu *env*.

ORF V inaczej zwany 3'ORF jest genem o nieznanym funkcji, o którego ważności może jednak świadczyć fakt, że jest zachowywany we wszystkich dotychczas wyizolowanych szczepach HIV. Inicjatorowy kodon metioninowy znajduje się 1 [27] lub 4 [32] nukleotydy za kodonem terminacyjnym genu *env*. Otwarta ramka odczytu 3'ORF zachodzi na sekwencję U3 w 3'LTR. Natywny produkt 3'ORF został zidentyfikowany jako białko o masie 27 000 (p27). Jest to białko immunogenne [32, 33]. W wielu komórkach zainfekowanych HIV stwierdzono występowanie swoistego wirusowego mRNA o długości ok. 2 kb kodującego p27 [10]. Analiza sekwencyjna wskazuje, że ten mRNA powstaje na skutek podwójnego składania genowego, i składa się z trzech eksonów [27]. Produkt białkowy 3'ORF nie podlega glikozylacji. Oddziałuje on immunologicznie z surowicą chorych na AIDS, a także z surowicą afrykańskich koczodanów zarażonych zbliżonym wirusem STLV-III_{AGM} (według nowej nomenklatury AGMIV), co wskazuje na zachowawczość tego genu [27].

Niedawno zwrócono uwagę na możliwość występowania jeszcze dwu otwartych ramek odczytu i przypisano im funkcje genowe *trs* i *tat*. J. G. Sodroski i jego współpracownicy [23] uważają, że gen *trs* składa się z dwóch eksonów wykorzystujących dwie różne ramki odczytu. Kodon metioninowy znajduje się w pozycji 5550; pierwszy ekson kończy się nukleotydem 5625 [23]. Miejsce akceptorowe składania genowego znajduje się w pozycji 7956; drugi ekson kończy się nukleotydem oznaczonym jako 8227 [23]. Produkt białkowy genu *trs* szacuje się na 116 aminokwasów. Są to aminokwasy silnie hydrofilowe, podobnie jak aminokwasy

tat-III i innych białek wiążących się z DNA. Ta otwarta ramka odczytu (*trs*) utrzymuje się we wszystkich dotychczas zsekwencjonowanych szczepach HIV [22].

Funkcjonowanie genu *trs* jest niezbędne do ekspresji genu *gag* i *env*. Grupa S odroskiego jest zdania, że produkt translacji genu *trs* jest drugim transaktywatorem HIV powodującym derepresję transkrypcji mRNA *gag* i *env* poprzez znoszenie negatywnego działania sekwencji regulatorowych poprzedzających oba te geny [23] (patrz dalej).

V. Zmienność genomu HIV

Analiza sekwencji nukleotydowych różnych wariantów HIV wykazała znaczną zmienność genomów wirusów AIDS (patrz Tabela 1).

Tabela 1

Porównanie zmienności genetycznej w obrębie pięciu różnych szczepów HIV

nazwa szczepu	% zmian w stosunku do szczepu BH-10*								
	LTR	gag	pol	sor	NCR (tat)	env			3'DRF
						p9	gp120	gp41	
HAT3	7.0	5.9	3.7	3.6	8.2	23.4	14.0	8.4	10.6
		6.5	5.3	6.4	—	29.7	21.4	13.0	17.0
ARV2	4.7	5.6	4.4	5.1	8.4	23.4	11.4	6.3	8.0
		7.3	5.0	9.8	—	35.1	17.0	12.2	12.2
LAV1a	1.6	3.0	1.9	0.3	1.9	1.8	2.2	0.9	— 2.0
		3.1	2.1	0	—	5.4	2.9	1.4	3.7
WMJ-1	—	3.3	—	—	—	24.3	12.3	6.0	—
		3.1	—	—	—	35.1	18.7	8.4	—

* Górne cyfry przedstawiają zmiany nukleotydowe, dolne — zmiany aminokwasowe
— oznacza brak danych

(Według B. Starcich i wsp. Cell, 45, 637, 1986, zmodyfikowana)

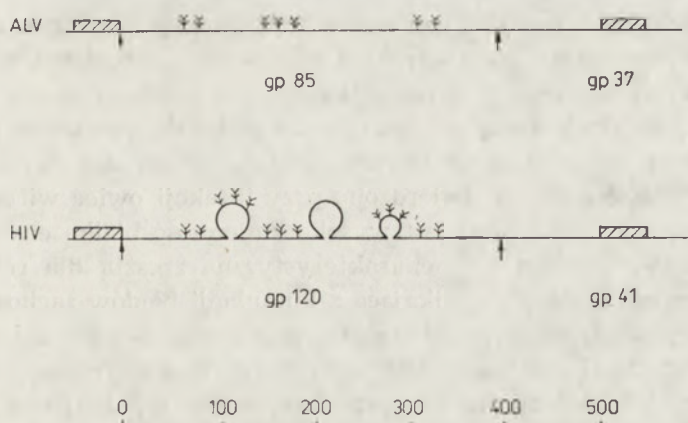
Rejon 3'LTR charakteryzuje się występowaniem licznych zmian nukleotydowych zlokalizowanych głównie w odcinku 5' końcowym fragmencie U3, na który zachodzi otwarta ramka odczytu 3'ORF (Ryc. 2 i 2A). Odcinki obu LTR zawierające sygnały regulujące ekspresję HIV wykazują wysoki stopień zachowawczości, sięgający w pewnych odcinkach (R i U5) prawie 100%. Geny *gag*, *pol* i *sor*, a także ich produkty białkowe wykazują zbliżony stopień zmienności sięgający kilku procent. Zmiany amino-

kwasowe w białkach enzymatycznych i strukturalnych, są więc prawdopodobnie niekorzystne dla rozwoju wirusa. Bardzo wysoką zmienność, i to skoncentrowaną przede wszystkim w rejonie kodującym zewnętrzne białko igły gp120, wykazuje gen *env*. Zamiany aminokwasowe pomiędzy różnymi szczepami HIV w białkach gp120 i gp41 sięgają ponad trzydziestu procent. Zamiany nukleotydowe w tym rejonie genomu dotyczą w 35,6% trzeciej zasady w kodonie, a zamiany aminokwasowe sięgają 33%. Zamiany nukleotydowe w genie *gag* są również bardzo częste, bowiem dochodzą do 61% w trzeciej zasadzie kodonu, lecz większość z nich prowadzi do wytworzenia kodonów oznaczających ten sam co poprzednio aminokwas. Procent zmienności na poziomie aminokwasowym w produktach genu *gag* wynosi zaledwie 4,5 (Tabela 1). Zmienność białka igły ma istotne znaczenie biologiczne. Igła bowiem, to cząstka ekspozycyjna na zewnątrz wirionu, która jest rozpoznawana przez przeciwciała zainfekowanego gospodarza. Taka zmienność głównego białka *env* jest najprawdopodobniej źródłem utraty kontroli nad rozwojem HIV przez układ immunologiczny. Przeciwciała skierowane przeciwko jednemu wariantowi białka gp120 nie są w stanie rozpoznać białek igły nadinfekującego szczepu HIV, czy też wariantu powstałego w czasie rozwoju w zakażonym szczepem macierzystym organizmie ludzkim [12, 13].

Zmienność genu *env* nie dotyczy w tym samym stopniu wszystkich jego odcinków. Białko gp120 zbudowane jest z trzech odcinków zachowawczych, przeplecionych odcinkami superzmiennymi [13, 34]. Pozycję tych odcinków ocenić można na podstawie analizy sekwencji aminokwasowych gp120 z różnych szczepów. Odcinki konserwatywne zawierają się pomiędzy następującymi resztami aminokwasowymi 37—130, 211—289, 488—530. Rejony *env* o niskiej zmienności wydają się być istotne dla narzucenia odpowiedniego kształtu białkom gp120 i gp41. Mutacje w rejonach konserwatywnych zdarzają się rzadko, wiele z nich jest chemicznie zachowawczych. Rejony te wykazują znaczną homologię z genem *env* ALV (avian leukemia virus), [12]. Gdyby z genu *env* HIV usunąć sekwencje superzmiennie to białko igły miałoby mniej więcej tę samą długość, co produkt genu *env* ALV [12].

Wydaje się [12], że rejony superzmiennie *env* mogły powstać na skutek rekombinacji z wycinanymi przypadkowo fragmentami kodowanymi przez genom gospodarza lub, że mutacje w tych rejonach mogą być wynikiem duplikacji sekwencji wirusowych, oraz licznych mutacji punktowych.

Rejony superzmiennie wydają się być istotne dla propagacji wirusa. Uważa się bowiem, że odcinki niezmiennie gp120 ukryte są wewnątrz struktury trzeciorzędowej gdzie oddziałują ze sobą tworząc szkielet igły. Na zewnątrz zaś igły wystają rejony superzmiennie, tworząc duże „parasole” osłaniające rejony stałe przed rozpoznaniem przez układ immunologiczny.



Objaśnienia

▨ — sekwencje sygnałowe

Y — miejsca glikozylacji

Ω — regiony zmienne białka gp 120 u HIV

↓ — miejsca cięcia prekursorów białkowych przez enzymy proteolityczne

Ryc. 3 Porównanie struktury glikoprotein gp85 i gp37 oraz gp120 i gp41 wirusów ALV i HIV (wg. J. Coffin, Cell 46, 1—4, 1986, zmodyfikowano)

Taką interpretację funkcji rejonów obu typów (niezmiennie i superzmiennie) oparto między innymi na stwierdzeniu, że cysteiny tworzące wewnętrzną architekturę wiązań siarczkowych w cząsteczce gp120 występują w rejonach zachowawczych — a w dodatku w wysoce konserwatywnych pozycjach. Tak więc zmienność antygenowa igły, mogąca się przecież wyrażać w kolejnych plonach wirusowych (częstość mutacji wynosi 1—2 zmiany zasad na jeden cykl replikacji) [12], może powodować utratę kontroli układu opornościowego gospodarza nad rozwojem HIV [12, 13, 16, 21]. Zmienność ta może być również źródłem pojawiania się nowych immunologicznie szczepów HIV [12, 13]. Ponieważ wszystkie znane szczepy wirusa HIV wykazują tendencję do zakażania jednego typu komórek, wydaje się, że regiony superzmiennie nie kodują domen białkowych wiążących się z receptorami T4 [12].

Obecność rejonów superzmiennych w białku env HIV pozwala na wysunięcie hipotezy zakładającej, że wirus wymyka się spod kontroli układu immunologicznego i namnaża się nieustannie w organizmie, ponieważ w kolejnych plonach pojawiają się cząstki wirusowe odmienne antygenowo, w efekcie zmian w strukturze białka env. Hipoteza ta oparta jest na kilku niezależnych spostrzeżeniach. Pierwszym są obserwacje dotyczące cyklu życiowego retrowirusa EIAV (Equine Infectious Anemia Virus) — czyli wirusa końskiej białaczki zakaźnej. Wykazano, że kolejnym rzutom choroby objawiającym się u konia falami gorączki towarzyszy pojawianie się

we krwi zwierzęcia nowych wariantów antygenowych wirusa, zawierającego zmienione białko otoczki [35]. Przeciwciała gospodarza nie niszczą takich nowych wariantów wirusa. Dopiero po pewnym czasie organizm zwierzęcia produkuje nową generację przeciwciał skierowanych przeciwko pojawiającym się odmianom wirusa. Podobne zjawiska pojawiania się wariantów antygenowych stwierdzono przy infekcji owiec wirusem visna [21]. Drugim spostrzeżeniem jest wysoka zmienność białka env badanych szczepów HIV. Trzecim jest, charakterystyczna zresztą dla retrowirusa, wysoka częstość mutacji, wynikająca z kumulacji błędów zachodzących w czasie odwrotnej transkrypcji i transkrypcja prowirusa przez komórkową RNA polimerazę II zależną od DNA. Odwrotna transkryptaza jest w trakcie syntezy nici DNA zdolna do „przeskakiwania” z jednej nici diploidalnego macierzystego genomu RNA infekującego komórkę — na drugą i z powrotem. Powoduje to pojawianie się krótkich delecji i duplikacji czy zmian punktowych szczególnie w rejonie 3' genomu, od którego zaczyna się odwrotna synteza DNA czyli właśnie w rejonie genu *env* [11, 13, 36].

Założenie analogii między mechanizmem ucieczki spod kontroli immunologicznej EIAV i HIV, choć interesujące, może się okazać fałszywe. Wykazano na przykład, że wirus izolowany z limfocytów dziecka urodzonego przez chorą matkę [37] różnił się znacznie od wirusa pochodzącego z leukocytów matki. Wydaje się, iż dwa te wirusy pochodziły od innych szczepów wyjściowych.

Być może, obserwowana zmienność wirusa HIV nie odzwierciedla zmian mutacyjnych zachodzących w trakcie cykli replikacji w tym samym organizmie gospodarza, lecz jest efektem pierwotnego zakażenia wirusami różnych szczepów HIV o różnej budowie genu *env*. Proces wymykania się spod kontroli układu immunologicznego może przeto wynikać z mieszanych infekcji oraz częściowego dryfu antygenowego (patrz dalej). A l i z o n i w s p. [13] sugerują że dryf antygenowy — zmienność białka *env* w wyniku mutacji wirusa zdarzających się w organizmie nosiciela prowadzi do powstania odmian HIV, jednak nie na tyle różnych, by wydstawały się spod kontroli układu immunologicznego. Autorzy ci uważają, że niewielkie zmiany białek otoczki pozwalają na rozpoznawanie przez kolejne plony wirusa, kolejnych sub-populacji limfocytów zaliczanych do klasy T4 lecz mogących posiadać różne odmiany tego receptora.

VI. Mechanizmy regulacji ekspresji genów HIV:

TAT-TAR; TRS i składanie genowe

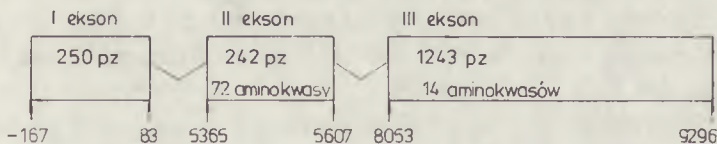
Grupa badaczy współpracująca z J. Sodroskim zauważyła, że w komórkach zainfekowanych wirusem HTLV-I, który wyraża funkcje genu *x-LOR*, następuje wzrost poziomu mRNA wirusowego i wzrost ekspresji genów znajdujących się pod kontrolą wirusowych odcinków LTR.

Stwierdzono, że zjawiska te są związane ze zmianami na poziomie transkrypcji DNA HTLV-I i ten typ regulacji nazwano regulacją TAT [10, 38] (ang. *trans-acting transcriptional regulation* czyli trans-aktywacja transkrypcji). Czynnikiem transaktywującym nazwano takie czynniki, które mogą regulować aktywność transkrypcyjną cząsteczki wirusowego DNA innej niż ta, która je koduje. Czynnikiem transaktywującym w HTLV-I jest inny od występującego w HTLV-II. Zostały one nazwane odpowiednio *tat-I* i *tat-II* [38]. S o d r o s k i przypuszczał [38], że fragment *x-LOR* koduje białko, pełniące funkcję regulatora transkrypcji, działającego w układzie *trans*, poprzez bezpośrednie powiązanie z LTR HTLV albo na drodze indukcji genów komórkowych. Efektem takiego działania byłaby stymulacja transkrypcji genów znajdujących się pod kontrolą LTR HTLV. Wkrótce potem stwierdzono [21, 39] obecność funkcjonalnego odpowiednika *tat-I* i *tat-II* u HIV, który nazwano *tat-III* [39, 40] sugerując, że rola tego białka polega również na aktywacji transkrypcji DNA wirusowego. Sugestia ta może nie być słuszna.

Istotną cechą różniącą *tat-III* od *tat-I* i *tat-II* jest jego wysoka aktywność, bowiem powoduje on wzrost ilości syntetyzowanego białka 500—1000 razy [40], podczas gdy *tat-I* i *tat-II* aktywują syntezę białek HTLV-I i II około pięciokrotnie [41]. Stwierdzono także [38, 42], że TAT dotyczy nie tylko genów wirusowych, ale także na drodze pozytywnej lub negatywnej wpływa na geny komórkowe.

Zawarty w genomie HIV gen *tat-III* składa się z trzech eksonów [43]: pierwszy — niekodujący, pełniący funkcje lidera w mRNA o długości 250 par zasad jest zawarty pomiędzy —167 a 83 nukleotydem 5'LTR (numeracja wg. R a t e r i w s p. 1985); drugi ekson występujący pomiędzy *src* a genem *env* pomiędzy 5365 a 5607 nukleotydem koduje 72 aminokwasy i jest absolutnie niezbędny do transaktywacji; trzeci ekson w obrębie genu *env*, w innej niż *env* ramce odczytu, pomiędzy nukleotydem 8053 a 9296 koduje 14 aminokwasów (patrz Ryc. 5).

Produktem genu *tat-III* jest peptyd o łącznej długości 86 aminokwasów i masie 14 000. Zawiera on stosunkowo dużo aminokwasów zasado-



Objaśnienia

- † — strzałki oznaczają początkowy i końcowy nukleotyd
- I, II, III eksonu
- pz — para zasad

Ryc. 4 Schemat składania genu *tat-III* (wg. Science 229, Arya S. i wsp., Sodroski J. i wsp. 69—77 1985, zmodyfikowano)

wych, a szczególnie argininy; jest także bogaty w prolinę. Z analizy sekwencji aminokwasowej wynika również, że nie zawiera on żadnych potencjalnych miejsc glikozylacji [33]. Charakter zasadowy tego peptydu może świadczyć o jego zdolności do wiązania się z kwasami nukleinowymi. Już dawniej było wiadomo, że w obrębie odcinka LTR retrovirusów znajdują się elementy kontroli transkrypcji [44]. Sodroski wykazał [38], że w obrębie LTR znajdują się sekwencje, których obecność jest niezbędna do transaktywacji i nazwał te sekwencje TAR. Wycięcie bowiem pewnych odcinków LTR znosiło aktywny wpływ białek transaktywujących.

Blizsze badania wykazały, że sekwencja TAR wykazująca zdolność do wiązania peptydu tat-III występuje w genomie HIV w obrębie odcinka R [41], znajdującego się w 5'LTR [45]. Sekwencja ta znajduje się pomiędzy 37 a 82 nukleotydem. Stwierdzono, że obecność TAR w obrębie lidera, (czyli niekodującego odcinka mRNA rozpoznawanego przez inicjujący rybosom) wpływa hamująco na translację mRNA HIV będącego w pozycji *cis* w stosunku do tej sekwencji. Wprowadzenie do komórki produktu genu *tat-III* znosi inhibicję translacji nie powodując wyraźnego wzrostu poziomu specyficznego mRNA HIV [22], być może jednak wpływając na wzrost stabilności tego mRNA [41].

Widać więc, że peptyd tat-III nie jest aktywatorem transkrypcji HIV, znosi on jedynie blok translacyjny spowodowany przez obecność regionu TAR w LTR. Mechanizm aktywacji przez tat-III może być związany z eukariotycznym aparatem translacyjnym. Odcinek TAR zlokalizowany w rejonie „R” LTR HIV w wyniku obróbki transkryptów HIV zostaje wbudowany w sekwencje liderowe mRNA wirusowego, gdzie tworzy stabilne struktury drugorzędowe.

Wiadomo, że podczas inicjacji translacji podjednostka 40S rybosomu eukariotycznego wiąże się z końcem 5' mRNA i przesuując się w kierunku 3' „szuka” w mRNA kodonu inicjującego. Drugorzędowa struktura w obrębie mRNA może więc zakłócać ruch podjednostki wzdłuż mRNA i redukować w ten sposób wydajność inicjacji translacji. Uważa się, że peptyd tat-III wiążąc się z TAR, zmienia strukturę drugorzędową zawartą w sekwencji liderowej i umożliwia dojście rybosomu do kodonu inicjatorowego. Wiązanie się peptydu tat-III z mRNA może wzmacniać nie tylko wydajność translacji ale i stabilność mRNA, co tłumaczy wzrost jego poziomu (mRNA). Niewykluczone, że podwyższy model może posłużyć do pełnego wyjaśnienia mechanizmu transaktywacji genomu HIV. Uważa się jednak również za możliwe, że peptyd tat-III (lub indukowane przez niego czynniki komórkowe) rozpoznają odpowiednie sekwencje nie tylko w RNA ale i w LTR DNA wirusowego. Może to prowadzić do działania tat-III jako regulatora i translacji i transkrypcji [41].

Wiadomo także, że w przypadku infekcji oportunistycznych spowodowanych np. wirusem herpes (HSV-I) następuje stymulacja transkrypcji

HIV, z czego wynika, że genom wirusa herpes także może pełnić funkcję transaktywującą [46].

Sądzi się, że *tat-III* może wpływać na długość latencji HIV. W 1984 r. Gallo i wsp. [47] prowadząc badania nad opornością limfocytów T4 na HIV, zidentyfikowali dwie linie komórkowe (H4 i H9) wykazujące znaczną oporność na wirusa. Niedawno stwierdzono, że oporność limfocytów H9 i H4 związana jest z ograniczeniem w tych komórkach syntezy peptydu *tat-III*. Tak więc, pewne stany komórki, ograniczające ekspresję *tat-III* prowadzą do powolnego namnażania się wirusa, bez doprowadzenia do śmierci gospodarza. Stosując linie H9 i H4 można uzyskać ok. 10^{11} cząstek wirusowych na 1 ml hodowli [47] trwających bez wyraźnych objawów cytopatycznych aż do 6 miesięcy. Można sobie wyobrazić, że aktywacja ekspresji *tat-III* w takich komórkach może doprowadzić do gwałtownego wzrostu syntezy HIV i w efekcie — przejścia infekcji z fazy utajonej — w aktywną.

Bliższe badania nad czynnością genu *tat-III* umożliwiło stwierdzenie, że wirus HIV może się rozwijać nie tylko w hodowlach *in vitro* limfocytów T4, ale także w komórkach *cos-1* z nerki małpy konstytutywnie wyrażających antygen T simian virus 40 (SV 40). Komórki takie podtrzymują replikację plazmidów zawierających *ori* SV 40 (*origin of replication* — początek replikacji genomu SV 40) [48]. W plazmidy wyposażone w rejon *ori* SV 40 wstawiano różne odcinki DNA prowirusa HIV, poczynając od jego pełnej kopii, poprzez różnego rodzaju mutanty delecyjne zawierające określone tylko fragmenty genomu HIV [22, 43]. Chimerycznymi plazmidami przeprowadzono transfekcję komórek *cos-1* i wykazano, że pełne kopie DNA prowirusowego są infekcyjne i powodują powstawanie w komórce autentycznych wirionów HIV. Tym samym udowodniono, że wirus rozwijać się może w komórkach nielimfocytarnych i że swoistość komórkowa HIV związana jest wyłącznie z oddziaływaniem ze swoistym receptorem T4.

Białka wirusowe syntetyzowane w komórkach *cos-1* transfekowanych plazmidami zawierającymi pełny genom lub fragmenty genomu HIV, zidentyfikowano immunologicznie [22]. Stwierdzono wówczas, że oprócz białka *tat-III* (m.c. 14 000) immunoprecypitacji tym samym przeciwciałem ulega białko o masie cząsteczkowej 26 000. Jest to najprawdopodobniej białko syntetyzowane na mRNA o sekwencji częściowo pokrywającej się z mRNA *tat-III*. Wydaje się, że mRNA białka 26 000 powstaje w wyniku zmian w składaniu genu *tat-III*. Składanie genu *tat-III* może więc przebiegać dwiema drogami — jedną prowadzącą do powstania mRNA kodującego białko 14 000 i drugą — mRNA kodującego białko 26 000, być może o zmienionej aktywności trans-aktywującej.

Składanie genów HIV zachodzi podobnie w limfocytach T4 i komórkach *cos-1*. Grupa Gallo [22] uznała, iż proces ten jest kontrolowany nie

tyle przez komórkę co przez produkty genowe wirusa. Sugestia ta wydaje się słuszną bowiem zidentyfikowano w DNA HIV gen kontrolujący przebieg cięcia i składania mRNA wirusowego. Mutant, w którym delecji uległ odcinek DNA między 5367 a 5582 nukleotydem produkuje odmienny od dzikiego zestaw mRNA wirusowych. W takim mutancie nie stwierdza się praktycznie obecności transkryptu o pełnej długości genomu (a więc RNA genomowego niezbędnego do organizacji infekcyjnego HIV) za to produkowane są krótkie transkrypty (2 kb) powstające w wyniku cięcia i składania i kodujące m.in. białko tat-III oraz śladowe ilości mRNA kodującego białko env (4,3 kb).

Efekt delecji usuwa z genomu HIV odcinek rozpoznający otwartą ramkę odczytu, której kodon inicjatorowy zajmuje pozycję 5550—5553. Ta ramka odczytu obejmuje 348 nukleotydów i zachodzi częściowo na fragment genu *tat-III*, choć odczytywana jest w innej fazie. Ta ramka odczytu mogąca kodować białko zbudowane ze 116 aminokwasów występuje w wielu różnych wariantach HIV, co sugeruje jej znaczenie funkcjonalne.

Wydaje się, że jest to nowy gen HIV kontrolujący proces składania mRNA wirusowego, bowiem insercja czterech zasad w końcowym rejonie tej ramki odczytu, nie naruszające struktur RNA istotnych dla składania, lecz zmieniające sekwencję hipotetycznego kodowanego przez ów gen białka, wywołują ten sam efekt co omówiona delecja. Wykazanie, że dwie niezależne mutacje oddalone tak znacznie od siebie w genomie HIV powodują (zmieniając tę samą ramkę odczytu), identyczne zmiany wzoru składania genowego, przemawia za tym, że to produkt owego genu kontroluje cięcie i składanie mRNA HIV. Jest to regulacja typu *trans*, bowiem białko zsyntetyzowane na nici typu dzikiego może komplementować defekt mutacyjny występujący na innej nici RNA wirusowego.

Odkrywczy tego nowego genu HIV nadali mu wobec tego nazwę *trs*. Przewidywania oparte na analizie transkrypcji w mutantach HIV potwierdzają badania nad wpływem inhibitorów biosyntezy białka na proces składania. Zahamowanie syntezy białka w komórkach syntetyzujących RNA wirusowy wywołuje ten sam efekt co zmiany mutacyjne w omawianej ramce odczytu, co sugeruje, że gen *trs* ulega ekspresji w postaci białka niezbędnego do skierowania procesu obróbki transkryptów ku produkcji RNA genomowego [22]. Odkrycie to ma pierwszorzędne znaczenie dla poznania nie tylko mechanizmów ekspresji HIV, ale także przebiegu procesów cięcia i składania mRNA. Jak dotąd, uważa się, że proces ten regulowany jest przez własności „enzymatyczne” samych, odpowiednio uporządkowanych łańcuchów RNA, zdolnych do autokatalitycznego wycinania intronów i łączenia eksonów [49].

Od co najmniej ośmiu lat, jednakże, w pracowni Słonimskiego w Gif-sur-Yvette (Francja), uzyskiwane są kolejne dowody wskazujące, iż w mitochondriach drożdży pewne procesy cięcia i składania kontrolowane

są przez swoiste białka zwane maturazami. Są one kodowane przez otwarte ramki odczytu, zlokalizowane w intronach genu cytochromu b [42, 50, 51, 52, 53]. Białka te kontrolują cięcie i składanie w układzie *trans*, a mutacje tworzące np. triplety terminalne w ramach odczytu kodujących owe białka, przerywają proces cięcia i składania. Zmiany w aparacie transkrypcyjnym mitochondriów odbijają się na przebiegu procesu cięcia i składania.

Hipoteza, że HIV koduje białka kontrolujące cięcie i składanie generalizuje teorię Słonimskiego i nadaje jej wymiar równocennej z teorią autokatalitycznego przebiegu cięcia i składania.

Problem działania białka *trs* skomplikowany jest dodatkowo faktem, iż cięcie i składanie mRNA HIV zachodzi najprawdopodobniej w jądrze komórkowym. Zmutowane prowirusy HIV niosące delecję w genie *trs* wcielone do genomu krowianki rozmnażającego się w cytoplazmie, ulegają cięciu i składaniu prowadzącemu do powstania nie tylko mRNA 2kb ale i dłuższych odcinków mRNA wirusowego [54], a więc tak jakby ich gen *trs* nie był zmutowany. Oznacza to, że kontrolna funkcja *trs* wyraża się wyłącznie na terenie jądra — a przecież jeżeli produkt *trs* jest swoim białkiem, to syntetyzowany musi być w cytoplazmie i wracać do jądra, gdzie kontrolowałby równowagę między długimi formami mRNA HIV (genomowymi i mRNA *env*) a krótkimi kontrolującymi syntezę *tat-III* i *trs*.

Współdziałanie między dwoma białkami regulatorowymi *tat-III* i *trs* może być źródłem długotrwałego ukrytego przebiegu infekcji HIV. Jeżeli w fazie początkowej po zakażeniu, cięcie i składanie prowadzi przede wszystkim do powstania białka *tat-III*, to białko *trs* kodowane przez nakładające się sekwencje genomu, nie jest syntetyzowane i proces cięcia i składania generuje krótkie formy mRNA odpowiedzialne za syntezę białka *tat-III*. W tym stanie transkrypcja nie prowadzi do powstania mRNA *gag* i *env*, białko *env* nie jest syntetyzowane i nie inkrustuje powierzchni zakażonego limfocyta. W rezultacie zakażony limfocyt niosący prowirusa nie jest rozpoznawany przez układ immunologiczny i nie jest niszczone. Komórka taka, w której nagromadzony jest aktywator transkrypcji *tat-III* może stać się przy pewnej zmianie fizjologicznej zdolna do niezwykle aktywnej syntezy białek wirusowych. Jeżeli pod wpływem czynnika zewnętrznego w komórce nastąpi ekspresja genu *trs* to powstawać zaczęły długie transkrypty czyli RNA genomowy i mRNA *gag* i *env*; synteza transkryptów genomowych ograniczana występowaniem regulacyjnej sekwencji w rejonie R 3'LTR zostanie bowiem zaktywowana przez nagromadzone białko *tat-III*, wiążące się z tą sekwencją. RNA genomowe w czasie cyklu życiowego wirusa, a także na skutek procesów cięcia i składania generuje mRNA *env* (4,3 kb). mRNA *gag* i *env* w komórce gdzie nagromadzone jest białko *tat-III* ulegać będą intensywnej translacji, białko

env rozpocznie inkrustację błony komórkowej, genomowe RNA obudowane zostanie białkami gag i wcielone w pączkujące wiriony a komórka z uprzednio milczącym genomem HIV stać się może źródłem gwałtownej infekcji.

Ten tak zwany mechanizm uporczywości infekcji, polegający na wyknęciu się wirusa spod kontroli immunologicznej poprzez nieeksponowanie antygenów wirusowych na powierzchni ruchliwej komórki gospodarza i przy zmianie warunków na gwałtownym przejściu do fazy litycznej nazywany jest obrazowo „mechanizmem konia trojańskiego” [21]. Mechanizm taki wydaje się być odpowiedzialny za uporczywość infekcji wirusem visna, gdzie stwierdzono, że w płynie mózgowordzeniowym owiec zakażonych visna, prowirus infekuje monocyty, lecz praktycznie nie ulega w nich ekspresji. Transkrypcję wirusowego RNA i tym samym indukcję wirusa stymuluje proces dojrzewania monocytów do makrofagów, związany ze stymulacją antygenową monocytów. Tak więc czynnikiem zewnętrznym wywołującym zmiany w procesie transkrypcji visna jest wyraźnie stymulacja antygenowa [21].

Można przypuszczać, że również aktywacja genomu HIV związana jest ze stymulacją antygenową zakażonego limfocyta. Wskazuje na to fakt, że w odpowiednich warunkach (niska koncentracja komórek, częsta wymiana podłoża), zakażone limfocyty T4 przeżywają i proliferują do 60 dni nie produkując wirionów. Hodowla taka przy dodatkowej stymulacji antygenowej natychmiast zaczyna produkować wiriony i wkrótce obumiera [55]. Mechanizm tego efektu stymulacji antygenowej nie jest jasny. Wiadomo, że stymulacja taka prowadzi do gwałtownego wzrostu produkcji interleukiny-2 [55] poprzez wpływ na nieodczytywany regulatorowy odcinek DNA leżący po stronie 5' genu IL-2 [56]. Odcinek ten wykazuje daleko idącą homologię z rejonami LTR HIV [56], być może więc, stymulacja antygenowa podnosi nie tylko ekspresję genu IL-2 ale i prowirusa HIV. Wzrost stężenia IL-2 po stymulacji prowadzi do proliferacji zainfekowanych komórek T4, w których następuje pełna ekspresja wirusa i „koń trojański” otwiera się, wysypując plon infekcyjnych cząstek, zakażających subpopulację zdrowych dotąd limfocytów.

Rekapitułując, kolejność zdarzeń może więc wyglądać następująco: wirus infekuje leukocyt, w początkowej fazie nie wyraża się gen *tr_s*, cięcie i składanie genowe prowadzi do powstania mRNA *tat*-III, wirus istnieje w postaci ukrytej. Stymulacja antygenowa prowadzi do proliferacji leukocytów T4, czemu towarzyszy zmiana wzoru składania genowego HIV, powstają mRNA kontrolujące syntezę białek strukturalnych, ich synteza jest aktywowana przez białko *tat*-III. Synteza wirionów prowadzi do obumierania komórki, bowiem białko *env* inkrustując powierzchnię leukocytu wywołuje fuzje zakażonych komórek; syncycja obumierają, do krwi dostają się antygeny z limfocytów gospodarza, organizm wytwarza prze-

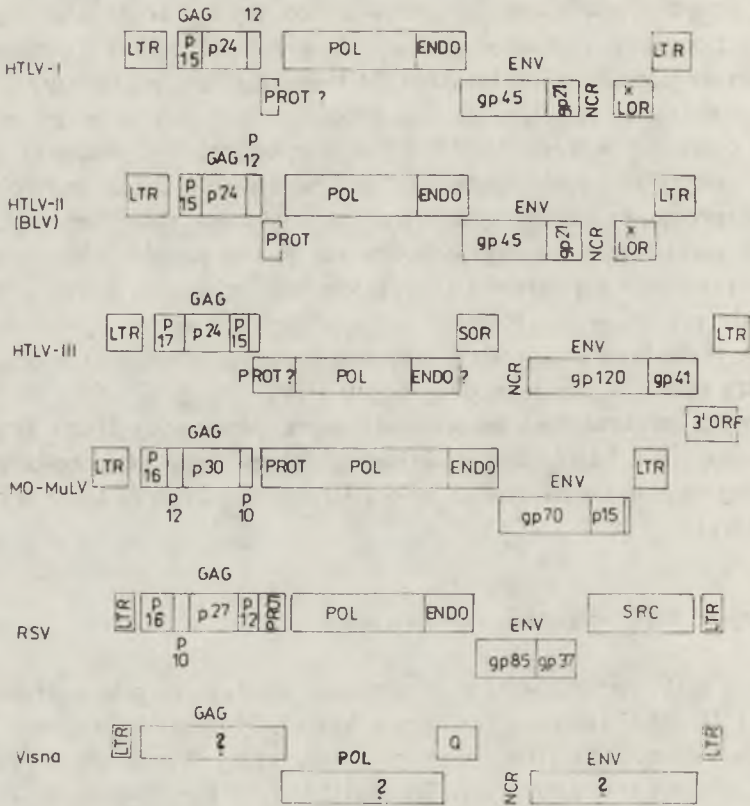
ciw nim przeciwciała i nawet zdrowe leukocyty T4 zostają zniszczone w wyniku autoagresji immunologicznej [1, 21, 22, 45, 55]. W sumie spada dramatycznie populacja limfocytów T4 i chory cierpi na objawy immunosupresji. Jeśliby ta hipoteza „konia trojańskiego” dobrze odzwierciedlała przebieg cyklu życiowego HIV, to prawdopodobnie w pewnych etapach choroby, pozytywne efekty mogłoby dać podawanie leków wywołujących immunosupresję, co zapobiegałoby autoagresji immunologicznej [21]. Jednakże ten mechanizm rozwoju choroby nie jest w pełni udokumentowany. Rozprzestrzenianie się infekcji powolnym retrowirusem, mimo tego, że w organizmie powstają skierowane przeciw wirusowi przeciwciała, może mieć inne podłoże, a mianowicie zmienność antygenową białek otoczki wirusa (patrz rozdz. V. Zmienność genomu HIV).

Głównym argumentem przemawiającym przeciwko teorii dryfu antygenowego, a za hipotezą „konia trojańskiego” jest przechodzenie HIV z fazy utajonej do gwałtownego cyklu litycznego, w rezultacie stymulacji antygenowej.

VII. Miejsce HIV w grupie retrowirusów

Genom HIV porównano z genomami następujących retrowirusów: HTLV-I i II, BLV (Bovine Leukemia Virus), MoMuLV (Moloney Murine Leukemia Virus), RSV (Rous Sarcoma Virus) [10], Visna Virus [21], (Ryc. 5). Dwa spośród wymienionych: Mo-MuLV i RSV są wirusami onkogennymi. Ich wspólną cechą jest występowanie w genie *gag*, pomiędzy białkiem p16—p19 a białkiem p30—p27 małej cząsteczki białkowej zwanej prolgagtyną. W cząstkach innych wymienionych wirusów prolgagtyna nie występuje. W RSV występuje dodatkowo onkogen *src* umożliwiający transformację nowotworową. Białka kodowane przez gen *env* RSV i Mo-MuLV są nieco mniejsze niż u HTLV-III. Białka gp120 i gp41 z HIV odpowiadają gp85 i gp37 RSV, oraz gp70 i gp15 Mo-MuLV. W genomach zarówno RSV jak i Mo-MuLV brak jest jednej ramki odczytu występującej w HIV a mianowicie 3'ORF. HTLV-I i II wykazują większe podobieństwo sekwencji nukleotydowej do BLV niż do HIV. Nie stwierdzono u nich występowania 3'ORF. Nie stwierdzono także występowania peptydu transaktywującego. Zdaniem R. C. Gallo, który zalicza HIV do wspólnego typu z HTLV-I i HTLV-II, peptyd transaktywujący jest kodowany w genie *x-LOR* obu tych wirusów, będącym w tej samej fazie odczytu z genem *env* [10]. Gallo uważa, że gen *x-LOR* jest odpowiednikiem rejonu NCR.

Wydaje się jednak, że pomiędzy rejonami *x-LOR* i *tat-III* występują zbyt duże różnice aby można je było uznać za odpowiedniki. Peptyd *x-LOR* (obecnie nazywany w HTLV-I i HTLV-II odpowiednio *tat-I* i *tat-II*) jest ok. trzykrotnie większy od kodowanego przez HIV peptydu *tat-III* [57]. Peptydy *tat-I*, II są kodowane w 3' rejonie genomu za genem *env*.



Objaśnienia

- ENDO — endonukleaza
 PROT — proteaza
 NCR — region niekodujący
 XLOR — długa otwarta ramka odczytu w genie pX
 SOR — krótka otwarta ramka odczytu
 3' ORF — 3' otwarta ramka odczytu

Objaśnienia nazw wirusów w tekście

Ryc. 5 Porównanie struktury retrowirusów (wg. F. Wong-Staal i R. C. Gallo, *Nature* 317, 395, 1985, i P. Sonigo, *Cell* 42, 369–382, 1985, zmodyfikowane). Pytajnik oznacza niepełną informację na temat funkcji lub dojrzewania białka.

Sekwencje wiążące tat-I i tat-II są ulokowane w obrębie rejonu U3 5'LTR [40], zaś sekwencja wiążąca tat-III w HIV znajduje się w rejonie R 5'LTR.

HIV jest najbardziej podobny do wirusa visna. Oba wirusy charakteryzują się podobną sekwencją nukleotydową. Obydwa wykazują podobne efekty cytotopacyjne *in vitro*, zdolność do infekowania komórek mózgu oraz podobną morfologię. Ważnym wreszcie elementem upodabniającym HIV i visna jest to, że odwrotna transkrypcja u obu wirusów inicjowana jest przez tRNA^{lys}. Wydaje się, że HIV jest pierwszym ludzkim wirusem, mogącym być zaliczonym do grupy systematycznej wirusów powolnych [21].

VIII. Odmiany HIV i pokrewne mu wirusy małpie

Wśród szczepów HIV na uwagę zasługują niektóre wirusy pochodzące z Afryki. Wirusy powodujące AIDS występują endemicznie w Zairze i krajach Afryki Centralnej. Ostatnio jednak stwierdzono występowanie retrowirusa podobnego do HIV w Gwinei-Bissau [13]. Wykazuje on morfologiczne i cytopatyczne podobieństwo do HIV, jak również tropizm w stosunku do limfocytów T4. Jest jednak różny od HIV genetycznie i antygenowo. W Senegalii stwierdzono występowanie wirusa bardzo zbliżonego do HIV, ale całkowicie niepatogennego. Przeciwciała przeciwko antygenom tego wirusa posiada spora część populacji Senegalii, a głównie prostytutki [13, 58]. Nowego wirusa nazwano HTLV-IV. *In vitro* namnaża się on w limfocytach T ale ich nie zabija, jak również nie powoduje transformacji nowotworowej zaatakowanych komórek [58].

Również w Afryce stwierdzono występowanie małpich wirusów spokrewnionych z HIV. Jednego z nich nazwanego STLV-III_{AGM} wyizolowano z nie wykazujących żadnych objawów chorobowych afrykańskich koczokodanów (african green monkey) [59]. Inny wirus STLV-III_{MAC} wyizolowany z krwi makaków z zespołem braku odporności immunologicznej (podobnym do AIDS) pod względem morfologii, patogenności a także tendencji do atakowania limfocytów T4, wykazuje podobieństwo do HIV. Białka HIV (gag, env i 3'orf) wykazują reakcje krzyżowe z białkami STLV-III_{MAC}. Metodami serologicznymi stwierdzono, że najbardziej immunogenne są białka gp160 i gp120, podobnie jak w przypadku HIV. Oba zwierzęce szczepy STLV-III_{AGM} i STLV-III_{MAC} są zbliżone antygenowo. Faktu występowania u małp afrykańskich wirusa podobnego do wirusa AIDS nie można bagatelizować, ponieważ, na przykład doustna szczepionka z atenuowanych wirusów polio jest produkowana z pierwotnych nerkowych kultur tkankowych afrykańskich koczokodanów.

Artykuł otrzymano 30 kwietnia 1987

Zaakceptowano do druku 1 czerwca 1987

PISMIENICTWO

1. Montagner L., Brunet J. B., Klatzmann D., (1985), *La Recherche*, **15**, 750—760.
2. *Nature*, **326**, 435—436, (1987).
3. Barre-Sinoussi F., Cherman J. C., Rey F., Nugeyere M. T., Chameret S., Grevesa J., Danguet C., Axler-Blin C., Rosenbaum W., Montagnier L., (1983), *Science*, **220**, 868—871.
4. Gallo R. C., Salahuddin S. Z., Popovic N., Shearer G. M., Kaplan M., Haynes B. F., Palker, T. J., Redfield R., Oleske, J., Saffari B., White G., Foster P., Markham P. D., (1984), *Science*, **224**, 500—503.

5. Levy J. A., Hoffman A. D., Kramer S. M., Laudi J. A., Shimmukuro J. M., Oshiro L. S., (1984), *Science*, **225**, 840—842.
6. Sarngadharan M. G., (1984), *Science*, **224**, 506—508.
7. Sodroski J. G., Rosen C. A., Haseltine W. A., (1984), *Science*, **225**, 381—385.
8. Ho H. D., (1984), *Science*, **226**, 451—453.
9. Groopman J. E., (1984), *Science*, **226**, 447—449.
10. Wong-Staal F., Gallo R. C., (1985), *Nature*, **317**, 395—403.
11. Shaw G. M., Harper M., Hahn P., Epstein R., Gajdusek D. C., Wong-Staal F., Gallo R. C., (1985), *Science*, **227**, 177—182.
12. Coffin J. M., (1986), *Cell*, **46**, 1—4.
13. Alizon M., Wain-Hobson S., Montagnier L., Sonigo P., (1986), *Cell*, **46**, 63—74.
14. Gallo R. C., (1986), *Sci.Am.*, **226**, 78—88.
15. Fenner F., (1975—76), *Intervirology* **6**, 1.
16. Rabson A. B. i Martin M. A., (1985), *Cell*, **40**, 477—480.
17. Coffin J., (1986), *Science*, **232**, 697—700.
18. (1987), *Nature*, **326**, 533.
19. Pert C. B., Hill J. M., Ruff M. R., Berman R. M., Robey W. G., Arthur L. O., Ruscetti F. W., Farrar W. L., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9254—9258.
20. Gonda M., Gallo R. C., Won-Staal F., Clements J., Narayan O., Gilden R., (1985), *Science*, **227**, 173—177.
21. Sonigo P., (1985), *Cell*, **42**, 369—382.
22. Feiberg M., Jarrett R., Aldovin A., Gallo R. C., Wong-Staal F., (1986), *Cell*, **46**, 807—817.
23. Sodroski J., Goh W., Rosen C., Dayton A., Terwilliger E., Haseltine W. A., (1986), *Nature*, **321**, 412—417.
24. Sanchez-Pescador R., Power M., Barr P., Steiner K., Stempien M., Levy J., Dina D., Luciv P., (1985), *Science*, **227**, 484—492.
25. Ratner L., Haseltine W., Patarca R., Livak K., Starcich B., Josephs S., Doran E., Rafalski A. J., Whitehorn E. A., Baumeister K., Ivanoff L., Petteway Jr S. R., Pearson M. L., Lautenberger J. A., Papas T. S., Ghrayeb J., Chang T. N., Gallo R. C., Wong-Staal F., (1985), *Nature*, **313**, 277—284.
26. Allan J. S., Colligan J. E., Lee T., McLane M., Kanki P., Groopman J., Essex M., (1986), *Science*, **230**, 810—813.
27. Franchini G., Robert-Guroff M., Wong-Staal F., Ghrayel J., Kato I., Chang N. T., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5282—5285.
28. Sodroski J., Goh W., Rosen C., Tartar A., Portetelle D., Burry A., Haseltine W. A., (1986), *Science*, **231**, 1549—1553.
29. Kitchen L., Barin F., Sulliro L., McLane M., Bretter D., Levine P., Essex M., (1984), *Nature*, **312**, 367—369.
30. Starcich B., Ratner L., Josephs S., Okamoto T., Gallo R. C., Wong-Staal F., (1985), *Science*, **227**, 538—540.
31. Lee T., Colligan J., Allan S., McLane M., Groopman J., Essex M., (1986), *Science*, **231**, 1546—1549.
32. Kan N., Franchini G., Wong-Staal F., Dubois G., Gerard G. F., Robey J., Lautenberger J., Papas T. S., (1986), *Science*, **231**, 1553—1555.
33. Arya S., Guo C., Josephs S., Wong-Staal F., (1985), *Science* **229**, 69—74.
34. Starcich B., Hahn B., Shaw G. M., McNelly P. D., Modrow S., Wolf

- H., Parks E., Josephs S., Gallo R. C., Wong-Staal F., (1986), *Cell*, **45**, 637—648.
35. Montelaro J., (1984), *J. Biol. Chem.* **259**, 10539—10544.
 36. Zagury D., (1984), *Science*, **226**, 449—451.
 37. Hahn B., (1986), *Science*, **232**, 1548—1553.
 38. Sodroski J., Rosen C. A., Haseltine W. A., (1984), *Science*, **225**, 381—385.
 39. Sodroski J., Patarca R., Rosen C., Wong-Staal F., Haseltine W. A., (1985), *Science*, **229**, 74—77.
 40. Rosen C. A., Sodroski J., Goh W. C., Dayton A. L., Lippke J., Haseltine W. A., (1986), *Nature*, **319**, 555—559.
 41. Cullen B. R., (1986), *Cell*, **46**, 973—982.
 42. Delahodda A., Banroques J., Becav A. M., Goguel V., Pereo J., Schrodler R., Jacq C., w „*Achievements and perspectives of mitochondria research*”, vol. II, wyd. Quogriariello E., Slater E. C., Palmieri F., Saccone C., Kroom A. M., (1985), 79—88.
 43. Fisher A. G., Wong-Staal F., Gallo R. C., (1986), *Nature* **320**, 367—370.
 44. Temin H. M., (1981), *Cell*, **27**, 15.
 45. Dayton A., Sodroski J., Rosen C. A., Goh W. C., Haseltine W. A., (1986), *Cell*, **44**, 941—947.
 46. Mosca J., Bernardik M., Raj N. B. K., Rosen C. A., Sodroski J. G., Haseltine W. A., Pitha P. H., (1987), *Nature*, **325**, 67—70.
 47. Popovic M., Sarngadharam M. G., Read E., Gallo R. C., (1984), *Science*, **224**, 497—500.
 48. Gluzman P., (1981), *Cell*, **23**, 175—182.
 49. Cech T. R., (1986), *Sci. Am.*, **225**, 76—88.
 50. Jacq C., Lazowska J., Słonimski P. P., (1980), *C. R. Acad. Sc. Paris*, **290**, 1—4.
 51. Lazowska J., Jacq C., Słonimski P. P., (1980), *Cell*, **22**, 333—348.
 52. Jacq C., Pajot P., Lazowska J., Dujardin G., Claisse M., Groudinsky O., De la Solle H., Graudchamp C., Labouesse M., Gargouri A., Guiard B., Spyriadakis A., Dreyfus M., Słonimski P. P., w „*Mitochondial genes*”, wyd. Słonimski P. P., Borst P., Attardi G., Cold Spring Harbor Laboratory, New ork, **1892**, 155.
 53. Guiso N., Siffert O., Dauchin A., Spyridakis A., Claisse M., Słonimski P. P., (1984), *EMBO JOURNAL*, **3**, 1769.
 54. Chakrabarti S., Robert-Guroff M., Wong-Staal F., Gallo R. C., Moss B., (1986), *Nature*, **320**, 535—537.
 55. Zagury D., Bernard J., Leonard L., Cheynier R., Feldman M., Sarin P., Gallo R. C., (1986), *Science*, **231**, 850—853.
 56. Fujita T., Shibuya H., Ohashi T., Yamamishi K., Tanigushi T., (1986), *Cell*, **46**, 401—407.
 57. Marx J. L., (1985), *Science*, **227**, 156—157.
 58. Marx J. C., (1986), *Science*, **232**, 157.
 59. Kanki P. J., Alroy J., Essex M., (1985), *Science*, **230**, 951—954.

Redakcja przypomina Autorom, że skróty oznaczające geny zapisujemy kursywą, np. *src*, *mos* itp. W bieżącym zeszycie Autorzy niektórych artykułów niezastosowali się do tej reguły.

LESZEK KACZMAREK*

Genetyczna kontrola pobudzenia cyklu komórkowego

Genetic control of the cell cycle stimulation

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Dane świadczące o genetycznej kontroli pobudzenia proliferacji
- III. Geny, których ekspresja zależy od cyklu komórkowego
- IV. Czynnościowy udział onkogenów i protoonkogenów w pobudzeniu cyklu komórkowego
- V. Podsumowanie: protoonkogeny a aktywacja komórki

Contents:

- I. Introduction
- II. Evidence for the genetic control of the stimulation of cell proliferation
- III. Cell cycle dependent genes
- IV. Functional involvement of protooncogenes and oncogenes in the cell cycle stimulation
- V. Concluding remarks: Protooncogenes and cell activation

Wykaz stosowanych skrótów: EGF — naskórkowy czynnik wzrostowy, IGF-I — czynnik insulino-podobny I, Il-1 — interleukina I, Il-2 — intereleukina 2, M ϕ — makrofagi, NGF — czynnik wzrostu nerwów, PDGF — czynnik wzrostowy pochodzący z płytek, PHA — fitohemaglutynina, PPP — osocze ubogopłytkowe

I. Wstęp

W ostatnich latach upowszechnił się pogląd, że zewnątrzkomórkowymi regulatorami proliferacji komórek są tzw. czynniki wzrostowe (ang. growth factors). Są to na ogół peptydy lub białka, działające za pośrednictwem swoistych receptorów wbudowanych w błonę komórkową [1, 2].

Różne typy komórek wykazują różne wymagania względem czynników wzrostowych i to zarówno odnośnie ilości, jak i rodzajów tych czynników. W największym stopniu owe wymagania poznano w przypadku mysich fibroblastów linii Balb/c 3T3 [3, 4], dla których Stiles i w sp. wyróżnili kompetencyjne i progresyjne czynniki wzrostowe. Czynniki kompetencyj-

*Dr, Zakład Neurofizjologii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, ul. L. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

ne to na mocy definicji te, które regulują pierwszą fazę pobudzenia cyklu komórkowego. Inicjują one pewne procesy biochemiczne, natomiast ich obecność nie wystarcza do wprowadzenia fibroblastów w fazę S cyklu życiowego. Z kolei czynniki progresyjne uzupełniają działanie czynników kompetencyjnych, umożliwiając fibroblastom wejście w fazę S.

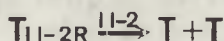
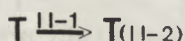
Podstawowym przedstawicielem kompetencyjnych czynników wzrostowych jest białko PDGF (ang. platelet-derived growth factor), które w organizmie jest magazynowane w płytkach krwi. Źródłem zaś czynników progresyjnych jest tzw. osocze ubogopłytkowe (ang. platelet-poor plasma), które w istocie jest surowicą krwi pozbawioną płytek, a zatem i uwalnianego z nich PDGF. Wśród składników osocza ubogopłytkowego (PPP) podstawowym czynnikiem wzrostowym jest IGF-I (ang. insulin-like growth factor I) — insulino-podobny czynnik wzrostowy 1., zwany także somatomedyną C [3, 4]. Ponadto, do czynników progresyjnych zalicza się często EGF (ang. epidermal growth factor) — naskórkowy czynnik wzrostowy [3, 4].

Oprócz fibroblastów, w badaniach pobudzenia cyklu komórkowego często stosuje się limfocyty, a w szczególności mysie splenocyty (komórki śledziony) lub ludzkie komórki jednojądrzaste krwi obwodowej. Te pierwsze stanowią mieszaninę głównie limfocytów T i B, a zawierają także makrofagi. W drugich zaś dominują limfocyty T (50%—70%), ale zarówno limfocyty B, jak i monocyty-makrofagi są również obecne. Zaletą stosowania limfocytów w badaniach pobudzenia proliferacji jest zwłaszcza to, że komórki te, świeżo pobrane z organizmu, znajdują się fizjologicznie w fazie G₀ cyklu życiowego [5].

Pobudzenie proliferacji limfocytów zostanie przedstawione na przykładzie ludzkich limfocytów T. Świeżo pobrane komórki jednojądrzaste krwi obwodowej człowieka można *in vitro* potraktować mitogenem swoistym dla limfocytów T, jakim jest fitohemaglutynina (PHA, ang. phytohemagglutinin). Wówczas tylko limfocyty T wejdą w cykl komórkowy, by w miarę synchronicznie, po ok. 50—60 godzinach rozpocząć syntezę DNA (fazę S). PHA jest białkiem roślinnym — lektyną, o którym wiadomo, że łączy się m.in. z receptorem limfocyta T dla antygeny [6]. Aktywacja tego receptora stanowi zapewne w warunkach fizjologicznych, wewnątrz organizmu, sygnał pobudzenia komórki T do podziału.

Stymulacja proliferacyjna limfocytów T nie ogranicza się do wpływu PHA, czy antygeny na swoisty receptor. Potrzebna jest również współpraca monocytów-makrofagów, występujących wśród komórek jednojądrzastych krwi obwodowej. Izolowane limfocyty T (oczyszczone od makrofagów) nie są efektywnie stymulowane przez PHA do cyklu życiowego. Aczkolwiek fitohemaglutynina inicjuje w takich komórkach pewne procesy, to pozbawione kontaktu z makrofagami limfocyty T, pod wpływem PHA nie podejmują syntezy DNA. Przypomina to trochę działanie czynników kompetencyjnych na fibroblasty.

Dopiero dodanie makrofagów, lub ich białkowego produktu — interleukiny 1 pozwala limfocytom T, traktowanym uprzednio PHA na wejście w fazę S. Rola makrofagów polega na wytwarzaniu wymienionej interleukiny 1, która z kolei stymuluje limfocyty T do produkcji i wydzielania interleukiny 2. Ta ostatnia zwana jest również czynnikiem wzrostowym limfocytów T (ang. T cell growth factor, TCGF), ponieważ umożliwia komórkom mającym swoisty dla niej receptor kontynuację cyklu komórkowego.



Ryc. 1. Schemat pobudzenia limfocytów T do proliferacji

T — limfocyt T, $m\phi$ — makrofag, PHA — fitohemaglutynina, T_{II-2R} — limfocyt T posiadający receptor dla II-2, $m\phi_{(II-1)}$ — makrofag wytwarzający II-1, II-1 — interleukina 1, $T_{(II-2)}$ — limfocyt T wytwarzający interleukinę 2, II-2 — interleukina 2, II-2R — receptor dla II-2

II. Dane świadczące o genetycznej kontroli pobudzenia proliferacji

Pobudzeniu cyklu komórkowego przez czynniki wzrostowe towarzyszy stymulacja ekspresji pewnych genów, których białkowe produkty są wewnątrzkomórkowymi regulatorami tego procesu. Świadczy o tym szereg danych [7].

Przede wszystkim stwierdzono, że zahamowanie aktywności enzymatycznej RNA polimerazy II w komórkach pobudzanych do proliferacji uniemożliwia im osiągnięcie fazy S. Enzym ten można poddać inhibicji za pomocą swoistego związku — alfa-amanityny, albo też dzięki mikroiniekcji swoistego przeciwciała. Można też skorzystać z linii komórkowej BHK ts AF8, wykazującej temperaturo-wrażliwy fenotyp odnośnie aktywności tego enzymu. Komórki tej linii zdolne są do całkowicie normalnego wzrostu i podlegania pobudzeniu wówczas, gdy hodowane są w temperaturze permissyjnej (ang. permissive). W temperaturze niepermissyjnej tzn. wyższej o kilka stopni Celsjusza nie ulegają stymulacji, zatrzymując się w swoim dla siebie punkcie fazy G_1 . Uważa się, że mutacja prowadząca do wytwarzania termolabilnego białka związanego z aktywnością polimerazy RNA II jest przyczyną opisanego fenotypu komórek.

Oprócz tej linii komórkowej, istnieje również szereg innych o podobnym zachowaniu w hodowli, o których jednak wiadomo, że mutacje dotyczą innych genów. Można zatem stwierdzić, że istnieje co najmniej kilka

różnych genów, których ekspresja nie jest krytyczna dla utrzymania przy życiu komórki spoczynkowej, ale jest niezbędna dla skutecznego pobudzenia cyklu życiowego.

III. Geny, których ekspresja zależy od cyklu komórkowego

Opisane w poprzedniej części pracy dane doświadczalne, świadczące o istnieniu genów związanych z regulacją cyklu komórkowego, skłoniły szereg grup badaczy do podjęcia prób identyfikacji takich genów. Zastosowano kilka różnych podejść eksperymentalnych [8].

Podejście najbardziej systematyczne polegało na sporządzeniu bibliotek cDNA swoistych dla komórek pobudzanych do proliferacji, a następnie na różnicowym przeszukaniu takich bibliotek pod kątem sekwencji swoistych dla genów, których ekspresja wzrasta po stymulacji komórek do cyklu życiowego. Otrzymano w ten sposób kilkadziesiąt klonów cDNA komplementarnych do genów, których ekspresja jest regulowana w cyklu życiowym. Następnie szereg z tych klonów poddano sekwencjonowaniu i stwierdzono, że kodują one pewne dobrze już znane białka np. enzymy glikolityczne [9], beta-aktynę [9], wimentynę [10], translokazę nukleotydów adeninowych [11]. Funkcję innych z wyszukanych genów można było wydedukować na podstawie sekwencji nukleotydów a przez to i białek. Na przykład w zespole Nathansa wykryto nowy czynnik wzrostowy — proliferynę [12], a w zespole Basergi nowe białko wiążące wapń — kalcyklinę [13]. Trzeba jednak podkreślić, że funkcja zdecydowanej większości genów, których ekspresja zależy od cyklu życiowego, a które zidentyfikowano dzięki przeszukaniu swoistych bibliotek cDNA, pozostaje nieznana.

Inne podejście badawcze mające na celu określenie genów cyklu komórkowego polega na sprawdzeniu, czy ekspresja pewnych znanych już genów zależy od pobudzenia proliferacji. Stwierdzono np., że ekspresja genów kodujących histony, kinazę tymidylanową, tubuliny, aktyny, interferony, dekarboksylazę ornitynową i kalmodulinę zależy od cyklu komórkowego [8, 14, 15, 16, 17, 18, 19].

Szczególnie owocne okazały się badania protoonkogenów. Wykazano, że ekspresja szeregu z nich wzrasta zdecydowanie w okresie pobudzenia komórek spoczynkowych do cyklu życiowego. Należy tu wymienić takie geny jak: *c-K-ras*, *c-H-ras*, *c-N-ras*, *c-myc*, *c-fos*, *c-myb*, *p53* [8, 14, 15, 16, 17, 18, 19].

W ostatnim okresie stwierdzono, że ekspresja wielu z powyższych genów jest pobudzana nie tylko przez złożone mitogeny (płodowa surowica cielęca, fitohemaglutynina podawana w obecności makrofagów), ale również przez chemicznie czyste czynniki wzrostowe. Na przykład pobudzenie ekspresji *c-myc*, *c-fos*, oraz genów kodujących dekarboksylazę ornitynową,

aktywną i wimentynę może zostać wywołane działaniem PDGF i EGF, ale nie insuliny i PPP [8, 9, 20]. Z kolei Il-2 pobudza czynność protoonkogenu *c-myc* [21].

Co więcej, wykazano również, iż wybiórcza aktywacja szlaków zależnych od określonych przekaźników drugiego rzędu prowadzi do pobudzenia ekspresji niektórych genów. Zaobserwowano np., że stymulacja kinazy białkowej C, a także, niezależnie, podwyższenie stężenia cytoplazmatycznego jonów Ca^{2+} stymuluje ekspresję protoonkogenów *c-fos* i *c-myc* [8, 20].

IV. Czynnościowy udział onkogenów i protoonkogenów w pobudzeniu cyklu komórkowego

Pierwszych danych świadczących o tym, że produkty pojedynczych genów mogą inicjować łańcuch zjawisk prowadzących komórki spoczynkowe do podjęcia replikacji jądrowego DNA, dostarczyły badania wirusów onkogennych o genomach zbudowanych z DNA (SV40, wirus polyoma, adenowirusy) [22]. Na przykład w badaniach Galanti'ego i wsp. [23] stwierdzono, że gen wirusa SV40, kodujący białko T zdolny jest, po wprowadzeniu drogą mikroiniekcji, do pobudzenia cyklu życiowego komórek spoczynkowych. Podobną własność wykazano również dla białkowych produktów genu E1A Adenowirusa [24].

W ostatnich latach zgromadzono liczne dane świadczące o tym, że białkowe produkty niektórych protoonkogenów mogą brać udział w regulacji proliferacji. Stwierdzono, że produkty onkogenów i protoonkogenów rodziny *ras* (*K-ras* i *H-ras*) zdolne są do pobudzenia komórek spoczynkowych do wejścia w cykl życiowy [8]. Co więcej, wybiórcze usunięcie funkcjonalne tych białek z komórek proliferujących (takiego usunięcia można dokonać dzięki iniekcji swoistego przeciwciała) powoduje, że komórki takie zatrzymują się w fazie G_1 , nie będąc zdolne do kontynuacji cyklu życiowego [25].

Również mikroiniekcja przeciwciała skierowanego przeciwko białku p53 hamowała cykl komórkowy w fazie G_1 [8, 26, 27]. Z kolei wprowadzenie drogą mikroiniekcji genu kodującego p53 do komórek spoczynkowych, wprowadzało te komórki w stan kompetencji. To znaczy, że komórki stawały się zdolne do podjęcia syntezy DNA pod warunkiem podania im również czynników progresyjnych np. osocza ubogopłytkowego [28].

Bardzo podobne wyniki przyniosły badania nad protoonkogenem *c-myc*. Również w tym przypadku obecność białka *c-myc* powodowała, że komórki spoczynkowe przechodziły w stan kompetencji [2, 29, 30].

V. Podsumowanie: protoonkogeny a aktywacja komórki do różnych czynności biologicznych

Przedstawione powyżej dane sugerują, że protoonkogeny mogą stanowić składniki genetycznej kontroli pobudzenia komórek do proliferacji. Wypada jednak wspomnieć o licznych danych wskazujących na udział tych samych genów w regulacji różnicowania komórek. Wystarczy powiedzieć, że np. *c-myc*, *c-fos* i *c-H-ras* ulegają zwiększonej ekspresji w wyniku pobudzenia komórek guza chromochłonnego szczura PC12 do różnicowania w kierunku neuronów [8, 31, 32, 33]. Proces neuronalnego różnicowania komórek PC12 odbywa się pod wpływem czynnika wzrostu nerwów NGF (ang. nerve growth factor). Różnicowanie komórek PC12 pod wpływem NGF łączy się z zahamowaniem proliferacji tych komórek. Co więcej mikroinjekcja onkogeny H-ras pobudza komórki PC12 do różnicowania w kierunku neuronów [34].

Podsumowując, wypada stwierdzić, że funkcja protoonkogenów nie jest swoście związana z regulacją proliferacji, ale również z pobudzaniem komórek do wypełniania różnorodnych czynności biologicznych, których podstawą jest ujawnienie nowych cech.

Artykuł otrzymano 10 kwietnia 1987
Zaakceptowano do druku 22 maja 1987

PIŚMIENNICTWO

1. Baserga R., (1985), w: The biology of cell reproduction. Harvard University Press, Cambridge, Londyn.
2. Kaczmarek L., Hyland J. K., Watt R., Rosenberg M., Baserga R., (1985), *Science*, **228**, 1313—1315.
3. Pledger W. J., Stiles C. D., Antoniades H. N., Scher C. D., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4481—4485.
4. Stiles C. D., Capone G. T., Antoniades H. N., Van Wyk J. J., Pledger W. J., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1279—1283.
5. Maizel A. L., Lachman L. B., (1984), *Lab. Invest.*, **50**, 369—377.
6. Chilson O. P., Boylston A. W., Crumpton M. J., (1984), *EMBO J.*, **3**, 3239—3245.
7. Baserga R., Waechter D. E., Soprano K. J., Galanti N., (1985), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **397**, 110—120.
8. Kaczmarek L., (1985), *Lab. Invest.*, **54**, 365—376.
9. Matrisian L. M., Rautman G., Magun B. E., Breathnach., (1985), *Nucleic Acids Res.*, **13**, 711—726.
10. Ferrari S., Battini R., Kaczmarek L., Rittling S., Calabretta B., deRiel J. K., Philiponis V., Wei J. F., Baserga R., (1986), *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3614—3620.
11. Battini R., Ferrari S., Kaczmarek L., Calabretta B., Chen S. T., Baserga R., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 4355—4359.

12. Linzer D. I. H., Nathans D., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4255—4259.
13. Calabretta B., Battini R., Kaczmarek L., deRiel J. K., Baserga R., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 12628—12632.
14. Fausto N., (1984), *Mol. Cell Biochem.*, **59**, 131—147.
15. Makino R., Hasaki K., Sugimura T., (1984), *Nature*, **310**, 697—698.
16. Kelly K., Cochran B., Stiles C. D., Leder P., (1983), *Cell*, **35**, 603—610.
17. Campisi J., Gray H. E., Pardee A. B., Dean M., Sonenhein G. E., (1984), *Cell*, **36**, 241—247.
18. Kaczmarek L., Calabretta B., Baserga R., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5375—5379.
19. Torelli G., Selleri L., Donelli A., Ferrari S., Emilia G., Venturilli D., Morreti L., Torelli U., (1985), *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 2874—2876.
20. Kaczmarek L., (1987), *Kosmos A*, **36**, 47—59.
21. Kaczmarek L., Calabretta B., Baserga R., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 410—416.
22. Weil R., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **516**, 310—388.
23. Galanti N., Jonak J. J., Soprano K. J., Floros J., Kaczmarek L., Weissman S., Reddy V. B., Tilghman S. M., Baserga R., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 6469—6474.
24. Kaczmarek L., Ferguson B., Rosenberg M., Baserga R., (1986), *Virology*, **152**, 1—10.
25. Mucahy L. S., Smith M. R., Stacey D. W., (1985), *Nature*, **313**, 241—243.
26. Mercer W. E., Nelson D., DeLeo A. B., Old L. J., Baserga R., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6309—6312.
27. Mercer W. E., Avignolo C., Baserga R., (1984), *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 276—281.
28. Kaczmarek L., Oren M., Baserga R., (1986), *Exp. Cell Res.*, **162**, 268—272.
29. Armelin H. A., Armelin M. C. S., Kelly K., Stewart T., Leder P., Cochran B. H., Stiles C. D., (1984), *Nature*, **310**, 655—659.
30. Kaczmarek L., Surmacz E., Baserga R., (1986), *Cell Biol., Int. Rep.*, **10**, 455—463.
31. Curran T., Morgan J. L., (1985), *Science*, **229**, 1265—1267.
32. Greenberg M. E., Greene L. A., Ziff E. B., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 1401—1410.
33. Kruijer W., Schubert D., Verma I. M., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7330—7334.
34. Bar-Sagi D., Feramisco J. R., (1985), *Cell*, **42**, 841—848.

- 12. Linder, Carl M. (1889-1955)
- 13. Caldwell, B. (1889-1955)
- 14. ... (1889-1955)
- 15. ... (1889-1955)
- 16. ... (1889-1955)
- 17. ... (1889-1955)
- 18. ... (1889-1955)
- 19. ... (1889-1955)
- 20. ... (1889-1955)
- 21. ... (1889-1955)
- 22. ... (1889-1955)
- 23. ... (1889-1955)
- 24. ... (1889-1955)
- 25. ... (1889-1955)
- 26. ... (1889-1955)
- 27. ... (1889-1955)
- 28. ... (1889-1955)
- 29. ... (1889-1955)
- 30. ... (1889-1955)
- 31. ... (1889-1955)
- 32. ... (1889-1955)
- 33. ... (1889-1955)
- 34. ... (1889-1955)

KRZYSZTOF JAGŁA*, JAN DOMANIEWSKI**

Geny transformujące wykrywane metodą transfekcji

Transforming genes as detected by transfection

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Geny związane z transformacją nowotworową
- III. Wprowadzanie fragmentów DNA do komórek eukariotycznych metodą transfekcji zależnej od fosforanu wapnia
- IV. Ocena aktywności transformacyjnej genów wprowadzanych do komórek metodą transfekcji
- V. Aktywacja genów transformujących w komórkach nowotworowych
 - V-1. Współdziałanie onkogenów oraz aktywujące własności sekwencji wirusowych
 - V-2. Własności transformujące wysokocząsteczkowego DNA nowotworowego
 - V-3. Geny fuzyjne
- VI. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Genes related to neoplastic transformation
- III. Introduction of DNA fragments to eucaryotic cells by calcium phosphate — depended transfection
- IV. Appreciation of transforming activity of the genes introduced to cells by transfection
- V. Activation of transforming genes in tumor cells
 - V-1. Oncogenes cooperation and activation effects of the viral sequences
 - V-2. Transforming properties of the high molecular, tumor DNA
 - V-3. Fusing genes
- VI. Final remarks

I. Wstęp

Przekształcenie komórek normalnych w nowotworowe może zachodzić w wyniku przyjęcia przez komórki egzogenego DNA (najczęściej prowi-rusowego DNA wirusów onkogennych lub DNA wyizolowanego z komórek

* Mgr, ** Prof. dr hab., Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej, Akademia Medyczna, ul. M. Curie-Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz

nowotworowych) albo pod wpływem różnych czynników fizycznych lub chemicznych. Proces ten określanym jest mianem transformacji nowotworowej*. Natomiast wprowadzenie egzogenego materiału genetycznego do komórek (najczęściej hodowanych *in vitro*) nosi nazwę transfekcji**. Zmiany towarzyszące przemianie komórki normalnej w nowotworową mają podłoże genetyczne i są następstwem przegrupowań strukturalnych genomu prowadzących do „aktywacji” komórkowych genów transformujących (protoonkogenów). Większość poznanych protoonkogenów charakteryzuje się wysoką stabilnością ewolucyjną — wykazują one dużą homologię w grupie organizmów wyższych. Świadczy to o ich udziale w podstawowych procesach życiowych (wzrost, proliferacja) normalnych komórek somatycznych. Wyraźny postęp w badaniach nad identyfikacją komórkowych genów transformujących nastąpił głównie dzięki zastosowaniu metod umożliwiających wprowadzanie genów do komórek. Obecnie wiadomo, że komórki eukariotyczne zdolne są do przyjęcia egzogenego DNA w postaci całych chromosomów [1], w wyniku przeniesienia sekwencji genowych w wektorach wirusowych DNA-wirusów [2, 3], bądź w liposomach [4], a także przy użyciu mikroiniekcji [5], elektropulsacji [6] oraz w wyniku fuzji komórek bakterii z eukariotycznymi komórkami docelowymi [7]. Ponadto DNA może być wprowadzony do komórek metodą transfekcji zależnej od DEAE-dextranu [8] oraz zależnej od precypitacji DNA z fosforanem wapnia [9]. Ostatnia z wymienionych powyżej technik jest podstawową metodą umożliwiającą identyfikację onkogenów komórkowych. Jednocześnie testy transfekcyjne pozwalają na ocenę własności transformujących genów związanych z procesem transformacji nowotworowej. Badania z wykorzystaniem transfekcji dały dowody na to, że przebieg spontanicznie powstających nowotworów człowieka i zwierząt jest zwykle procesem wieloetapowym, prowadzącym do wyodrębniania się nowych subklonów komórkowych zastępujących formy macierzyste w wyniku selektywnych przystosowań do wzrostu.

II. Komórkowe geny związane z transformacją nowotworową

Na temat genów transformujących i molekularnego podłoża procesu transformacji nowotworowej ukazało się w piśmiennictwie szereg szczegółowych opracowań [10—22]. Przyjmuje się, że w trakcie rozwoju nowotworów obok tzw. genów transformujących odpowiedzialnych za przemianę

* Problem transformacji nowotworowej został szeroko omówiony w artykule Chorążego i Szali (*Post. Biochem.*, **29**, (1983), 261—298). Niektóre aspekty poruszone były również w artykułach E. Kalinowskiej (*Post. Biochem.*, **31**, (1985), 617—630) oraz B. Gołoś (*Post. Biochem.*, **31**, (1985), 601—615).

** Na temat ekspresji genów wprowadzanych do komórek metodą transfekcji ukazał się w *Postępkach Biochemii* artykuł Ewy Kalinowskiej (*Post. Biochem.*, **31**, (1985), 617—630).

ny komórek normalnych w nowotworowe (onkogeny wirusowe bądź aktywowane onkogeny komórkowe*), istotną rolę odgrywają geny o funkcji supresorów nowotworowych oraz tzw. geny modulatory. Sekwencje supresyjne, zwane też „anty-onkogenami” [15, 17] ulegają delecji lub funkcjonalnemu zablokowaniu przed rozpoczęciem rozwoju nowotworu. Przykładem może być zlokalizowany w chromosomie 13 gen *rb-1*, którego normalna funkcja polega na indukowaniu końcowego różnicowania się komórek w tkance. W komórkach retinoblastomy *rb-1* może występować w postaci heterozygotycznej lub homozygotycznej [17]. W przypadku heterozygotyczności genu *rb-1* zmiany transformacyjne komórek retinoblastoma są ściśle związane z wcześniejszą mutacją lub delecją jednego allelu, przy czym mutacje zachodzące w komórkach rozrodczych mogą być dziedziczone. Natomiast w przypadku homozygotyczności, mutacji (somaticzna mutacja recesywna) lub delecji (często z większym fragmentem chromosomu 13) ulegają obydwie allele *rb-1* [17].

Analogiczne „leżje” pojedynczych genów towarzyszą powstaniu takich nowotworów jak neuroblastoma, drobnokomórkowy rak płuc czy też guz Wilms'a [15]. Własności supresyjne recesywnych anty-onkogenów stwierdzono także wykonując analizy cytogenetyczne komórek hybrydowych (komórka nowotworowa x komórka normalna) wykazujących utratę cech onkogennych [15]. Geny modulatory należą prawdopodobnie do dużej grupy genów, wpływających na rozwój nowotworu. Są wśród nich geny zgodności tkankowej (ang. MHC — major histocompatibility complex genes), a także geny enzymów proteolitycznych (np. kolagenaza IV). Produkty tych genów choć nie biorą udziału w transformacji nowotworowej, wpływają na „uzłośliwienie” komórek nowotworowych (na ich inwazyjny wzrost) oraz „wymykanie” się spod immunologicznej kontroli organizmu [15].

W genomach normalnych komórek organizmów wyższych stwierdzono występowanie szeregu genów (protoonkogenów), które w formie „zaktywowanej” — w wyniku mutacji punktowych, insercji promotora wirusowego, translokacji chromosomalnej lub innych przegrupowań strukturalnych (geny fuzyjne), zdolne są do wywołania transformacji nowotworowej [10—18, 23, 24]. Protoonkogeny komórkowe (proto-onc) w komórkach normalnych stanowią około 0,1% wszystkich genów [25] i biorą udział w procesach wzrostu i różnicowania komórek [10, 15, 16, 19, 22]. Stwierdzono dużą homologię genów proto-onc ze znanymi wcześniej sekwencjami onkogennych retrowirusów. W wyniku przeprowadzonych analiz ustalono, że onkogeny komórkowe w przeciwieństwie do wirusowych są typowymi genami mozaikowymi i składają się z intronów oraz eksonów. Obecnie przeważa pogląd [10—16, 18], że onkogeny wirusowe są pobranymi w wy-

* Różnice pomiędzy onkogenami komórkowymi (c-onc) i wirusowymi (v-onc) oraz ich udział w procesie transformacji nowotworowej zostały omówione w artykule Chorążego i Szali (*Post. Biochem.*, 29, (1983), 261—298).

niku rekombinacji genetycznej fragmentami proto-onkogenów komórkowych, które podlegają transkrypcji, a onkogenne retrowirusy — wtórnie powstałymi chimerami. Nie wszystkie komórkowe geny transformujące mają jednak swoje odpowiedniki w genomach retrowirusowych. Nie zidentyfikowano dotychczas sekwencji v-onc homologicznych z onkogenami raka sutka int-1 i int-2 [26—28], a także genami Pim-1 i tek [29, 30] oraz onkogenem kodującym białko p53 [31, 32]. Na podstawie różnic w lokalizacji oraz w strukturalnych i czynnościowych własnościach białkowych produktów aktywacji można wyróżnić pięć grup poznanych dotychczas onkogenów komórkowych [18, 19] (Tab. 1).

Tabela 1

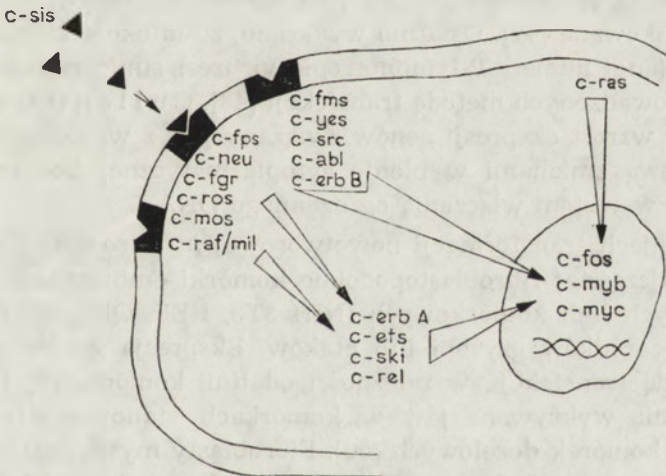
Podział onkogenów komórkowych pod względem lokalizacji i własności białkowych produktów ich aktywacji.

Sporządzono na podstawie pozycji literaturowych nr. 18, 19, 21, 22, 24, 61.

Grupa	Onkogeny	Lokalizacja produktów białkowych	Własności produktów białkowych
I	c-sis	płyny ustrojowe, powierzchnia błon komórkowych	czynnik wzrostu komórek, homologiczny z podjednostką B PDGF
II	c-src, c-fms, c-ros, c-neu, c-abl, c-fgr, c-erbB, c-yes, c-fes/fps, oncD (c-trk)	błony cytoplazmatyczne	receptorowe białka błonowe, wykazujące aktywność kinazy tyrozynowej (produkt c-erbB jest homologiczny z receptorem EGF)
IIa	c-raf/mil, c-mos	błony cytoplazmatyczne	białka wykazujące aktywność kinazy serynowej
III	c-erbA, c-ets, c-rel, c-ski, met, mel, Blym, dbl, mcf-2, mcf-3	cytoplazma, błony lub nieznaną	białka receptorowe lub nieznaną (produkt c-erbA jest homologiczny z receptorem tyroksyny)
IV	c-ras	błony cytoplazmatyczne	białko związane z aktywnością GTP-azy
V	c-fos, c-myc, c-myc, p53	jądra	białka uczestniczące w regulacji transkrypcji genów

Podstawą do takiego podziału stały się wyniki badań, w których stwierdzono homologię pomiędzy produktami onkogenów, a czynnikami wzrostowymi oraz ich receptorami. Wykazano między innymi, że skład aminokwasowy i struktura produktu białkowego onkogeny c-sis (p28), są identyczne z sekwencją i strukturą podjednostki B czynnika wzrostowego z płytek

krwi (PDGF) [21, 22, 33], natomiast produkty onkogenów c-erbB i c-fms są homologiczne z receptorami innych czynników wzrostowych odpowiednio EGF i CSF-1 [19, 34—36]. Ponadto białkowe produkty aktywacji takich onkogenów jak c-ros, c-neu, c-fgr, c-yes, c-src, c-abl, (c-fps), wykazują aktywność kinazy tyrozynowej, charakterystyczną dla białek receptorowych i są ściśle związane z błoną komórkową [19, 37—41]. Osobną grupę stanowią onkogeny c-myc, c-myb i c-fos, których produkty lokalizowane są w jądrach komórkowych i pełnią funkcję regulatorów transkrypcji [12—16]. Tak szeroki zakres czynnościowy onkogenów komórkowych sugeruje występowanie powiązań funkcjonalnych pomiędzy nimi. Stiles [22] i Heldin [21] zakładają istnienie kaskadowej aktywacji onkogenów (Ryc. 1), prowadzącej do wytworzenia nowotworowego fenotypu komórek. Zgodnie z tym modelem czynniki wzrostowe (np. PDGF), mogłyby inicjować zmiany transformacyjne w komórkach wpływając poprzez oddziaływanie z receptorami błonowymi na procesy regulacji transkrypcji genów. Zmiana ekspresji onkogenów kodujących białka związane z aktywnością kinaz białkowych mogłaby następnie prowadzić do wzrostu pobudliwości komórek na czynniki wzrostowe i w efekcie na przyspieszenie tempa podziałów komórkowych. W późniejszych stadiach rozwoju nowotworu możliwa byłaby redukcja kaskady polegająca na uniezależnieniu się komórek nowotworowych od wpływu czynników wzrostowych.



Ryc. 1. Schemat kaskadowej aktywacji onkogenów komórkowych. Sporządzono na podstawie danych o lokalizacji i funkcji białkowych produktów aktywacji onkogenów (Tab. 1) oraz na podstawie pozycji literaturowych nr. 21 i 22.

Obecnie prowadzone są badania, których celem jest poznanie udziału różnych onkogenów komórkowych w procesie transformacji nowotworowej. Większość doświadczeń tego typu wykonano dzięki zastosowaniu testów transfekcyjnych.

III. Wprowadzanie DNA do komórek metodą transfekcji zależnej od fosforanu wapnia

Transfekcja zależna od fosforanu wapnia została po raz pierwszy opisana przez Grahama i Van der Eba w 1973 roku [9]. Opracowana wówczas metodyka była wielokrotnie modyfikowana, między innymi przez zespół Wiglera [42] oraz Barbacida [43], główna jej zasada pozostaje jednak niezmienną. Proces transfekcji polega na inkubacji komórek (najczęściej w hodowli jednowarstwowej) z DNA osadzonym na kryształach fosforanu wapnia. Strąć Ca-PO_4 -DNA przygotowuje się poprzez dodanie chlorku wapnia do preparatów DNA rozpuszczonych w buforze zawierającym fosforany. Tworzony precypitat ulega adsorpcji na powierzchni błon komórkowych, a następnie wchłaniany jest przez komórki, prawdopodobnie w wyniku procesu fagocytozy [44]. Ekspresja wprowadzanego DNA wykrywalna jest po około 20 godzinach po transfekcji [45] oraz po 3 godzinach w przypadku mikroiniekcji DNA do jąder komórek ptasich [46]. Wynika z tego, że transport DNA z błony cytoplazmatycznej do jąder trwa około 17 godzin. Jednakże mechanizmy warunkujące przyjęcie przez komórki wprowadzonego metodą transfekcji DNA, a następnie jego aktywację są słabo poznane. Prawdopodobnie sekwencje egzogenego DNA są połączone ze sobą w postaci dużych struktur liniowych, które są wbudowywane do DNA komórek biorców, a następnie w całości replikowane [47]. Ostatnio wykazano, że infekcja komórek wirusami HTLV (ang. human T-lymphotropic viruses) silnie podnosi ekspresję genów wprowadzonych metodą transfekcji [48]. Cullen [49] sądzi, że obserwowany wzrost ekspresji genów związany jest z wywołanymi infekcją retrowirusową zmianami w błonie cytoplazmatycznej komórek biorców i w efekcie wzrostem włączania egzogenego DNA.

W badaniach transformacji nowotworowej *in vitro* transfekcji poddawane są najczęściej fibroblastopodobne komórki embrionalne pochodzące z utrwalonych linii komórkowych (NIH 3T3, REF, QEC, itp.), wprowadzonych z zarodków gryzoni lub ptaków. Ekspresja genów wprowadzanych metodą transfekcji, w zależności od linii komórkowej i warunków doświadczenia wykrywana jest w komórkach stanowiących 10^{-6} — 10^{-4} wszystkich komórek docelowych [50]. Fibroblasty mysie linii BALB/c 3T3 zdolne są do przyjęcia obcego DNA w ilości odpowiadającej 1/3 zawartości DNA jądrowego (w przeliczeniu na jedną komórkę) (badania własne). Efektywność transfekcji (ilość wprowadzonych sekwencji) uzależniona jest od ilości oraz wielkości fragmentów DNA, od doboru warunków precypitacji (stężenie chlorku wapnia, skład i pH buforu zawierającego fosforany) oraz od czasu inkubacji komórek z precypitatem ([9] oraz badania własne). W przypadku prowadzenia transfekcji fragmentami genowymi klonowanymi w plazmidach korzystne jest stosowanie dodatkowo DNA wysoko-

cząsteczkowego jako materiału nośnikowego [9]. Wzrost kompetencji* komórek biorców do przyjęcia egzogenego materiału genetycznego można uzyskać poprzez inkubację komórek z DEAE-dextranem bezpośrednio przed transfekcją [9] lub krótkotrwałą inkubacją z 20% dimetylosulfotlenkiem [51] albo z 25% glicerolem [52] podczas transfekcji.

W celu wprowadzenia wysokocząsteczkowego DNA, korzystne wydaje się zastosowanie inkubacji precypitatu DNA z komórkami znajdującymi się w zawiesinie (badania własne) — zgodnie z modyfikacją transfekcji wg Chu i Sharpa [53]. W efekcie takiego postępowania uzyskujemy wzrost powierzchni kontaktowej oraz większe prawdopodobieństwo fagocytozy strątu $\text{Ca-PO}_4\text{-DNA}$. Klony komórek wykazujących ekspresję wprowadzonych sekwencji DNA otrzymuje się w wyniku selekcji komórek biorców. W tym celu wraz z fragmentami DNA precypitacji poddaje się markery plazmidowe, zawierające najczęściej gen „neo” odporności na neomycynę [54—57] bądź gen „tk” — kinazy tymidynowej [56, 57]. Komórki po transfekcji przenosi się na podłoża selektywne, zawierające analog neomycyny (Geneticine G-418) lub tzw. medium HAT (hipoksantyna, aminopteryna, tymidyna), a otrzymane w efekcie kolonie opornych komórek poddaje się testom na ekspresję wprowadzanych genów. Obok metod hybrydyzacji kwasów nukleinowych [58] z powodzeniem stosowane są tu przeciwciała monoklonalne przeciwko antygenom kodowanym przez wprowadzane sekwencje genowe [52, 59].

IV. Ocena aktywności transformacyjnej genów wprowadzanych do komórek metodą transfekcji

W kulturze fibroblastopodobnych komórek embrionalnych (NIH 3T3, REF, QEC), poddanych transfekcji przy użyciu wirusowych lub komórkowych genów transformujących, zachodzą zmiany w morfologii oraz w przystosowaniu komórek do wzrostu i proliferacji. Powstają ogniska (kolonie) stransformowanych komórek (ang. focus formation). W ogniskach obserwowany jest wzrost wielowarstwowy, spowodowany zanikiem zjawiska hamowania kontaktowego (charakterystycznego dla hodowli normalnych fibroblastów) oraz brakiem zdolności komórek do adhezji na ścianach naczyń hodowlanych (ang. anchorage independent). Oceny własności transformujących wprowadzanych sekwencji dokonuje się na podstawie wyników testów transfekcyjnych — testu na tworzenie ognisk komórkowych w pożywce płynnej (ang. focus assay) oraz testu na tworzenie kolonii ko-

* Wzrost kompetencji komórek do przyjęcia egzogenego DNA wprowadzanego metodą transfekcji zależnej od fosforanu wapnia, rozumiany jest tu jako efekt działania wymienionych związków chemicznych na błonę komórkową, który prawdopodobnie objawia się wzrostem tempa fagocytozy strątu $\text{Ca-PO}_4\text{-DNA}$.

mórek w półpłynnym agarze (ang. colony formation in soft agar) [60—64]. Tumorogenność otrzymanych klonów komórek (zdolność do wywoływania nowotworów) sprawdza się przez podanie ich nagim myszom (ang. nude mice). W przypadku „focus assay” ogniska stransformowanych komórek oblicza się w 10—14 dniu po transfekcji prowadząc hodowlę przy obniżonym do 5% stężeniu surowicy cielej [65]. Przyjmuje się, że ilość ognisk komórkowych w przeliczeniu na μg DNA użytego do transfekcji (FFU/ μg DNA — focus forming units) stanowi wskaźnik własności transformujących wprowadzanych genów.

Otrzymane klony komórek można poddać następnie testom na przeżywalność oraz zdolność do proliferacji [65], określając w ten sposób tzw. stabilność transformacji. W wyniku transformacji komórek *in vitro* zwiększa się poziom wydzielanych przez nie do medium czynników wzrostowych, takich jak TGF (transforming growth factor), FGF (fibroblasts growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), EGF (epidermal growth factor) i inne. Dla określenia ekspresji genów, kodujących białka wzrostowe stosuje się nieraz test mitogeny [66]. Supernatanty z komórek poddanych transfekcji, zawierające czynniki wzrostowe są zbierane i następnie podawane jako mitogeny do hodowli normalnych komórek. Wzrost tempa podziałów komórek świadczy o podwyższonym poziomie czynników wzrostowych oraz w sposób pośredni o aktywności transkrypcyjnej genów związanych z procesem transformacji nowotworowej. Opisanie powyżej testy wymagają jednak zawsze wiarygodnie przeprowadzanych prób kontrolnych ze względu na spontaniczne zmiany transformacyjne jakim ulegać mogą komórki z linii ustabilizowanych. Badania prowadzone przez zespół W i g l e r a [67] oraz C o o p e r a [68] dowiodły bowiem, że w wyniku transfekcji fibroblastów NIH 3T3 przy użyciu DNA z normalnych komórek człowieka może dojść do powstania genów transformujących.

V. Aktywacja genów transformujących w komórkach nowotworowych

Zgromadzone do tej pory dane eksperymentalne świadczą o tym, że „aktywacja” pojedynczego onkogenu, zarówno w wyniku przyłączenia promotora jak i w wyniku translokacji czy mutacji jest niewystarczająca dla całkowitego przekształcenia komórek normalnych w nowotworowe. Uzyskane w efekcie zmiany (w przypadku linii pierwotnych) polegają zwykle na wykształceniu fenotypu komórek „nieśmiertelnych” (immortalizowanych), pozbawionych jednak zdolności tworzenia kolonii w miękkim agarze oraz indukowania nowotworów u nagich myszy. Wprowadzenie do komórek normalnych dwóch aktywnych onkogenów jednocześnie lub

w wyniku następujących po sobie transfekcji znacznie zwiększa częstość transformacji. Podobną funkcję mogą pełnić wprowadzane wraz z onkogenem sekwencje wzmacniające (ang. enhancer) lub promotorowe (najczęściej pochodzenia wirusowego). Silne własności transformujące onkogennych retrowirusów związane są również z aktywnością dwóch zintegrowanych onkogenów komórkowych. Przykładem może być genom ptasiego retrowirusa Mill-Hill Nr. 2 (MH2), indukującego nowotwory i transformującego komórki *in vitro*. Zawiera on onkogen v-myc (obecny także w trzech innych retrowirusach MC29, CMII i OK10) oraz onkogen v-mil o sekwencji zbliżonej do genu src wirusa RSV [69]. W ptasich komórkach NR (ang. neuroretina cells) transformowanych MH2 wykryto mutanta MH2 (MH2PA200), niezdolnego do morfologicznej transformacji ptasich komórek embrjonalnych. Brak własności transformujących mutanta okazał się wynikiem — delecji części genu v-myc i brakiem jego aktywności [70].

Transformowane onkogenami myc lub ras komórki linii REF (ang. rat embryo fibroblasts) nie są zdolne do wywołania nowotworów u nagich myszy. Dopiero w wyniku wprowadzenia obu onkogenów jednocześnie fibroblasty REF zmieniają się w typowe komórki nowotworowe [65]. Aktywacja c-myc może następować w wyniku insercji sekwencji retrowirusowych, co stwierdzono w indukowanym wirusem ALV chłoniaku Burkitta [23], wywodzącym się z limfocytów B odpowiedzialnych za produkcję immunoglobulin. Obok genu c-myc w komórkach BL (ang. Burkitt lymphoma) wykryto wysoką ekspresję innych onkogenów, Blym oraz N-ras [72, 73]. W tym wypadku „aktywacja” c-myc związana jest raczej z początkowym etapem transformacji nowotworowej, natomiast „aktywacja” Blym lub N-ras z wytworzeniem nowotworowego fenotypu komórek BL [74].

V-1. Współdziałanie onkogenów oraz aktywujące własności sekwencji wirusowych

Zupełnie odmienny mechanizm aktywacji c-myc występuje w afrykańskiej odmianie chłoniaka Burkitta, która jest silnie związana z infekcją wirusem Epsteina-Barra (EBV) [14]. Wykazano, że EBV jest potencjalnym czynnikiem „unieśmiertelniającym” dla ludzkich komórek B, a jego aktywność wykrywana jest w postaci dwóch antygenów jądrowych, EBNA-1 i EBNA-2. Limfocyty krwi osób zakażonych EBV mają niewielką zdolność do tworzenia kolonii w agarozie i nie tworzą nowotworów u nagich myszy. Dane te wskazują, że DNA EBV odpowiedzialne jest za początkowy etap transformacji nowotworowej komórek B. Świadczy o tym również fakt, że komórki transformowane EBV w przeciwieństwie do nowotworowych komórek BL, są zależne od wydzielanego przez nie czynnika wzrostowego — BCGF (B — cell growth factor) [14]. Stwierdzono, że uzyskanie typowego fenotypu nowotworowego przez komórki infekowane

EBV, związane jest ściśle z aktywacją c-myc, który ulega translokacji do jednego z trzech loci immunoglobulinowych [14]. Ten typ „aktywacji” c-myc warunkuje zmiany komórek charakterystyczne dla późnej fazy transformacji nowotworowej [14].

Ostatnio zaobserwowano również współdziałanie pomiędzy onkogenami c-myc i c-raf. Przeprowadzenie badań nad kooperacją tych dwóch onkogenów podyktowane było wykryciem w komórkach jednej z odmian drobnokomórkowego raka płuc SCLC — SC/LC (ang. small cell/large cell) amplifikacji genu c-myc [75] oraz ekspresji c-raf-1 [76]. Cleveland i w s.p. [25] skonstruowali rekombinanty pomiędzy plazmidami p3611MSV (raf) oraz pMH2 (mil/myc) i pMC29 (myc), otrzymując formy J-1, J-2, J-3, J-5. Hybrydy J-1 i J-2 zawierały fragmenty raf końca 5' z plazmidu p3611-MSV oraz mil końca 3' z pMH2, połączone z fragmentem 5' myc pochodzącym z pMH2, przy czym forma J-2 zawierała dodatkowo sekwencje myc końca 3' pMC29. Rekombinant J-3 w porównaniu z J-2 pozbawiony był 17 kodonów w miejscu SphI końca 3', w którym dołączony był do fragmentu mil, natomiast J-5 zawierał tylko v-myc z pMC29. Stwierdzono, że wirusy J-1 i J-2 w przeciwieństwie do J-3 i J-5 indukują tworzenie ognisk w hodowli komórek NIH 3T3 i wywołują nowotwory u nagich myszy. Wcześniej zaobserwowano także [77, 78], że do wzrostu *in vitro* komórek pochodzących z guzów indukowanych u myszy wirusem 3611-MSV (v-raf) konieczna jest interleukina 3 (IL-3). Okazało się jednak, że uniezależnienie tych komórek od IL-3 można uzyskać przez transfekcję wirusami transdukującymi v-raf i v-myc [25]. Tym samym wykazano współdziałanie onkogenów myc i raf w procesie transformacji nowotworowej.

Serię ciekawych doświadczeń przeprowadził Smith i w s.p. [79] wykazując, że związanie produktu onkogeny ras (p21) przeciwciałem antyp21 (Y13-259) prowadzi do zmian w transformacji komórek NIH 3T3. Stwierdzono, że fibroblasty NIH 3T3 poddane transfekcji onkogenami, kodującymi białka homologiczne z receptorami czynników wzrostowych (fes, fms, src), są zależne od obecności p21. Neutralizacja białka p21 powodowała obniżenie włączania ³H-tymidyny do komórek. Natomiast komórki transformowane onkogenami, których produkty lokalizowane są w cytoplazmie i wykazują aktywność kinazy serynowej (mos, raf) okazują się być niezależne od ekspresji genu ras. Interesująco przedstawia się również aktywacja onkogeny c-mos. Dotychczas [80, 81] znane były aktywujące własności wirusopodobnych cząstek A (IAP — ang. intracisternal A particle), które ulegały wbudowywaniu do sekwencji kodujących genu c-mos. Sekwencje powtarzalne IAP (IAP LTR) zawierają dwa promotory, jeden odpowiedzialny za transkrypcję genomu IAP, drugi zaś inicjujący transkrypcję c-mos. Ostatnio okazało się, że włączanie promotora genu c-mos może być regulowane przez produkty białkowe onkogenów c-myc, p53,

wirusa SV40 i adenowirusa E1A [82]. W ten sposób IAP LTR byłyby ogólnie pośrednim w procesie transaktywacji onkogeny c-mos. Zdaniem Lurii i Horowitza [82], autorów doświadczeń, obserwowane przez nich zjawisko transaktywacji może występować również jako jeden z mechanizmów aktywacji innych onkogenów. Podobnie, wbudowane prowirusowe sekwencje o charakterze promotorowym lub wzmacniającym są ściśle związane z aktywną formą innych onkogenów. Przykładem może być wbudowanie fragmentów LTR (ang. Long terminal repeat) w regionie promotora genu c-myc, przy pierwszym eksonie końca 5' [20] oraz aktywacja genów int-1, int-2 lub Pim-1, odpowiednio przez wirusy MMTV i MLV [20, 28]. Duże znaczenie przypisuje się również wpływowi prowirusowych sekwencji gag na aktywność transformacyjną onkogenów. Mathey-Prevot i Baltimore [83] porównali własności transformujące genów v-abl, v-src, i v-fps, potwierdzając wcześniejsze doniesienie [84], że delecja gag w wirusie A-MuLV przenoszącym v-abl odpowiedzialna jest za utratę zdolności wirusa do transformacji komórek limfoidalnych. Ponadto wykazano, że wbudowanie sekwencji gag na końcu 5' onkogenów v-src i v-fps, pozbawionych promotora, zwiększa ich aktywność transformacyjną (mierzoną w FFU) od 3 do 5 razy [83].

„Aktywacja” onkogenów z rodziny ras związana jest z mutacjami punktowymi. Występują one w kodonie 12 i 61 [11, 85], przy czym znana jest również mutacja kodonu 13 w genie N-ras [86]. Własności transformujące c-Ha-ras z mutacjami pojedynczymi (12 lub 61) oraz podwójnymi [12 i 61] są takie same [85], jedynie Cichutek i Duesberg [87] utrzymują, że zmiany mutacyjne nie mają wpływu na „aktywację” onkogenów z grupy ras. Wiadomo natomiast, że czynnikiem pobudzającym ekspresję c-ras może być antygen p53 [88, 89], onkogen c-myc, gen kodujący tzw. duży antygen T (large T-antigen) oraz geny adenowirusa E1 [63, 65, 90, 91]. Ostatnio grupa Weinberga [65] przeprowadziła wnikliwe badania własności transformujących c-Ha-ras. Wykazano, że ras wprowadzony do komórek REF wraz z genem neo oporności na neomycynę, wywołuje stabilną transformację nowotworową w 10% kolonii komórek, które w wyniku transfekcji uzyskały odporność na neomycynę. Pobrane z kolonii klony komórek posiadały 10-krotnie wyższą ekspresję ras aniżeli komórki transformowane łącznie genami ras i myc. Nowotworowa transformacja komórek REF przez jeden onkogen jest więc możliwa, lecz zachodzi z niezwykle małą częstością i związana jest z wysokim poziomem ekspresji wprowadzanego genu [65].

Zdaniem grupy Weinberga [65] oraz Lurii i Horowitza [82] podczas transformacji nowotworowej ma miejsce współdziałanie pomiędzy dwoma grupami onkogenów. Do pierwszej grupy należą geny wirusów polyoma i SV40, kodujące tzw. duży antygen T, gen adenowirusa, którego produktem jest antygen E1A oraz onkogeny v-myc i c-myc. Białka produkowane przez onkogeny grupy I wykrywane są w jądrach ko-

mórkowych i pełnią rolę aktywatorów transkrypcji onkogenów grupy II, których produktami są białka cytoplazmatyczne takie jak tzw. średni antygen T (middle-T antigen) wirusa polyoma oraz białko p21, kodowane przez onkogeny z rodziny ras.

V-2. Własności transformujące wysokocząsteczkowego DNA nowotworowego

Wprowadzanie wysokocząsteczkowych preparatów DNA nowotworowego daje możliwość wykrywania w klonach transformowanych komórek sekwencji odpowiedzialnych za przemiany nowotworowe. Identyfikację genów transformujących przeprowadza się poprzez selekcję klonowanych fragmentów DNA otrzymanego z transformantów. Klony powodujące transformację komórek NIH 3T3 w testach transfekcyjnych zawierają onkogeny odpowiedzialne za transformujące własności nowotworowego DNA.

Zdaniem Chorażego i Szali [10] wyniki prowadzonych wcześniej doświadczeń, w których uzyskano transformację komórek NIH 3T3 wprowadzając do nich DNA wyizolowany z komórek normalnych oraz niska wydajność transformacji obserwowana po podaniu niektórych preparatów DNA nowotworowego dowodzą, że zjawiska związane z transformacją nowotworową na modelu komórek NIH 3T3 są mało uniwersalne. Jednakże należy zauważyć, że DNA nowotworowy różni się od DNA z komórek normalnych obecnością genów transformujących. Własności transformujące DNA nienowotworowego [92] wprowadzanego do komórek mogą być spowodowane samą procedurą transfekcji. W efekcie może dojść bowiem do rekombinacji pomiędzy wprowadzonym materiałem genetycznym, a DNA komórek-biorców prowadzącej do uaktywnienia komórkowych genów transformujących.

Zgodnie z koncepcją Coopera i in. [93] własności transformujące DNA nienowotworowego wzrastają jednak dopiero w drugim cyklu transfekcji (gdy używamy DNA z komórek transformowanych wcześniej DNA nienowotworowym), a więc różnice w częstotliwości transformacji *in vitro* przy użyciu DNA z komórek normalnych i nowotworowych powinny być stwierdzalne w testach transfekcyjnych. Jeżeli tak nie jest i obserwowana jest wysoka transformacja komórek zarówno po podaniu nowotworowego jak i nienowotworowego DNA, oznacza to, że użyto niewłaściwej, spontanicznie transformującej linii komórkowej lub komórki były zbyt wiele razy pasażowane przed transfekcją. Jeżeli natomiast komórki nie ulegają transformacji lub transformują z bardzo małą częstotliwością przyjmuje się, że jest to wynikiem niskich własności transformujących badanego preparatu DNA nowotworowego. Może to być jednak związane również z małą podatnością komórek do przyjęcia egzogennego DNA. W celu uniknięcia dwuznaczności wyników wysokocząsteczkowe preparaty DNA wprowadza się z markerami selektywnymi, a transformację ocenia się w klo-

nach opornych komórek, o których wiadomo, że wbudowały egzogeny materiał genetyczny. Niestety nie wszystkie pracownie przestrzegają takiego protokołu transfekcji, co w rezultacie stwarza trudności w porównywaniu własności transformujących nowotworowego DNA stwierdzanych w różnych laboratoriach [94—98].

Thorgeirsson i wsp. [99] otrzymali stransformowane nowotworowo komórki NIH 3T3 w wyniku transfekcji przy użyciu DNA z ludzkich komórek ostrej białaczki limfatycznej i szpikowej oraz z komórek raka pęcherza. W klonach komórek transformowanych przy użyciu DNA z ostrej białaczki szpikowej, stwierdzono podwyższoną aktywność onkogenu N-ras, związaną z mutacją w kodonie 13 [86]. Zwiększoną ilość transkryptów ras znaleziono również w fibroblastach NIH 3T3 poddanych transfekcji przy użyciu DNA z komórek osteosarcoma [100].

Srivastava i wsp. [101] zastosowali transfekcję wysokocząsteczkowym DNA do badań heterogenności białka p21 (produkt ras). Komórki NIH 3T3 transformowano DNA izolowanym z linii komórkowych T24 i HS578T, zawierających c-Ha-ras z mutacją kodonu 12 (Gly- \rightarrow Val) i (Gly- \rightarrow Asp) oraz z linii Hs242, SW1271 i JPT26 z aktywowanym N-ras lub Ha-ras w pozycji 61 (Glu- \rightarrow Leu) lub (Glu- \rightarrow Arg). Stwierdzono, że istnieją różnice w elektroforetycznych obrazach prążków białka p21, otrzymanego z komórek transformowanych przy użyciu DNA, zawierającego ras z mutacją kodonu 12 oraz ras z mutacją kodonu 61.

Ostatnio wykazano, że transformanty otrzymane w wyniku transfekcji fibroblastów NIH 3T3 przy użyciu DNA wyizolowanego z wątrobiaka szczura wykazują wysoką aktywność genu c-raf [102].

Natomiast Bos i wsp. [103] badając własności transformujące DNA z różnych nowotworów człowieka udowodnili, że istnieje możliwość wykrycia „aktywnych” sekwencji onkogennych, nawet w preparatach DNA o niskiej zdolności do transformacji. Użyto DNA z raka żołądka, który w hodowli komórek NIH 3T3 indukował powstanie 2 ognisk na 100 μ g wprowadzonego DNA (100-krotnie mniej niż DNA z komórek EJ raka pęcherza, zawierających „aktywny” Ha-ras) oraz DNA z komórek raka pęcherza (*in vivo*), który indukował 15 ognisk na 100 μ g DNA. Otrzymane klony transformantów namnożono i wyizolowano z nich DNA, który użyto do drugiej transfekcji. Uzyskano w ten sposób wzmocnienie aktywacji genów transformujących, obecnych w DNA nowotworowym, co pozwoliło stwierdzić, że w komórkach raka żołądka istnieje podwyższona ekspresja genu Ki-ras, a w komórkach raka pęcherza genu N-ras.

V-3. Geny fuzyjne

Większość genów transformujących identyfikowanych przy pomocy testów transfekcyjnych okazała się homologiczna z onkogenami rodziny ras. Niektóre z wykrywanych sekwencji różnią się jednak od znanych już

onkogenów. Należą do nich geny met [104], mel [105], dbl [61] oraz oncD [24]. W laboratorium Barbacida [24] zidentyfikowano cztery różne geny transformacyjne występujące w komórkach raka okrężnicy, nazwane onc A, B, C i D. Onkogeny onc A, B i C były homologiczne odpowiednio z transformującymi allelami Ha-ras-1, Ki-ras-2 i N-ras, natomiast onc D różnił się od znanych sekwencji onkogennych. Transformujący klon DNA (20 kpz) zawierający onc D wyizolowano z komórek NIH 3T3 w trzecim cyklu transfekcji i poddano subklonowaniu. Otrzymane fragmenty DNA użyto jako sondy genowe do identyfikacji transkryptów onc D w transformantach NIH 3T3. Dwa z tych subklonów, pDM6 (1.4 kpz) i pDM8 (2.7 kpz) wykrywały mRNA o długości 2.5 kpz, który stwierdzany był również w normalnych komórkach NIH 3T3 oraz transformowanych genem ras. Występowanie związanego z onc D RNA w nietransformowanych komórkach NIH 3T3 sugerowało, że w skład badanego onkogenu wchodzi sekwencje transkrybowane w normalnych komórkach mysich. Przeprowadzono sekwencjonowanie pDM6 i pDM8, stwierdzając wysoką ich homologię z klonem hTMNM-1 ludzkiego pseudogenu tropomiozyny nie-mięśniowej. Następnie ustalono sekwencję nukleotydową całego genu onc D, który składa się z 2301 pz, a w tym z 1923 pz produkujących peptyd złożony z 641 aminokwasów. Fragment kodujący poprzedzony jest na końcu 5' sekwencjami nie ulegającymi translacji o długości 232 pz, a na końcu 3' sekwencjami niekodującymi (143 pz). Sekwencje nieulegające translacji mają charakter bogatych w G i A fragmentów powtarzalnych. W obszarze od pozycji -63 do +664 znajdują się sekwencje homologiczne z pierwszymi 7 eksonami genu tropomiozyny, który podczas rearanżacji genetycznej uległ przedzieleniu między 7 i 8 eksonem. W tym też miejscu nastąpiło przyłączenie sekwencji, które pomiędzy pozycją +1015 i +1773 wykazują homologię z retrowirusowymi onkogenami kodującymi białka receptorowe związane z aktywnością kinazy tyrozynowej (v-abl, v-erbB, v-fes/fps, v-fgr, v-fms, v-ros, v-src, v-yes). Tak więc onc D jest genem fuzyjnym powstałym w wyniku przegrupowania strukturalnego, które spowodowało jego aktywność transformacyjną. Martin-Zanca i w s.p. [24] proponują dla genu onc D nazwę trk (tropomiozyna, receptor, kinaza).

Innym przykładem aktywacji onkogenów komórkowych przez rearanżację genetyczną jest omawiane już przeniesienie myc do loci immunoglobulinowych występujące w komórkach BL (Burkitt lymphoma) i MPC (mouse plasmacytoma) oraz przemieszczenie c-abl z chromosomu 9 do 22, charakterystyczne dla komórek CML (chronic myelogenous leukemia) posiadających tzw. chromosom Philadelphia [15, 16]. Zmiana loci c-abl, jak się okazało powoduje zmiany w wielkości i własnościach produktu białkowego genu [16]. Obok normalnego peptydu (145 kDa) produkowane jest białko fuzyjne, 210 kDa kodowane przez przemieszczony c-abl oraz fragment 3' sekwencji bcr występujących w chromosomie 22. Poprzez pod-

wyższą aktywność kinazy tyrozynowej białko to upodabnia się do produktu transformacyjnego genu v-abl [16].

VI. Uwagi końcowe

Badania transformacji nowotworowej w warunkach *in vitro*, z zastosowaniem testów transfekcyjnych umożliwiły i nadal umożliwiają identyfikację genów transformujących. Przy pomocy metody transfekcji dokonuje się oceny transformujących własności genów oraz preparatów DNA pochodzących z komórek nowotworowych, przy czym wykazano, że w pewnych warunkach sam proces transfekcji może być przyczyną powstania „aktywnych” sekwencji onkogennych.

Procesy warunkujące aktywację komórkowych onkogenów związane są z przegrupowaniem strukturalnym prowadzącym do powstania genów fuzyjnych lub połączenia genu transformującego z sekwencją typu „enhancer” lub „promotor”.

Obserwowane zjawiska pozwalają wyjaśnić charakter zmian w komórkowych systemach kontroli oraz zakres powiązań między komórkowymi genami transformującymi występujący w spontanicznie rozwijających się nowotworach.

Artykuł napisano w ramach prac finansowanych z CPBR 3.13.3.

Artykuł otrzymano 19 maja 1987

Zaakceptowano do druku 28 maja 1987

PIŚMIENNICTWO

1. Klobutcher R. A., Ruddle F. H., (1981), *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 533—554.
2. Mulligan R. C., Howard E. H., Berg P. (1979), *Nature*, **227**, 108—114.
3. Tabin C. J., Hoffmann J. W., Goff S. P., Weinberg R. A. (1982), *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 426—436.
4. Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H. (1982), *Science*, **215**, 166—168.
5. Graessmann A., Graessmann M., Mueller C. (1980), *Methods Enzymol.*, **65**, 816—825.
6. Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H. (1982), *EMBO J.*, **1**, 841—845.
7. Rassoulzadegan M., Binetruy, B., Cuzin F. (1982), *Nature*, **295**, 257—259.
8. Cullen B. R., Skalka A. M., Ju G. (1983), *Prac. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2946—2950.
9. Graham F. L., Van der Eb A. J. (1973), *Virology*, **52**, 456—467.
10. Chorąży M., Szala S. (1983), *Post. Biochem.*, **29**, 261—298.
11. Weinberg R. A. (1983), *Sci. Amer.*, **249**, 3—11.
12. Deusberg P. H. (1983), *Nature*, **304**, 219—226.
13. Bishop J. M. (1983), *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 301—354.
14. Klein G., Klein E. (1984), *Carcinogenesis*, **5**, 429—435.

15. Klein G., Klein E. (1985), *Nature*, **315**, 190—195.
16. Klein G., Klein E. (1986), *Cancer Res.*, **46**, 3211—3224.
17. Knudson A. G. Jr. (1985), *Cancer Res.*, **45**, 1437—1443.
18. Ratner L., Josephs S. F., Wong-Staal F. (1985), *Ann. Rev. Microbiol.*, **39**, 419—449.
19. Sefton B. M. (1985), *Trends in Genetics*, **1**, 306—308.
20. Nusse R. (1986), *Trends in Genetics*, **2**, 244—247.
21. Heldin C. H., Betsholtz C., Johnsson A., Nister M., Ek B., Ronnstrand L., Wasteson A., Westermark B. (1985), *J. Cell Sci. Suppl.*, **3**, 65—76.
22. Stiles C. D. (1985), *Cancer Res.*, **45**, 5215—5218.
23. Hayward W. G., Neel B. E., Astrin S. M. (1981), *Nature*, **290**, 475—480.
24. Martin-Zanca D., Hughes S. H., Barbacid M. (1986), *Nature*, **319**, 743—748.
25. Cleveland J. L., Jansen H. W., Bister K., Fredrickson T. N., Morse M. C., Ihle J. N., Rapp U. R. (1986), *J. Cellul. Biochem.*, **30**, 195—218.
26. Nusse R., Varmus H. E. (1982), *Cell*, **31**, 99—109.
27. Peters G., Brookes S., Smith R., Dickson C. (1983), *Cell*, **33**, 369—377.
28. Rijsewijk F. A. M., van Lohuizen M., van Ooyen A., Nusse R. (1986), *Nucl. Acids Res.*, **14**, 693—702.
29. Marth J. D., Peet R., Krebs E. G., Perlmutter R. M. (1985), *Cell*, **43**, 393—404.
30. Voronova A. F., Sefton B. M. (1986), *Nature*, **319**, 682—685.
31. Jenkins J. R., Rudge K., Chumakov P., Currie G. A. (1985), *Nature*, **317**, 816—817.
32. Parada L. F., Land H., Weinberg R. A., Wolf D., Rotter V. (1984), *Nature*, **312**, 649—651.
33. Cochran B. H., Reffel A. C., Stiles C. D. (1983), *Cell*, **33**, 939—947.
34. Akiyama T., Kadooka T., Ogawara H., Sakakibara S. (1986), *Arch. Biochem. Biophys.*, **245**, 531—536.
35. Heimann B., Beimling P., Pfaff E., Schadler H., Moelling, K. (1985), *Exp. Cell Res.*, **1011**, 531—536.
36. Schatzman R. C., Evan G. J., Privalsky M. L., Bishop J. M. (1986), *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 1329—1333.
37. Hutner T., Cooper J. A. (1985), *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 897—930.
38. Foster D. A., Levy J. B., Daley D. Q., Simon M. C., Hanafusa H. (1986), *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 325—331.
39. Buss J. E., Kamps M. P., Gould K., Sefton B. M. (1986), *J. Virol.*, **58**, 468—474.
40. Bolen J. B., Rosen N., Israel M. A. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7275—7279.
41. Feldmann R. A., Tam J. P., Hanafusa H. (1986), *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 1065—1073.
42. Wigler M., Pellicor A., Silverstein S., Axel R. (1978), *Cell*, **14**, 725—731.
43. Pulciani S., Santos E., Laurer A. V., Long L. K., Robbins K. C., Barbacid M. (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2845—2851.
44. Loyer A., Scangos G., Juricek D., Keene D., Ruddle F. H. (1982), *Exp. Cell Res.*, **139**, 223—234.
45. Milman G., Herzenberg M. (1981), *Somatic Cell Genet.*, **7**, 161—170.
46. Kopchick J., Ju G., Skalka M., Stacey D. W. (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4383—4387.

47. Perucho M., Hanahan D., Wigler M. (1980), *Cell*, **22**, 309—317.
48. Sodroski J. G., Rosen C. A., Wong-Staal F., Salahuddin S. Z., Popovic M., Arya S., Gallo R. C., Haseltine W. A. (1985), *Science*, **227**, 171—173.
49. Cullen B. R., Katz R. A., Ju G. (1985), *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 1804—1807.
50. Morrison S. L. (1985), *Science*, **229**, 1202—1210.
51. Słomski R., Warren S. T., Hagen K., Cohen E. P. (1987), *Leukemia Res.*, w druku.
52. Austin P., Trowsdale J., Rudd C., Bodmer W., Feldman M., Lamb J. (1985), *Nature*, **313**, 61—64.
53. Chu G., Sharp P. A. (1981), *Gene*, **13**, 197—202.
54. Southern P. J., Berg P. (1982), *J. Molec. Appl. Genet.*, **1**, 327—341.
55. McCracken A. A., Fishman N. F. (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 508—511.
56. Emerman M., Temin H. M. (1986), *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 792—800.
57. Routh S., Song K. Y., Ayares D., Wallace L., Moore P. D., Kucheralapatti R. (1986), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **83**, 5587—5589.
58. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1984), w *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
59. Heyes J., Austin P., Bodmer J., Bodmer W., Modrigal A., Maz-zilli M. C., Trowsdale J. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3417—3421.
60. Land H., Parada L. F., Weinberg R. A. (1983), *Nature*, **304**, 596—302.
61. Eva A., Aaronson S. A. (1985), *Nature*, **316**, 273—275.
62. Kelekar A., Cole M. D. (1986), *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 7—15.
63. Yancopoulos D. G., Nisen P. D., Tesfaye A., Kohl N. E., Goldfarb M. P., Alt F. W. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5455—5459.
64. Connan G., Rassoulzadegan M., Cusin F. (1985), *Nature*, **314**, 277—282.
65. Land H., Chen A. C., Morgenstern J. P., Parada L. F., Weinberg R. A. (1986), *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 1917—1925.
66. Skalar M. D., Tereba A., Chen B. D-M., Walker W. S. (1985), *J. Cell. Physiol.*, **125**, 403—412.
67. Fasano O., Birnbaum D., Edlund L., Fogh J., Wigler M. (1984), *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1695—1705.
68. Takahashi M., Ritz J., Cooper G. M. (1985), *Cell*, **42**, 581—588.
69. Galibert F., Dupont de Dinechin S., Righi M., Stehelin D. (1984), *EMBO J.*, **3**, 1333—1338.
70. Martin P., Henry C., Denhez F., Amonyel P., Bechade C., Calothy G., Debuire B., Stehelin D., Saule S. (1986), *Virology*, **153**, 272—279.
71. Land H., Parada L. F., Weinberg R. A. (1983), *Cancer Cells*, **2**, 473—480.
72. Gubin G., Goldman D. S., Luce J., Neiman P. E., Cooper G. M. (1983), *Nature*, **302**, 114—119.
73. Diamond A., Cooper G. M., Ritz J., Lane M. A. (1983), *Nature*, **305**, 112—116.
74. Cooper G. M. (1982), *Science*, **217**, 801J806.
75. Der C. J., Krontins T. G., Cooper G. M. (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3637—3641.
76. Reddy E. P., Reynolds R. K., Santos E., Barbacid M. (1982), *Nature*, **300**, 149—153.
77. Taub R., Kirsch I., Morton C., Wendir G., Swan D., Tronick S., Aaronson S., Leder P. (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7837—7846.
78. Taparowsky E., Suard Y., Fasano O., Shimizu K., Goldfarb M., Wigler M. (1982), *Nature*, **300**, 762—765.
79. Smith M. R., DeGudicibus S. J., Stacey D. W. (1986), *Nature*, **320**, 540—543.

80. Canaani E., Dreazen O., Klar A., Rechavi G., Ram D., Cohen J. B., Givol D. (1983), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **80**, 7118—7122.
81. Kuff E. L., Feenstra A., Leuders K. K., Rechavi G., Givol D., Canaani E. (1983), *Nature*, **302**, 547—548.
82. Luria S., Horowitz M. (1986), *J. Virol.*, **57**, 998—1003.
83. Mathey-Prevot B., Baltimore D. (1985), *EMBO J.*, **4**, 1769—1774.
84. Prywes D., Foulkes J. G., Rosenberg N., Baltimore D. (1983), *Cell*, **34**, 569—579.
85. Sekiya T., Prassolov V. S., Fushimi M., Nishimura S. (1985), *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **76**, 851—855.
86. Veeneman G. H., Van der Eb A. J., van Boom J. H., Janssen J. W. G., Steenvoorden A. C. M. (1985), *Nature*, **315**, 726—730.
87. Cichutek K., Deusberg P. H. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2340—2344.
88. Jenkins J. R., Rudge K., Currie G. A. (1984), *Nature*, **312**, 651—653.
89. Jenkins J. R., Rudge K., Chumakov P., Currie G. A. (1985), *Nature*, **317**, 816—817.
90. Ruley H. E. (1983), *Nature*, **304**, 602—606.
91. Schwab M., Varmus H. E., Bishop J. M. (1985), *Nature*, **316**, 160—162.
92. Mareel M. M., Van Roy F. M. (1986), *Anticancer Res.*, **6**, 419—436.
93. Cooper G. M., Okenguist S., Silverman L. (1980), *Nature*, **284**, 418—421.
94. Perucho M., Goldfarb M., Shimizu K., Lama C., Fogh J., Wigler M. (1981), *Cell*, **27**, 467—476.
95. Marshall C. J., Hall A., Weiss R. A. (1982), *Nature*, **299**, 171—173.
96. Eva A., Tronick S. R., Gol R. A., Pierce J. H., Aaronson S. A. (1983), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **80**, 4926—4930.
97. Lane M. A., Sainten A., Cooper G. M. (1982), *Cell*, **28**, 873—880.
98. Fox R., Watanebe P. G. (1985), *Nature*, **315**, 516—518.
99. Thorgeirsson U. P., Turpeenniemi-Hujanen T., Williams J. E., Westin E. H., Heilman C. A., Talmadge J. E., Liotta L. A. (1985), *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 259—262.
100. Merregaert J., Michiels L., van der Rauwelaert E., Lommel M., Gol-Winkler R., Janowski M. (1986), *Leukemia Res.*, **10**, 915—921.
101. Srivastava S. K., Yuasa Y., Reynolds S. H., Aaronson S. A. (1985), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **82**, 38—42.
102. Ishikawa F., Takaku F., Hayashi K., Nagao M., Sugimura T. (1986), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **83**, 3209—3212.
103. Bos J. L., Verlaan-de Vries M., Marshall C. J., Veeneman G. H., van Boom J. H., van der Eb A. J. (1986), *Nucl. Acids Res.*, **14**, 1209—1219.
104. Cooper C. S., Park M., Blair D. G., Tainsky M. A., Huebner K., Croce C. M., Vande Woude G. F. (1984), *Nature*, **311**, 29—33.
105. Padua R. A., Barrass N., Currie G. A. (1984), *Nature*, **311**, 671—673.

RYSZARD SŁOMSKI*, EWA ZIĘTKIEWICZ**

Zastosowanie technik rekombinacji DNA w genetyce człowieka

DNA recombination techniques in human genetics

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Techniki rekombinacji DNA w diagnostyce i monitorowaniu chorób genetycznych
 - II-1. Wstępna molekularna charakterystyka choroby genetycznej
 - II-2. Wybór techniki diagnostycznej
- III. Perspektywy molekularnej terapii genowej
 - III-1. Wprowadzanie informacji genetycznej do komórek
 - III-1.1. Metody komórkowe
 - III-1.2. Transfekcja
 - III-1.3. Inne metody
 - III-2. Wektory wirusowe a terapia genowa
 - III-3. Wprowadzanie DNA do organizmów
- IV. Zastosowanie badań molekularnych w poradnictwie genetycznym
- V. Podsumowanie

Contents

- I. Introduction
- II. Recombination DNA techniques in diagnosis and screening of genetic diseases
 - II. 1. Preliminary molecular characteristic of a genetic diseases
 - II. 2. Choice of diagnostic techniques
- III. Perspective of gene therapy
 - III-1. Introduction of genetic information into cells
 - III-1.1. Cellular methods
 - III-1.2. Transfection
 - III-1.3. Other methods
 - III-2. Viral vectors and gene therapy
 - III-3. Introduction of DNA into living organisms
- IV. Application of molecular studies in genetic counseling
- V. Summation

Wykaz stosowanych skrótów: ADA — deaminaza adenozykowa, AIDS — nabyty brak odporności immunologicznej, BPV — wirus brodawczaka wołowego, CV — kosmki kosmówki (ang. chorionic villus), HPRT — fosforybozylotransferaza hipoksan-
tyny, RFLP — polimorfizm restrykcyjnych DNA (ang. restriction fragments length polymorphism).

* Doc. dr hab., ** Mgr, Zakład Genetyki Człowieka, PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

I. Wstęp

Identyfikacja molekularnych podstaw wielu wrodzonych wad metabolizmu, rozwój nowoczesnych technik diagnostyki prenatalnej, monitorowanie chorób genetycznych oraz poznanie wielu genetycznych czynników odpowiedzialnych za występowanie takich chorób, jak cukrzyca, miażdżyca, i wiele innych, przyczyniły się do wzrostu znaczenia genetyki medycznej w ostatnich 15 latach.

Dzięki znacznemu rozwojowi nowych molekularnych technik badawczych wyizolowano poprzez klonowanie kilkadziesiąt spośród około 100 000 genów, składających się na ludzki genom. Określono również sekwencje par zasad niektórych genów lub też wprowadzano geny do innych komórek celem poznania ich funkcji. W badaniach takich często korzysta się z nowych zdobyczy informatyki i technik obliczeniowych. Wymienione metody badawcze znalazły zastosowanie w diagnostyce chorób genetycznych.

W niniejszej pracy szczególną uwagę zwrócono na zastosowanie technik rekombinacji DNA w diagnostyce i monitorowaniu chorób genetycznych oraz na perspektywy zastosowania terapii genowej. Niektóre problemy etyczne i prawne, wywołane wprowadzeniem nowych technik genetycznych, są w pracy zaznaczone, jednak nie będą szczegółowo omawiane.

II. Technika rekombinacji DNA w diagnostyce i monitorowaniu chorób genetycznych

Zastosowanie biologii molekularnej w diagnostyce chorób genetycznych przyczyniło się do określenia występowania specyficznych mutacji punktowych oraz delecji genowych wywołujących określoną chorobę oraz zlokalizowania na chromosomach genów, odpowiedzialnych za występowanie chorób genetycznych.

II-1. Wstępna molekularna charakterystyka choroby genetycznej

Do niedawna diagnostyka genetycznie uwarunkowanych chorób metabolicznych opierała się między innymi na oznaczaniu biochemicznych defektów stanowiących podłoże danej choroby. Diagnostyka prenatalna była możliwa jedynie w przypadku, gdy ekspresja patologicznego genu występowała w fibroblastach płodowych. Umożliwiało to rozpoznanie zaledwie 20% ogólnej liczby chorób dziedziczących się według praw Mendla.

Dzięki wprowadzeniu enzymów restrykcyjnych i klonowania do badań hemoglobinopatii przeprowadzono po raz pierwszy diagnostykę defektów genetycznych na poziomie DNA. Wkrótce okazało się, że te metody mają

ogromne znaczenie dla całej genetyki człowieka, zwłaszcza dla diagnostyki prenatalnej chorób nie poddających się leczeniu.

Pierwszym etapem badań jest przygotowanie wysokocząsteczkowego genomowego DNA, który najczęściej uzyskuje się z około 10—40 ml krwi obwodowej, z wydajnością 10—40 $\mu\text{g/ml}$ krwi. Innym, teoretycznie nieograniczonym źródłem DNA są hodowle komórkowe fibroblastów skóry lub komórek limfoblastoidalnych krwi. Dla celów diagnostyki prenatalnej prowadzi się również hodowle komórek płynu owodniowego, uzyskiwanych drogą amniocentezy. W przypadku stosowania hodowli komórkowych niekorzystny dla celów diagnostyki jest stosunkowo długi okres czasu (kilka tygodni) niezbędny do uzyskania znacznej liczby komórek potrzebnej do wyizolowania odpowiedniej ilości DNA. Ostatnio udało się ten etap znacznie udoskonalić dzięki opracowaniu metody enzymatycznej amplifikacji określonych, kilkudziesięcionukleotyдовых sekwencji DNA. Metoda ta wymaga stosowania syntetycznych oligonukleotydów inicjujących syntezę komplementarnej nici DNA oraz fragmentu Klenowa polimerazy I DNA z *E.coli*. Dzięki tej metodzie można uzyskać niezbędną do celów diagnostycznych ilość DNA przy użyciu zaledwie 1 μg genomowego DNA pochodzącego na przykład z limfocytów krwi obwodowej pacjenta. Metodę amplifikacji genu zastosowano na przykład w diagnostyce anemii sierpowatej [1, 2].

Wybór odpowiedniej techniki badawczej w diagnostyce chorób genetycznych na poziomie DNA zależy od stopnia zaawansowania molekularnej charakterystyki tych chorób i jest uwarunkowany wieloma czynnikami, z których najważniejsze opisano poniżej (patrz też Tabela 1.).

1. Poznanie genu odpowiedzialnego za występowanie choroby genetycznej.

Wśród wielu ludzkich genów, poznane są na przykład geny beta-globiny oraz hydroksylazy fenyloalaninowej [3]. Wiadomo, że określone mutacje tych genów mogą spowodować powstanie zmienionych białek, co w konsekwencji prowadzi do wystąpienia anemii sierpowatej lub beta-talosemii (mutacja genu beta-globiny) lub fenyloketonurii (mutacja genu hydroksylazy fenyloalaninowej). Niestety w wielu genetycznie uwarunkowanych chorobach, na przykład w płasawicy Huntingtona, nie poznano dotąd genów ani ich produktów odpowiedzialnych za wystąpienie danej choroby.

2. Przygotowanie sondy molekularnej komplementarnej do określonego genu.

Podstawową techniką stosowaną w diagnostyce chorób genetycznie uwarunkowanych jest hybrydyzacja badanego DNA z radioaktywnymi sondami molekularnymi. Sondami molekularnymi mogą być naturalne geny zawierające oprócz sekwencji kodujących także sekwencje flankujące i wtrącone, wchodzące w skład danego genu.

Tabela 1

Analiza DNA stosowana w badaniach chorób genetycznych.

Lp.	Gen	Rodzaj zmiany	Sonda molekularna komplementarna do genu	Polimorfizm fragmentów restrykcyjnych DNA	Technika
1.	Znany	Znana mutacja pojedynczej pary zasad	Dostępna	Występowanie polimorfizmu nie jest konieczne	Hybrydyzacja z zastosowaniem syntetycznych sond
2.	Znany	Znana delecja	Dostępna	Występowanie polimorfizmu nie jest konieczne	Brak hybrydyzacji z sondą wykrywa delecje
3.	Znany	Znajomość defektu nie jest konieczna	Dostępna	Występuje	Występowanie polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych DNA po hybrydyzacji z sondą wskazuje na defekt
4.	Nieznany	Nieznany defekt	Dostępna	Występuje	
5.	Nieznany	Nieznany defekt	Brak sondy molekularnej komplementarnej do genu. Dostępna sonda molekularna zawierająca sekwencje sąsiadujące z genem.	Występuje	
6.	Nieznany	Nieznany defekt	Brak	Nie stwierdzono	Badanie sprzężeń genowych

Innym rodzajem sond molekularnych są syntetyczne geny zawierające wyłącznie sekwencje kodujące. Sondami zawierającymi same sekwencje kodujące są również sondy cDNA, syntetyzowane przy pomocy odwrotnej transkryptazy na matrycy mRNA. Pewnym ograniczeniem w stosowaniu sond cDNA jest ich skomplikowane przygotowanie, które obejmuje immunoprecypitacje polisomów syntetyzujących określone białko, izolacje polisomalnego mRNA oraz syntezę cDNA.

Jako sondy molekularne stosuje się również syntetyczne odcinki DNA (19-nukleotydowe oligomery) służące do wykrywania pojedynczych substytucji nukleotydowych w badanych sekwencjach. Analizę prowadzi się w tak dobranych warunkach, aby radioaktywna sonda hybrydyzowała wyłącznie z poszukiwaną komplementarną sekwencją [4]. W diagnostyce sondy takie stosuje się tylko w przypadku chorób wywołanych mutacją pojedynczej zasady w obrębie znanej sekwencji genu.

W przypadkach, kiedy molekularne podłoże choroby nie jest znane, natomiast znany jest region chromosomu, w którym występuje mutacja, sondę molekularną może stanowić odcinek chromosomu [5].

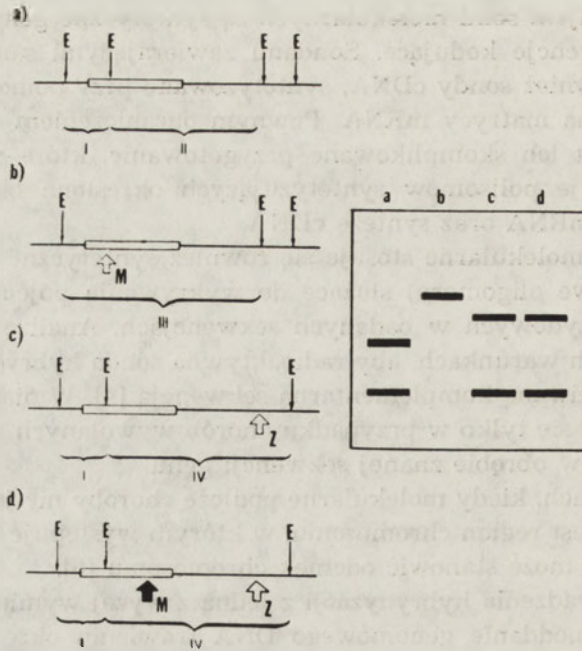
Do przeprowadzenia hybrydyzacji z jedną z wyżej wymienionych sond konieczne jest poddanie genomowego DNA trawieniu określonym enzymem restrykcyjnym. Powstałe fragmenty rozdziela się elektroforetycznie w żelu agarozowym i przenosi na filtr nitrocelulozowy metodą Southerna. DNA unieruchomiony na filtrze jest poddawany hybrydyzacji z radioaktywną sondą, znakowaną najczęściej za pomocą ^{32}P -ATP (gamma) i kinazy polinukleotydowej lub ^{32}P -NTP (alfa) i polimerazy z *E. coli* przy użyciu metody „nick” translacji. Odcinki, które uległy hybrydyzacji, uwidocznia się metodą autoradiografii.

Obecnie uzyskano już sondy molekularne komplementarne do wielu ludzkich genów lub ich fragmentów [3, 6] np. genów beta-globiny, hydroksylazy fenyloalaninowej i alfa,-antytrypsyny.

3. Polimorfizm fragmentów restrykcyjnych DNA (RFLP).

Mutacja pojedynczej pary zasad może spowodować zanik istniejącego lub powstanie nowego miejsca rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny, czego wynikiem jest polimorfizm fragmentów restrykcyjnych (ang. restriction fragment length polymorphism — RFLP) uzyskanych przy zastosowaniu tego enzymu. Jeżeli mutacja genu jest jednocześnie mutacją zmieniającą miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny, to zmutowany gen jest wykrywany we fragmentach DNA o długości innej niż długość fragmentów, w których występuje niezmutowany gen (Ryc. 1a, b).

Częstotliwość mutacji jest zwykle większa w sekwencjach niekodujących niż w kodujących. Stąd RFLP najczęściej nie jest spowodowany mutacją w obrębie genu, ale jest wynikiem naturalnej zmienności par zasad DNA poza genem. W związku z tym występowanie genu we fragmentach restrykcyjnych o różnej długości nie zawsze jest związane z mutacją tego



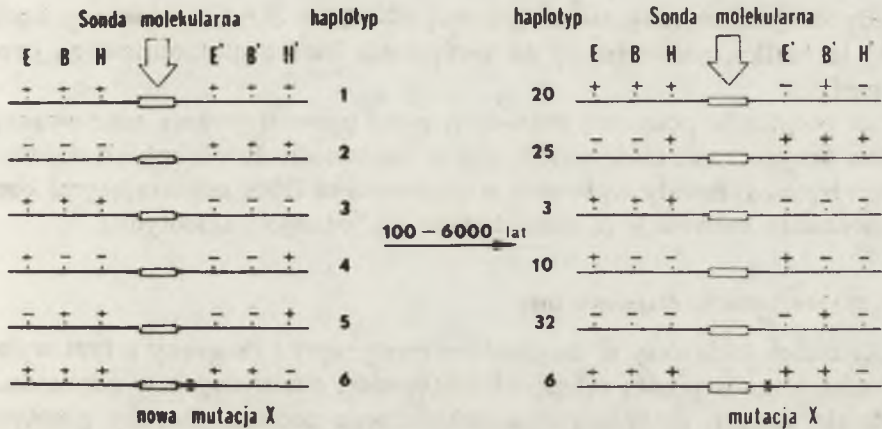
Ryc. 1. Mechanizm powstawania polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych DNA. Lewa strona ryciny: a) prawidłowy gen i otaczające go sekwencje DNA; b) mutacja w obrębie genu wyłączająca miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny; c) naturalna zmienność par zasad DNA poza genem, wyłączająca miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny; d) naturalna zmienność par zasad DNA poza genem, wyłączająca; miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny, sprzężona z mutacją w obrębie genu.

Prawa strona ryciny: schematyczne przedstawienie autoradiogramów uzyskanych w wyniku hybrydyzacji DNA, trawionego endonukleazą E, z radioaktywną sondą molekularną komplementarną do badanego genu.

cienka strzałka — miejsce rozpoznawane przez endonukleazę E; szeroka strzałka — mutacja powodująca wyłączenie miejsca rozpoznawanego przez endonukleazę E; szeroka strzałka zaciemniona — mutacja nie powodująca wyłączenia miejsca rozpoznawanego przez endonukleazę E; Z — mutacja poza genem wynikająca z naturalnej zmienności zasad w DNA; M — mutacja w obrębie genu, prowadząca do choroby; I, II, III, IV — schematyczne oznaczenie wielkość fragmentów DNA hybrydujących z sondą.

genu (Ryc. 1a, c). Z drugiej strony, mutacja w obrębie genu nie dotycząca miejsc rozpoznawanych przez enzym restrykcyjny nie wpływa na zmianę wielkości fragmentów, w których jest odnajdywany dany gen (Ryc. 1c, d).

Dopiero analiza fragmentów restrykcyjnych DNA uzyskanych przy użyciu różnych enzymów pozwala na ustalenie sprzężenia zmutowanego odcinka DNA z określonym układem (haplotypem) miejsc restrykcyjnych i wykrycie mutacji. Zasadę tego rodzaju badań obrazuje Ryc. 2. W przedstawionym abstrakcyjnym przykładzie wśród mieszkańców pewnego obszaru geograficznego występuje sześć (spośród 36 możliwych) haplotypów — kombinacji obecności lub braku miejsc rozpoznawanych przez trzy



Ryc. 2. Przykład zastosowania analizy polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych DNA w diagnostyce medycznej.

Sonda molekularna hybryduje z odcinkiem DNA zaznaczonym na rycinie. E, B, H i E', B', H' oznaczają miejsca rozpoznawane przez endonukleazy EcoRI, BamHI, HindIII po stronie 5' i 3' od miejsca hybrydyzacji sondy. Znaki + i - oznaczają odpowiednio występowanie lub niewystępowanie miejsca restrykcji.

Lewa część ryciny — przykładowe haplotypy miejsc restrykcyjnych (z 36 możliwych); Prawa część ryciny — zmiana haplotypów po upływie kilku stuleci X — hipotetyczna mutacja związana z haplotypem 6.

enzymy restrykcyjne: EcoRI, BamHI i HindIII (lewa strona ryciny). U osoby z haplotypem 6 występuje mutacja X. Po kilkuset latach (prawa strona ryciny), w wyniku migracji ludności i działania czynników środowiskowych, w populacji tej występują również inne haplotypy miejsc restrykcyjnych, lecz mutacja X u przeważającej większości badanych osób pozostaje nadal sprzężona z haplotypem 6. Określenie sprzężenia haplotypu 6 z chorobą spowodowaną mutacją X nie wymaga znajomości sekwencji par zasad zmutowanego odcinka DNA.

4. Poznanie sekwencji genu i specyficznej mutacji pojedynczej pary zasad.

Poznanie sekwencji par zasad w prawidłowym oraz zmutowanym genie pozwala na stosowanie w diagnostyce syntetycznych sond molekularnych komplementarnych do genu prawidłowego lub zmutowanego. Wiadomo na przykład, że sekwencja par zasad w pobliżu końca 5' prawidłowego genu beta-globiny składa się z: CTCCTGAAG, w anemii sierpowatej, w wyniku pojedynczej substytucji (A→T) sekwencja ta składa się z: CTCCTGTGG, przez co w nieprawidłowej cząsteczce beta-globiny zamiast kwasu glutaminowego występuje walina [4, 7]. Jedna z form beta-talazemii jest z kolei spowodowana zmianą jednego nukleotydu (G→A) w obrębie pierwszego intronu w genie beta-globiny, przez co powstający pre-mRNA jest niestabilny *in vivo* [8, 9]. Jeden z wariantów niedoboru aktywności alfa₁-antytropsyny (inhibitora proteaz syntetyzowanego w wątrobie) jest wynikiem

pojedynczej substytucji nukleotydu (G→A) w obrębie sekwencji kodującej to białko, prowadzącej do zastąpienia kwasu glutaminowego przez lizynę [10].

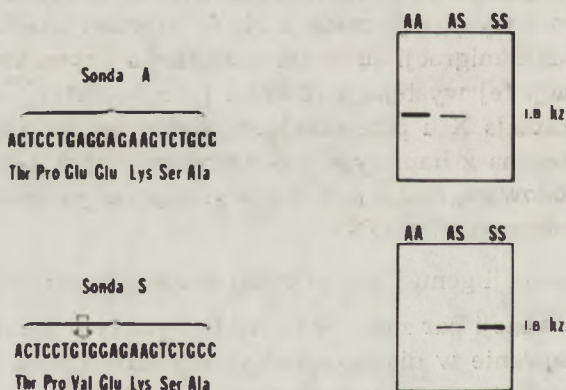
Na podstawie poznanej sekwencji genu prawidłowego i zmutowanego można przygotować takie sondy, aby w odpowiednich warunkach doświadczenia hybrydowały wyłącznie z fragmentami DNA zawierającymi komplementarne sekwencje (z dokładnością do jednego nukleotydu).

II-2. Wybór techniki diagnostycznej

Kierunek badawczy w diagnostyce medycznej i związany z tym wybór techniki diagnostycznej zależą od dostępności omówionych w poprzednim rozdziale danych dotyczących molekularnego podłoża choroby genetycznej (Tab. 1). Poniżej przedstawiono czynniki wpływające na wybór techniki diagnostycznej.

1. Znany gen, znana mutacja punktowa, dostępna syntetyczna sonda molekularna.

Stosowana w tych przypadkach metoda polega na hybrydyzacji badanego DNA z syntetycznymi sondami oligonukleotydowymi. W diagnostyce anemii sierpowatej wykorzystuje się syntetyczne oligonukleotydy (nonadekamery) komplementarne do końca 5' genów beta^A-globiny (sonda A) i beta^S-globiny (sonda S). Sonda A tworzy trwale hybrydy z DNA prawi-



Ryc. 3. Zastosowanie syntetycznych oligonukleotydów komplementarnych do beta^A — i beta^S-DNA w diagnostyce anemii sierpowatej.

Lewa część ryciny — sekwencje syntetycznych oligonukleotydów komplementarnych do odcinka genu beta^A-globiny (sonda A) i do odcinka genu beta^S-globiny (sonda S) oraz odpowiadające im sekwencje aminokwasów. Strzałka oznacza substytucję A→T powodującą zamianę kodonu glutaminowego na walinowy.

Prawa część ryciny — schematyczne przedstawienie autoradiogramów uzyskanych po hybrydyzacji radioaktywnej sondy A (górny schemat) i sondy S (dolny schemat) z elektroforetycznie rozdzielonym DNA trawionym endonukleazą. DNA — uzyskany od osób zdrowych — homozygot beta^S-globiny (AA), od nosicieli — heterozygot beta^A- i beta^S-globiny (AS) i od osób chorych — homozygot beta^S-globiny (SS).

dłowych (zdrowych) homozygot, a sonda S — z DNA homozygot recesywnych (chorych), obie sondy tworzą nieco mniej trwałe hybrydy z DNA heterozygot [4] (Ryc. 3.). Ta technika badawcza jest bardzo korzystna, ponieważ diagnostyka może być przeprowadzona bez badań rodzinnych, a ponadto nie jest konieczne badanie RFLP. Technikę tę zastosowano również w prenatalnej diagnostyce hemoglobiny C [7], w niektórych przypadkach talasemii [8, 9], niedoboru aktywności alfa₁antytrypsyny [9] i innych chorobach.

2. Znany gen, znany defekt w postaci delecji, dostępna sonda molekularna.

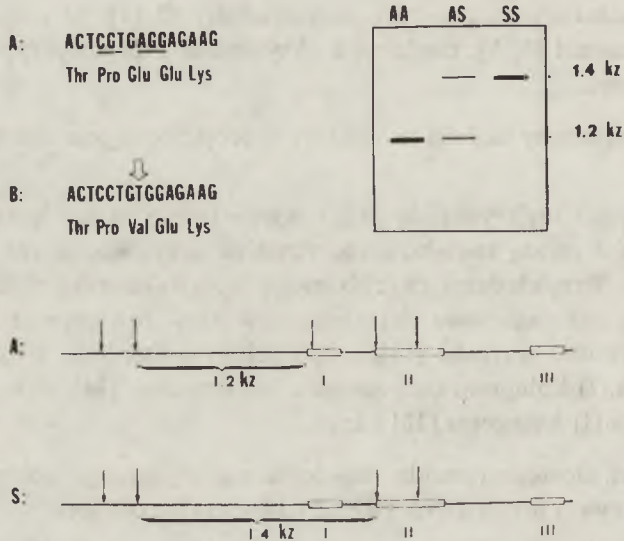
Delecję genu wykrywa się przez stwierdzenie braku hybrydyzacji badanego DNA z sondą molekularną. Analiza przypadków nie wymaga badania RFLP. Przykładami chorób mogą być: talasemie charakteryzujące się całkowitą lub częściową delecją genów alfa- lub beta-globiny [11, 12], niedobór hormonu wzrostu [13], zespół Ehlersa-Danlosa — częściowa delecja genu alfa₁(I) kolagenu osteogenesis imperfecta- [14], delecje w obrębie genu pro-alfa₁(I) kolagenu [15] i inne.

3. Znany gen, dostępna sonda molekularna, występuje polimorfizm fragmentów restrykcyjnych DNA (RFLP) zawierających gen.

Analiza polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych DNA w diagnostyce chorób dziedziczonych recesywnie polega na trawieniu genomowego DNA osób chorych (homozygot recesywnych — zmutowanych), zdrowych (homozygot dominujących — normalnych) i nosicieli (heterozygot) różnymi enzymami restrykcyjnymi i hybrydyzacji uzyskanych fragmentów z odpowiednią sondą (np. cDNA). Do badań diagnostycznych wybiera się enzymy, które powodują powstanie hybrydujących z sondą fragmentów o wielkości różnej dla DNA homozygot normalnych i recesywnych, dla heterozygot uzyskuje się hybrydyzację fragmentów obu typów.

Polimorfizm fragmentów restrykcyjnych został po raz pierwszy opisany i zastosowany w prenatalnej diagnostyce anemii sierpowatej przez Kana i Dozy'ego [16]. W badaniach tych genomowy DNA osób zdrowych i chorych poddano trawieniu enzymem HpaI, elektroforezie i hybrydyzacji z sondą (fragmentem beta-globiny). U osób zdrowych gen beta-globiny występował we fragmencie o wielkości 7,6 lub 7,0 tys. par zasad (zależnie od populacji), u osób chorych w 87% gen wykrywano we fragmencie o wielkości 13 tys. par zasad. Obecnie w diagnostyce anemii sierpowatej stosuje się hybrydyzację DNA trawionego enzymami MstII lub Ddel z fragmentem AluI końca 5' genu beta-globiny [17—20]. W związku z tym, że mutacja w genie beta-globiny powoduje wyłączenie miejsc rozpoznawanych przez MstII i Ddel, sonda hybryduje z fragmentami o różnej długości w przypadku homozygot prawidłowej i zmutowanej, a w przypadku heterozygot — z obydwojema fragmentami (Ryc. 4).

Analizę RFLP zastosowano również do identyfikacji wielu haplotypów miejsc cięcia enzymów restrykcyjnych wokół genu beta-globiny u osób z beta-talazemią [20—23]. K a z a z i a n i w s p. [21] wykazali, że w 86% przypadków określony haplotyp jest sprzężony z identyczną mutacją.



Ryc. 4. Analiza polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych DNA wywołanego zmianą miejsca rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny MstII — wykorzystanie w diagnostyce anemii sierpowatej.

Lewa część ryciny — sekwencje nukleotydów końca 5' genu beta^A- i beta^S-globiny (od kodonu 4 do 8). W genie beta^A-globiny podkreślono sekwencje rozpoznawane przez enzym MstII (CCTNAGG, N = G)

Poniżej — schematyczne rozmieszczenie miejsc rozpoznawanych przez enzym MstII (strzałki) w odcinku DNA zawierającym geny beta-globiny (typu A lub S). Sekwencje kodujące oznaczono cyframi rzymskimi (od końca 5': I, II, III).

Prawa część ryciny — schematyczne przedstawienie autoradiogramów uzyskanych po hybrydyzacji radioaktywnej sondy molekularnej z elektroforetycznie rozdzielonym DNA trawionym endonukleazą MstII. Sonda — naturalna lub syntetyczna, komplementarna do końca 5' genu beta-globiny. DNA — uzyskany od osób zdrowych — homozygot beta^A-globiny (AA), od nosicieli anemii sierpowatej — heterozygot beta^A- i beta^S-globiny (AS) i od osób chorych — homozygot beta^S-globiny (SS).

Analiza RFLP jest najbardziej przydatna, gdy określony układ miejsc restrykcyjnych jest sprzężony z występowaniem znanej mutacji, ale może być przeprowadzana także wtedy, gdy mutacja nie jest poznana, np. celem oznaczania głównych antygenów zgodności tkankowej [24—27] lub w diagnostyce fenylketonurii [28, 29].

4. Nieznany gen, dostępna sonda molekularna, występuje polimorfizm fragmentów restrykcyjnych DNA zawierających fragment DNA hybrydujący z sondą.

Przy użyciu sondy molekularnej komplementarnej do określonego miejsca w genomie można badać, czy mutacja w obrębie sekwencji hybrydującej z tą sondą jest sprzężona z daną chorobą. W tego rodzaju badaniach konieczna jest analiza polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych DNA dużej liczby osób chorych i zdrowych oraz zastosowanie wielu różnych enzymów restrykcyjnych. Znaczące odchylenie częstości występowania określonego układu miejsc restrykcyjnych (haplotypu) u osób chorych w porównaniu ze zdrowymi wskazuje na sprzężenie choroby z mutacją w regionie wykrywanym przez stosowaną sondę molekularną. Przy użyciu tej metody badano m.in. sprzężenia polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych w regionie HLA z myastenią gravis [30], celiakią [30, 31], cukrzycą insulino-zależną [32] i reumatoidalnym zapaleniem stawów [33].

5. Nieznany gen, brak sondy molekularnej samego genu, występuje polimorfizm fragmentów restrykcyjnych DNA.

Występowanie RFLP, związane z mutacją powodującą określoną chorobę, może być wykorzystane w diagnostyce tej choroby nawet wtedy, gdy nie dysponujemy sondą molekularną komplementarną do genu wywołującego tę chorobę. Sondami mogą być w takim przypadku na przykład sklonowane fragmenty ludzkiego chromosomu, sondy te wiążą się z sekwencjami sąsiadującymi z genem. Obecnie diagnozuje się w ten sposób choroby genetyczne sprzężone z chromosomem X, jak niedorozwój umysłowy związany z łamliwym chromosomem X [34], dystrofia mięśniowa Beckera i Duchenne'a [35, 36]. Gusella i współpracownicy [37, 38] wykazali ostatnio RFLP związany z występowaniem płasawicy Huntingtona.

6. Nieznany gen, brak sondy molekularnej, nie stwierdzono RFLP.

Taką sytuację mamy w przypadku większości chorób genetycznych. W tych przypadkach wykonuje się badania mające na celu ustalenie sprzężeń pomiędzy znanym RFLP (lub innymi markerami) a określoną chorobą genetyczną. Po ustaleniu takich sprzężeń można stosować metody opisane w punktach 4 i 5.

III Perspektywy molekularnej terapii genowej.

Dzięki poznaniu wielu genów odpowiedzialnych za choroby genetyczne rozważa się obecnie coraz częściej [39, 40] możliwości terapii poprzez wprowadzanie do komórek odpowiednich prawidłowych genów. Uplynie jednak jeszcze sporo czasu, zanim będzie możliwe przeprowadzenie pierwszych prób terapii genowej u ludzi [41]. Ciągłe jeszcze wiele trudności sprawia wprowadzanie materiału genetycznego do komórek ssaków, przy czym najważniejszym problemem do rozwiązania jest sprawa regulacji i ekspresji obcego genu w komórce. Istotny wpływ na rozwój nowych

technologii mają też czynniki socjalne, prawne i etyczne, których nie można pominąć [42].

W niniejszej pracy ograniczono się wyłącznie do omówienia stosowania technik rekombinacji DNA w ewentualnym leczeniu chorób genetycznych.

III-1. Wprowadzanie informacji genetycznej do komórek

Biologia molekularna dysponuje obecnie kilkoma metodami wprowadzania informacji genetycznej do komórek, jednak każda z nich obok dodatnich ma również ujemne strony (Tab. 2).

Tabela 2

Metody wprowadzania informacji genetycznej do komórek.

Metody komórkowe
<ol style="list-style-type: none"> 1. Fuzja komórek 2. Fuzja mikrokomórek 3. Fuzja komórek po naświetleniu promieniowaniem X 4. Wprowadzenie do komórek fragmentów chromosomów
Transfekcja
<ol style="list-style-type: none"> 1. Precypitacja DNA fosforanem wapnia 2. Zastosowanie wektorów plazmidowych 3. Kontransfekcja (plazmid z markerem selekcyjnym i wysokocząsteczkowy DNA) 4. Transfekcja przy zastosowaniu szoku elektrycznego (elektroporacja)
Inne metody
<ol style="list-style-type: none"> 1. Mikroiniekcja 2. Fuzja protoplastów 3. Zastosowanie liposomów 4. Zastosowanie cieniów erytrocytów 5. Zastosowanie wektorów: wirusów DNA i retrowirusów

III-1.1. Metody komórkowe.

Obecność wirusów lub związków reagujących z błoną komórkową umożliwia w hodowli *in vitro* łączenie (fuzje) dwóch różnych komórek i ich genomów [43, 44]. Proces ten cechuje się niską częstością i wydajnością. Selekcje hybrydów przeprowadza się najczęściej w hodowli *in vitro*, przy czym wskazane jest, aby co najmniej jedna grupa komórek rodzicielskich posiadała marker selekcyjny. Hybrydy komórek somatycznych na ogół mają bardzo zróżnicowany genotyp i stąd są przydatne w mapowaniu ludzkiego genomu. Metoda ta jest mniej przydatna w sytuacjach, w których chcemy uzyskać stabilną ekspresję określonego genotypu, ponieważ przenosi się podczas fuzji komórek wiele genów i sekwencji regulatoro-

wych. Pewną specyficzność można uzyskać przeprowadzając fuzję komórek w obecności cytochalazyny B [45].

Znacznie precyzyjniej można przenosić gen stosując wprowadzanie do komórek fragmentów obcych chromosomów (ang. chromosome-mediated gene transfer) [46]. Jedynie niewielki fragment donorowego chromosomu ulega inkorporacji do jądra komórkowego i łączeniu z genomem. Po dokonaniu transferu konieczne jest przeprowadzenie selekcji komórek, które pobrały chromosom, stąd wskazane jest, aby chromosom posiadał marker selekcyjny.

III-1.2. Transfekcja.

Potrzeba wprowadzania do komórek jedynie ściśle określonych sekwencji DNA, genów lub ich fragmentów, doprowadziła do opracowania metody badawczej — transfekcji, w której egzogenny DNA jest pobierany przez komórki w postaci koprecypitatu z fosforanem wapnia [47—50]. Przy zastosowaniu tej metody można wprowadzać do komórek chromosomalny DNA lub klonowane geny w różnych wektorach plazmidowych. Transfekcja jest znacznie wydajniejsza niż hybrydyzacja komórek somatycznych a jej częstość może być jeszcze podwyższona poprzez wprowadzenie czynnika selekcyjnego do podłoża lub przez zastosowanie szoku elektrycznego w czasie inkubacji komórek z DNA (ang. electroporation) [51]. Marker selekcyjny może występować w badanym genie lub w przenoszącym ten gen wektorze, w warunkach doświadczalnych najczęściej obie te sekwencje są pobierane i integrowane z genomem. Drogą transfekcji uzyskano nie tylko wprowadzenie, ale również ekspresję wielu genów. Poważnym ograniczeniem tej metody jest niemożność kontrolowania miejsca integracji wprowadzonego DNA z genomowym DNA komórki.

III-1.3. Inne metody.

Ponieważ komórki wielu linii jedynie w niewielkiej ilości inkorporują egzogenny DNA wprowadzany metodą transfekcji, próbowano podawać do komórek DNA zamknięty w liposomach [52], cieniach erytrocytów oraz protoplastach bakteryjnych [53]. Fragmenty DNA można również wprowadzać do komórek metodą mikroiniekcji [54] — duży odsetek komórek trwale integruje tak podany DNA i na ogół wprowadzone geny ulegają ekspresji. Niestety ta ostatnia metoda wymaga bardzo dobrego przygotowania technicznego i jest niezwykle pracochłonna.

Ekspresja obcych genów wprowadzanych do komórki przy zastosowaniu powyższych metod jest często niestabilna i zanika po kilku podziałach komórkowych na skutek delecji, metylacji DNA lub działania czynników regulatorowych.

III-2. Wektory wirusowe a terapia genowa

W miarę uzyskiwania nowych informacji o biologii wirusów, rozpoczęto próby analogiczne do badań przeprowadzanych przy użyciu wektorów bakteriofagowych w genetyce mikroorganizmów. Kilka DNA-wirusów, jak SV-40, wirus brodawczaka wołowego — Bovine papilloma virus (BPV) lub adenowirus, zastosowano z pozytywnym wynikiem do przeniesienia DNA w różnych układach doświadczalnych [41]. Wirusy SV-40 i BPV mogą jednak przenosić tylko niewielkie odcinki DNA, ponadto BPV replikuje bez integracji z genomem gospodarza. Potencjalnie wśród DNA-wirusów największe zastosowanie mają wektory adenowirusowe.

Ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się retrowirusom i ich zastosowaniu w przenoszeniu genów. W trakcie cyklu życiowego retrowirusy umieszczają odwrotny transkrypt ich genomowego RNA (tzw. prowirus) w DNA gospodarza, gdzie ulega on ekspresji i replikacji. Informacja genetyczna retrowirusa ulega ekspresji przy wykorzystaniu wirusowych sekwencji regulatorowych (promotora i sekwencji wzmacniającej wydajność transkrypcji — enhancera), zlokalizowanych w pobliżu końców 3' i 5' wirusa, w obrębie tzw. długich końcowych powtórzeń (ang. long terminal repeats — LTR). Geny białek strukturalnych retrowirusa kodują: antygen grupowo specyficzny, odwrotną transkryptazę (niezbędną do przepisania sekwencji wirusowego RNA na prowirusowy DNA) oraz białka tworzące kapsyd, warunkujące selektywność interakcji wirusa z określoną grupą komórek zwierzęcych. Niektóre retrowirusy mogą infekować komórki inne niż komórki pierwotnego gospodarza, inne znów infekują jedynie określone komórki, np. tylko jedna z subpopulacji ludzkich limfocytów T (zwana helper) jest podatna na infekcje ludzkim wirusem HTLV-III wywołującym nabyty brak odporności immunologicznej (AIDS).

Znaczną część genomu wirusa można zastąpić innymi sekwencjami. Zmodyfikowane genomy wirusowe, po zainfekowaniu komórek gospodarza zawierających wirus typu dzikiego, mogą rekombinować z tym wirusem, wytworzone w ten sposób zrekombinowane wirusy mogą infekować inne komórki, przenosząc w ten sposób informację genetyczną z dużą wydajnością. W takim przypadku występuje jednak duże niebezpieczeństwo przeniesienia wraz z wirusem zrekombinowanym chorobotwórczego wirusa typu dzikiego.

Oprócz genów strukturalnych sekwencji regulatorowych retrowirusy zawierają tzw. sekwencję psi, niezbędną do upakowania wirusowego RNA w kapsydie (otoczce białkowej) [55]. Modyfikacja lub usunięcie tej sekwencji uniemożliwia wirusowi wytworzenie formy zdolnej do infekowania dalszych komórek, mimo zachowania przez wirus zdolności replikacji i ekspresji pozostałych sekwencji. Takie „zdefektowane” retrowirusy są stosowane jako wirusy pomocnicze przy wprowadzaniu genów do komórek szpiku kostnego. Właściwym wektorem wirusowym są w tej me-

todzie retrowirusy, z których usunięto wszystkie geny strukturalne, a w ich miejsce wbudowano gen, który ma zostać wprowadzony do komórek. Takimi zmodyfikowanymi wirusami infekuje się komórki gospodarza zakażone uprzednio wirusem pomocniczym. Zmodyfikowane wirusy wraz z przenoszonym genem ulegają integracji z genomem gospodarza i replikacji, po czym ulegają upakowaniu w puste kapsydy wirusa pomocniczego. Namnożone wirusy mogą następnie infekować kolejne komórki. Przy użyciu opisanej metody wprowadzono do mysich komórek szpiku kostnego gen ludzkiej fosforybozylotransferazy hipoksantyny (HPRT) oraz gen deaminazy adenozynowej (ADA). Po dokonaniu transplantacji transformowanych komórek do organizmu myszy stwierdzono, że ludzki gen ulegał aktywnej ekspresji [56].

Miejsce wbudowywania retrowirusów do genomu zainfekowanej komórki jest przypadkowe, istnieje więc potencjalne niebezpieczeństwo uaktywnienia komórkowych onkogenów poprzez wbudowanie wirusa wraz z jego sekwencją promotorową na końcu 5' onkogenu. Aby temu zapobiec, usuwa się z wirusowego wektora sekwencje promotorowe leżące w obrębie 3'-końcowego odcinka LTR. Przenoszone w wirusie geny muszą posiadać swoje własne sekwencje promotorowe, niezależne od wirusowych sekwencji regulatorowych. Wskazane jest też wbudowanie w wektor wirusowy markera selekcyjnego (np. gen reduktazy dihydrofolianowej warunkujący oporność na metotreksat).

Inną ujemną cechą przenoszenia informacji genetycznej przez retrowirusy, wynikającą z przypadkowej integracji wirusa z genomem, jest potencjalna możliwość inaktywacji genów gospodarza [57, 58]. Ponadto retrowirusy należąc do ruchomych elementów genetycznych, mogą wywierać wpływ na różne miejsca genomu gospodarza.

Z drugiej strony, zastosowanie retrowirusów pozwala na: uzyskanie wysokiej wydajności transfekcji, przenoszenie dużych odcinków DNA oraz kontrolowanie infekcji przez jej ograniczenie do określonych komórek. Stąd, mimo wspomnianych zastrzeżeń, wprowadzanie informacji genetycznej do organizmów ssaków przy zastosowaniu retrowirusów wydaje się obecnie bardzo obiecującą metodą, zwłaszcza w odniesieniu do komórek szpiku wykazujących naturalne powinowactwo do retrowirusów.

III-3. Wprowadzanie DNA do organizmów poprzez komórki rozrodcze

W ostatnich latach przeprowadzono próby uzyskania ekspresji obcych genów w wielokomórkowych organizmach poprzez wprowadzanie genów do komórek rozrodczych lub wczesnych embrionów organizmów wyższych, głównie *Drosophila* i myszy. Do przedjądry zapłodnionych komórek jajowych myszy wprowadzono drogą mikroiniekcji wirusowy gen kinazy ty-

midylnowej i zaobserwowano, że w większości przypadków mysie komórki nie ulegały uszkodzeniom i po implantacji rozwijały się w dojrzałe organizmy [59]. Embriony *Drosophila*, do których wprowadzono obce geny, rozwinęły się w dorosłe organizmy, a wprowadzone geny wykazywały trwałą integrację z genomem i ulegały regulacji narządowej [60, 61]. W opisanych przykładach dochodzi jedynie do przypadkowej integracji pobranych genów z genomem biorcy, co w skrajnych przypadkach może zaburzyć istotne funkcje organizmu i spowodować śmierć embrionu. Opisaną metodę wykorzystano w badaniach genów odpowiedzialnych za embriogenezę i różnicowanie komórek [62, 63].

Sekwencje DNA, które po podaniu do komórki zostają zintegrowane z genomem biorcy, w wielu przypadkach nie ulegają ekspresji. Jeżeli jednak ekspresja występuje i jest dostatecznie duża, może dojść do powstania nowych fenotypów. Na przykład, gen hormonu wzrostu wprowadzony metodą mikroiniekcji do zapłodnionych mysich komórek jajowych uległ ekspresji, co spowodowało, że transgeniczne myszy, które rozwinęły się z implantowanych embrionów były prawie dwukrotnie większe niż myszy, które nie otrzymały nowego genu [64]. Z kolei u transgenicznych myszy, które wykazywały ekspresję wprowadzonego genu antygeny T wirusa SV-40 lub aktywację onkogeny „myc” zaobserwowano rozwijanie się specyficznych nowotworów [65—67].

Powyższe badania dostarczyły wielu nowych informacji o regulacji genetycznej w trakcie różnicowania komórek, o tkankowo-specyficznej regulacji i ekspresji genów oraz onkogenezie. Ponadto opracowane metody mogą być w przyszłości przydatne do wprowadzania nowych cech do genomu zwierząt domowych. Wydaje się jednak, że ze względów etycznych nawet w dalekiej przyszłości metody te nie będą stosowane w genetyce człowieka.

IV. Zastosowanie badań molekularnych w poradnictwie genetycznym

Poradnictwo genetyczne jest jednym z najważniejszych działów genetyki człowieka i prawdopodobnie, obecnie i w przyszłości, będzie miało największy wpływ na zapobieganie chorobom genetycznym. Już obecnie w wielu krajach przeprowadzanie testów na występowanie niektórych chorób genetycznych wśród noworodków jest powszechnie stosowane.

W połowie lat siedemdziesiątych zaczęto w poradnictwie genetycznym stosować na szeroką skalę diagnostykę prenatalną opartą na hodowli komórek płynu owodniowego, uzyskanych drogą amniocentezy w drugim trymestrze ciąży. Obecnie jest to jedna z najczęściej stosowanych technik w genetyce człowieka, jest ponadto pewna i względnie bezpieczna. Rutynowo przeprowadzane są badania wśród kobiet z dużym ryzykiem zagro-

zenia ciąży: wiek matki powyżej 35 lat pozostaje nadal najczęstszym wskazaniem dla przeprowadzenia diagnostyki prenatalnej. Duże ośrodki genetyczne wykonują 1000—2000 amniocentez rocznie.

Oprócz amniocentezy, w diagnostyce prenatalnej stosuje się pobieranie próbek kosmków kosmówki (ang. chorionic villus — CV). Kosmówka zawiera szybko dzielące się komórki płodowe i w ciągu pierwszych 9—12 tygodni ciąży stanowi główną część rozwijającej się tkanki zygoty. Pobieranie kosmówki sprawiało początkowo wiele trudności [68—70]. W ostatnich latach badania znacznie rozszerzono [71—74] i w 1982 r. Old i W s p. [75] po raz pierwszy zastosowali kosmówkę do analizy hemoglobinopatii u płodu. Wkrótce wykazano, że kosmówkę można stosować jako materiał do bezpośredniej analizy RFLP i badań chromosomów [72]. Komórki kosmówki można stosować do badań kariotypu już po 2 godzinach hodowli. Również bardzo szybko można uzyskać DNA do analizy wybranych genów, a komórki kosmówki nadal hodować dla dalszych badań enzymatycznych i ewentualnego sprawdzenia uzyskanych wcześniej wyników. Wszystkie wyniki można uzyskać przed 12 tygodniem ciąży. Do kwietnia 1985 r. w badaniach koordynowanych przez WHO, w 56 ośrodkach badawczych wykonano 4586 oznaczeń stosując kosmówkę i u 9,4⁰/o badanych płodów wykazano anomalie.

V. Podsumowanie

W najbliższym czasie powinno dojść do dalszego udoskonalenia metod wykrywania i diagnostyki genetycznie uwarunkowanych chorób na poziomie DNA. Postęp w tej dziedzinie zależy w dużej mierze od uzyskania odpowiednich sond molekularnych oraz od poznania genów i zaburzeń odpowiedzialnych za powstanie choroby. Niestety często nie jest możliwe określenie zaburzenia, jeżeli nie jest nim duża delecja. Pewną pomocą może być poszukiwanie korelacji pomiędzy chorobą a polimorfizmem odcinków DNA przylegających do badanego genu, jednak w wielu przypadkach, na przykład cytrulinemii [76], niedoboru białka wiążącego tyroksynę [77], daltonizmu [78], dotąd nie dało to rezultatów.

Diagnostyka prenatalna, która do niedawna była możliwa tylko w przypadkach anomalii chromosomowych oraz chorób, w których ekspresja patologicznego genu występowała w fibroblastach płodowych, obecnie jest możliwa w wielu chorobach spowodowanych mutacją genową, nie powodującą zmian w strukturze chromosomu ani nie powodującą powstania produktów wykrywalnych metodami biochemicznymi. Prenatalna diagnostyka może być wykonywana rutynowo w przypadku takich chorób, jak: anemia sierpowata, talasemie, niedobór alfa₁-antytrypsyny, fenyloketonuria, niedobór antytrombiny III, zespół Lesh-Nyhana (niedobór fosforyborylotransferazy hipoksantyny), niedobór hormonu wzrostu, hemofilia A

i B, zespół łamliwego chromosomu X, dystrofia mięśniowa typu Duchenne'a i Beckera, cukrzyca typu I (insulinozależna), retinoblastoma i wiele innych.

Należy podkreślić możliwość wykorzystania analizy DNA do określenia nosicielstwa patologicznego genu w chorobach dziedziczonych recesywnie (wykrywanie heterozygot) i chorobach o niepełnej penetracji, które rozwijają się dopiero w późniejszym okresie życia, kiedy chore osoby zwykle mają już potomstwo, np. w płasawicy Huntingtona [79].

Analiza polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych DNA przy użyciu dostępnych sond molekularnych pozwala na ustalenie ojcostwa w przypadkach, gdy standardowe badania antygenów grupowych, białek surowicy i antygenów zgodności tkankowej nie dają pewnej odpowiedzi [80].

Hybrydyzacja komórek somatycznych połączona z hybrydyzacją *in situ* przy zastosowaniu sond cDNA pozwala na precyzyjną lokalizację genu w chromosomie. Technika ta, powiązana z analizą sprzężeń RFLP badanego genu z innymi markerami w obrębie chromosomu pozwala na ustalenie dokładnych map chromosomowych [81—85].

Dzięki zastosowaniu technik rekombinacji DNA możliwe jest obecnie uzyskiwanie *in vitro* wielu białek, których otrzymanie metodami izolowania lub syntezy sprawiało wiele trudności. Wysoka czystość uzyskanych w ten sposób białek pozwala na bezpieczne ich stosowanie w terapii chorób wywołanych genetycznie uwarunkowanym niedoborem tych białek. Na przykład, uzyskany techniką rekombinacji czynnik VIII krzepnięcia nie stwarza dla chorych na hemofilię zagrożenia zakażenia wirusem HTLV-III (wywołującym AIDS). Również hormony wzrostu uzyskane przy zastosowaniu technik rekombinacji DNA są bezpieczne, podczas gdy u osób, które otrzymywały hormony izolowane z ludzkich gruczołów przysadkowych wystąpiło podejrzenie choroby Creutzfeld-Jakob'a.

Niezwykle ważna jest również możliwość produkcji szczepionek o wysokiej czystości. Zastosowanie kapsydów wirusa nie zawierających materiału genetycznego jako szczepionek pozwala na uzyskanie odpowiedzi immunologicznej przeciw natywnym wirusom bez niebezpieczeństwa spowodowania zakażenia wirusowego.

Artykuł otrzymano 20 listopada 1986
Zaakceptowano do druku 28 maja 1987

PIŚMIENNICTWO

1. Saiki, R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N., (1985), *Science*, **230**, 1350—1354.
2. Scharf S. J., Horn G. T., Erlich H. A., (1986), *Science*, **233**, 1076—1078.
3. Beaudet A. L., (1985), *Am. J. Hum. Genet.*, **37**, 386—406.

4. Conner B. J., Reyes A. A., Morin C., Itakura K., Teplitz R. L., Wallace R. B., (1983), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **80**, 278—282.
5. Willard H. F., Wayne J. S., Skolnick M. H., Schwartz C. E., Powers V. E., England S. B., (1986), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **83**, 5611—5615.
6. Cooper D. N., Schmidtke J., (1984), **66**, 1—16. *Human Genetics*
7. Studencki A. B., Conner B. J., Impraime C. C., Teplitz R. L., Wallace R. B., (1985), *Am. J. Hum. Genet.*, **37**, 42—51.
8. Pirastu M., Kany Y. W., Cao A., Conner B. J., Teplitz R. L., Wallace R. B., (1983), *N. Engl. J. Med.* **309**, 284—287.
9. Orkin S. H., Markham A. F., Kazazian H. H. Jr., (1983), *J. Clin. Invest.*, **71**, 775—779.
10. Kidd V. J., Wallace R. B., Itakura K., Woo S. L. C., (1983), *Nature*, **304**, 230—234.
11. Kan Y. W., Globus M. S., Dozy A. M., (1976), *N. Engl. J. Med.*, **295**, 1165—1167.
12. Orkin S. H., Alter B. P., Altay C., (1978), *N. Engl. J. Med.*, **299**, 166—172.
13. Phillips J. A., Hjelle B. L., Seeburg P. H., Zachman M., (1981), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **78**, 6372—6375.
14. Pope F. M., Nicholls A. C., Grosveld F. G., (1983), *Clin. Genet.*, **24**, 303.
15. Chu M-L., Williams C. J., Pepe G., Hirsch J. L., Prockop D. J., Ramirez F., (1983), *Nature*, **304**, 78—80.
16. Kan Y. W., Dozy A. M., (1978), *Lancet*, **2**, 910—912.
17. Chang J. C., Kan Y. W., (1982), *N. Engl. J. Med.*, **307**, 30—32.
18. Geever R. F., Wilson L. B., Nallaseth F. S., Milner P. F., Bittner M., Wilson J. T., (1981), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **78**, 5081—5085.
19. Orkin S. H., Little P. F. R., Kazazian H. H. Jr., Boehm C. D., (1982), *N. Engl. J. Med.* **07**, 32—36.
20. Orkin S. H., Kazazian H. H. Jr., Antonarakis S. E., i inni (1982), *Nature*, **296**, 627—631.
21. Kazazian H. H. Jr., Orkin S. H., Markham A. F., Chapman C. R., Youssoufian H., Waber P. G., (1984), *Nature*, **310**, 152—154.
22. Whitehead A. S., Woods D. E., Fleischnick E. i inni, (1984), *N. Engl. J. Med.*, **310**, 88—91.
23. Atweh G. F., Forget B. G., (1986), *Am. J. Hum. Genet.*, **38**, 855—859.
24. Woo S. L. C., Lidsky A. S., Guttler F., Chandra T., Robson K., J. H., (1983), *Nature*, **306**, 151—155.
25. Vaiman M., Chardon P., Cohen D., (1986), *Anim. Genet.*, **17**, 113—133.
26. Inoko H., Ando A., Ito M., Tsuji K., (1986), *Hum. Immunol.*, **16**, 304—313.
27. Bontrop R., Tilanus M., Mikulski M., van Eggermond M., Ter-mijtelen A., Giphart M., (1986), *Immunogenetics*, **23**, 401—405.
28. Ledley F. D., Levy H. L., Woo S. L., (1986), *N. Engl. J. Med.*, **314**, 1276—1280.
29. Di Lella A. G., Kwok S. C., Ledley F. D., Marvit J., Woo S. L., (1986), *Biochemistry*, **25**, 743—749.
30. Bell J., Rassenti L., Smoot S., Smith K., Newby C., Hohfeld R., Toyka K., Mc Devitt H., Steinman L., (1986), *Lancet*, **1**, 1058—1060.
31. Howell M. D., Austin R. K., Kelleher D., Nepom G. T., Kagnoff M. F., (1986), *J. Exp. Med.*, **164**, 333—338.
32. Bömme J., Carlsson B., Wallin J., Möller E., Persson B., Petersson P. A., Rask L., (1986), *I. Immunol.*, **137**, 941—947.
33. Festenstein H., Awad J., Hitman G. A., Cutbush S., Groves A. V., Cassell P., Ollier W., Sachs J. A., (1986), *Nature*, **322**, 64—67.

34. Camerino G., Mattei M. G., Mattei J. F., Jaye M., Mandel J. L., (1983), *Nature*, **306**, 701—704.
35. Davies K. E., Pearson P. L., Harper P. S., i inni (1983), *Nucleic Acid Res.*, **11**, 2303—2312.
36. Kingston H. M., Thomas N. S. T., Pearson P. L., Sarfarazi M., Harper P. S., (1983), *J. Med. Genet.*, **20**, 255—258.
37. Gusella J. F., Wexler N. S., Conneally P. M., i inni, (1983), *Nature*, **306**, 234—238.
38. Gusella J. F., Tanzi R. E., Anderson M. A., i inni, (1984), *Science*, **225**, 1320—1326.
39. Culliton B. J., (1985), *Science*, **227**, 493—496.
40. Culliton B. J., (1985), *Science*, **228**, 561—562.
41. Anderson W. F., (1984), *Science*, **226**, 401—409.
42. Motulsky A. G., (1983), *Science*, **219**, 135—140.
43. Ruddle F. H., Kucherlapati R. S., (1974), *Sci. Am.*, **231**, 36—44.
44. Fournier R.E.K., Ruddle F. H., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 319—323.
45. Słomski R., Wang D-R., Cohen E. P., (1984), *Immunology*, **52**, 281—290.
46. Klobutcher L. A., Ruddle F. H., (1979), *Nature*, **280**, 657—660.
47. Graham F. L., Vander Eb A. J., (1973), *Virology*, **52**, 456—467.
48. Bacchetti S., Graham F. L. (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1590—1594.
49. Pellicer A., Wigler M., Axel R., Silverstein S., (1978), *Cell*, **14**, 133—141.
50. Wigler M., Pellicer A., Silverstein S., Axel R., (1978), *Cell*, **14**, 725—731.
51. Potter H., Weir L., Leder P., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7161—7165.
52. Ziętkiewicz E., Słomski R., (1984), *Post. Biochem.* **30**, 149—172.
53. Schaffner W., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2163—2167.
54. Capecchi M. R., (1980), *Cell*, **22**, 479—488.
55. Cone R. D., Mulligan R. C., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6349—6353.
56. Miller A. D., Eckner R. J., Jolly D. J., Friedman T., Verma I. M., (1984), *Science*, **225**, 630—632.
57. King W., Patel M. D., Lobel L. I., Goff S. P., Nguyen-Huu M. C., (1984), *Science*, **228**, 554—558.
58. Varmus H. E., Quintrell N., Ortiz S., (1981), *Cell*, **25**, 23—36.
59. Spradling A. C., Rubin G. M., (1982), *Science*, **218**, 341—347.
60. Rubin G. M., Spradling A. C., (1982), *Science*, **218**, 348—353.
61. Gordon J. W., Scangos G. A., Plotkin D. J., Barbosa J. A., Ruddle F. H., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7380—7384.
62. Wagner E. F., Covarrubias L., Stewart T. A., Mintz B., (1983), *Cell*, **35**, 647—655.
63. Schnieke A., Harbers K., Jaenisch R., (1983), *Nature*, **304**, 315—320.
64. Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammer R. E., (1982), *Nature*, **300**, 611—615.
65. Brinster R. L., Chen H. Y., Messing A., van Dyke T., Levine A. J., Palmiter R. D., (1984), *Cell*, **37**, 367—379.
66. Stewart T. A., Pattengale P. K., Leder P., (1984), *Cell*, **38**, 627—637.
67. Hanahan D., (1985), *Nature*, **315**, 115—322.
68. Hahnemann N., (1974), *Clin. Genet.*, **6**, 294—306.

69. Kullander S., Sandahl B., (1973), *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, **52**, 355—359.
70. Liang W-T Chin. Anshan Department of Obstetrics and Gynecology, (1975), *Chin. Med. J. (Engl)*, **1**, 117—126.
71. Kazy Z., Rozofsky I. S., Bakharev V. A., (1982), *Prenat. Diagn.* **2**, 39—45.
72. Simoni C., Brambati B., Danesing C., (1983), *Hum. Genet.*, **63**, 349—357.
73. Williamson R., Eskedale J., Coleman D. V., Niazi M., Loeffler F. E., Modell B., (1983), *Lancet*, **1**, 1125—1127.
74. Kaplan L., Damez Y., Goosens M., (1983), *IRGS Med. Sci.*, **11**, 85—86.
75. Old J. M., Ward R. H. T., Petrou M., Karagozlu F., Modell B., Weatherall D. J., (1982), *Lancet*, **2**, 1413—1416.
76. Su T-S., Bock H. G. O., Beaudet A. L., O'Brien W. E., (1982), *J. Clin Invest.*, **70**, 1334—1339.
77. Hill M. E. E., Davies K. E., Harper P., Williamson R., (1982), *Hum. Genet.*, **60**, 222—226.
78. Murray J. M., Davies K. E., Harper P. S., Meredith L., Mueller C. R., Williamson R., (1982), *Nature*, **300**, 69—71.
79. Gusella J. F., Wexler N. S., Conneally P. M., Naylor S. L., Anderson M. A., Tanzi R. E., Watkins P. C., Ottina K., Wallace M. R., Sakaguchi A. Y., Young A. B., Shoulson I., Bonilla E., Martin J. B., (1983), *Nature*, **306**, 234—239.
80. Smouse P. E., Chakraborty R., (1986), *Am. J. Hum. Genet.*, **38**, 918—939.
81. Max E. E., McBride O. W., Morton C. C., Robinson M. A., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5592—5596.
82. Cooke N. E., Willard H. F., David E. V., George D. L., (1986), *Hum. Genet.*, **73**, 225—229.
83. Kluge-Beckerman B., Naylor S. L., Marshall A., Gardner J. C., Shows T. B., Benson M. D., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**, 1196—1204.
84. Gusella J. A., Gilliam T. C., McDonald M. E., Cheng S. V., Tanzi R. E., (1986), *J. Med. Genet.*, **23**, 193—199.
85. Leach R., De Mars R., Hasstedt S., White R., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3909—3913.

The following is a list of the names of the persons who have been
 named in the above mentioned report, and who are now living in
 the city of New York, and who are known to the undersigned.
 The names are given in the order in which they were named in
 the report, and are given in full, with their addresses, as far
 as known to the undersigned. The names of the persons who
 have died since the date of the report are given in italics.
 The names of the persons who are now living in the city of
 New York, and who are known to the undersigned, are given in
 full, with their addresses, as far as known to the undersigned.
 The names of the persons who have died since the date of the
 report are given in italics. The names of the persons who are
 now living in the city of New York, and who are known to the
 undersigned, are given in full, with their addresses, as far as
 known to the undersigned. The names of the persons who have
 died since the date of the report are given in italics.

Pracę dedykujemy naszemu Nauczycielowi
Profesorowi Maciejowi Wiewiórkowskiemu
w związku z 70 rocznicą urodzin

MIROŚLAWA Z. BARCISZEWSKA*, JAN BARCISZEWSKI**

Eukariotyczne transferowe kwasy rybonukleinowe o właściwościach supresorowych

Eukaryotic transfer ribonucleic acids with suppressor activity

Spis treści:

- 1. Wprowadzenie**
- 2. Supresja informacyjna u ssaków**
- 3. Roślinne tRNA o właściwościach supresorowych**
- 4. Podsumowanie**

Contents

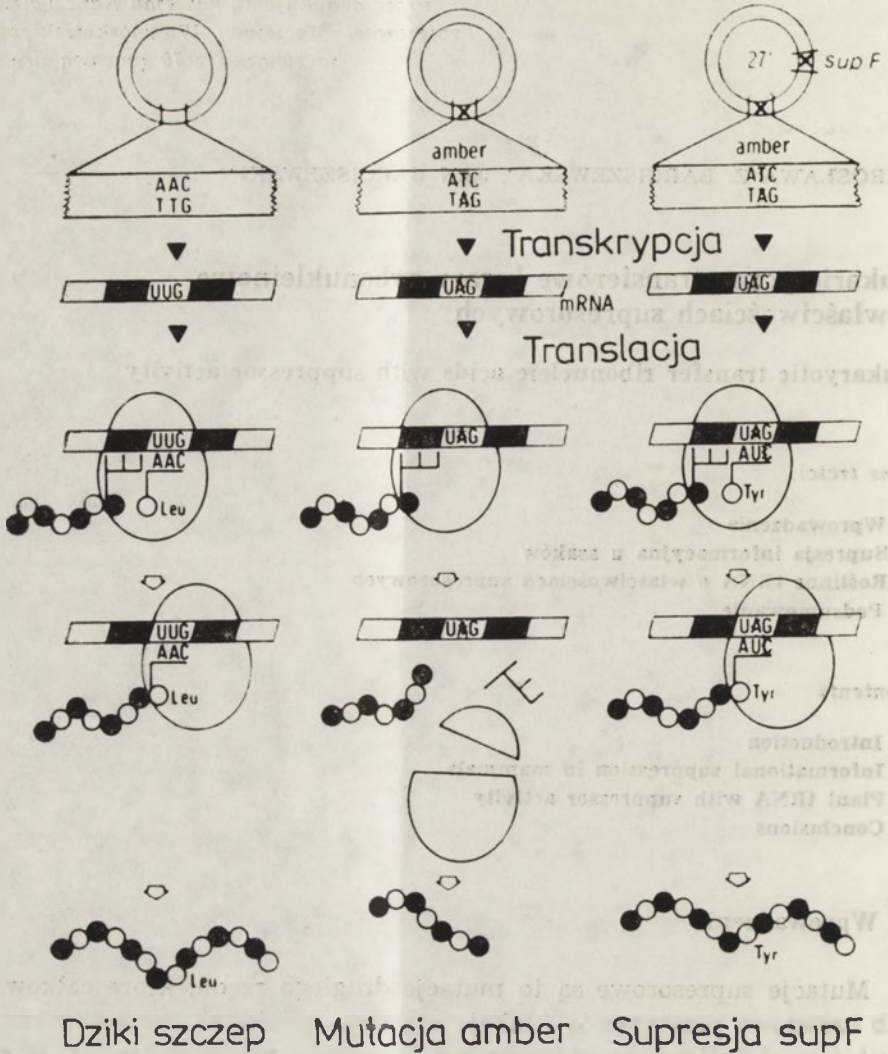
- 1. Introduction**
- 2. Informational suppression in mammals**
- 3. Plant tRNA with suppressor activity**
- 4. Conclusions**

1. Wprowadzenie

Mutacje supresorowe są to mutacje drugiego rzędu, które całkowicie lub częściowo przywracają funkcje utracone na skutek mutacji pierwotnych i są zlokalizowane w innym niż te ostatnie miejscu (Ryc. 1). W niektórych przypadkach cały fenotyp szczepu dzikiego ulega odtworzeniu, w innych proces ten zachodzi tylko częściowo [1—3].

Mutacje są konsekwencją zmian w sekwencji par zasad w genie strukturalnym lub poza nim. W pierwszym przypadku zmiany te mogą następować w wyniku addycji lub delecji (ubytek określonego odcinka materiału genetycznego) jednej lub kilku par zasad, powodując zaburzenia w odczytywaniu kodu genetycznego łącznie z przesunięciem ramki odczytu. Mogą również nastąpić zmiany w sekwencji prowadzące do zastąpienia jednego aminokwasu innym (mutacja myląca, ang. missense mutation) lub

* Dr, ** Dr hab., w Zakładzie Cemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Noskowskiego 12, 61-704 Poznań.



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie procesu nonsensownej supresji. Panele lewy i środkowy przedstawiają sytuację odpowiednio w szczepie dzikim, dla mutacji amber (5). Supresja kodonu amber (UAG) przez supresor Sup F (tyr T) pokazana jest w prawym panelu (5).

też wcześniejsze zakończenie syntezy łańcucha polipeptydowego (mutacje nonsensowne, ang. nonsense mutation).

Mutacje drugorzędowe występujące poza genem niosącym pierwotną mutację nazywa się supresorami pozagenowymi (ang. extragenic or external suppressors) i dzieli na dwie grupy [4]:

a) supresorów międzygenowych (ang. intergenic suppressor), które korygują sekwencję aminokwasów w białku mutantu poprzez modyfikacje układu biosyntezy białka (tzw. supresja informacyjna lub bezpośrednia).

b) supresorów międzygenowych, w których biosynteza zmutowanych białek kompensowana jest pośrednio poprzez wpływ różnych czynników na ekspresję genu szczepu dzikiego (ang. indirect suppression).

Supresja informacyjna, która jest przedmiotem tego artykułu realizowana jest głównie poprzez zmiany w strukturze transferowych kwasów rybonukleinowych (tRNA).

Zakończenie syntezy łańcucha polipeptydowego następuje wówczas, gdy rybosomy natrafiają na jeden z trzech kodonów terminujących: UAA (ochre), UAG (amber) i UGA (opal), znajdujących się przy końcu każdego cistronu. W niektórych przypadkach terminacja ulega supresji przez tRNA, który rozpoznaje jeden z trzech kodonów terminujących i aminokwas zostaje włączony do syntezującego się białka. W takiej sytuacji rybosomy kontynuują włączanie aminokwasów dopóki nie natrafiają na następny kodon terminujący. Białka, które syntetyzowane są w taki sposób nazywać będziemy wydłużonymi, supresorowymi lub dalszego odczytu (ang. readthrough), a tRNA, które rozpoznają kodony terminujące supresorowymi tRNA (ang. suppressor tRNA), [6].

Właściwości supresorowe mogą być indukowane w procesie mutagenyzy lub też występować spontanicznie [7]. Te ostatnie wydają się być mechanizmem odpowiedzialnym za syntezę białek supresorowych, które wypełniają istotne funkcje biologiczne. Jako przykład wymienimy tutaj pierwszy poznany przypadek naturalnej supresji. Pochodzi on z badań nad bakteriofagiem Q β [8]. Fag ten ma dwa rodzaje białek płaszczka. Główne białko o m.cz. 14 000 D oraz dodatkowe białko o m.cz. 38 000 D (A₁). Ponieważ A₁ zawiera dodatkowy peptyd (200 aminokwasów) dołączony do końca karboksylowego głównego białka, A₁ uważa się za rezultat czytania kodonu terminującego UGA w genie białka płaszczka.

Rekonstrukcja wirionu Q β in vitro w obecności lub nieobecności wydłużonego białka A₁ jednoznacznie wskazuje na jego niezbędność dla zachowania infekcyjności wirusa [8]. Dalsze przykłady naturalnej supresji zostały omówione w publikacjach [5, 7].

Supresja informacyjna, a w szczególności supresja kodonów nonsensownych, odgrywa kluczową rolę w wyjaśnieniu mechanizmu biosyntezy białka, natury kodu genetycznego, zależności między strukturą i funkcją tRNA. U Eukaryota dobrze scharakteryzowane są nonsensowne supresory drożdży. Jednakże dotychczasowa wiedza o naturalnej supresji u tej grupy organizmów jest generalnie niewielka.

Badania tego zjawiska, prowadzone w ostatnich latach głównie u ssaków i roślin, doprowadziły do wyodrębnienia i pełnej charakterystyki kilku supresorowych tRNA.

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie i podsumowanie dotychczasowych badań naturalnych supresorów eukariotycznych. Ze względu na nowość i atrakcyjność tematu oraz bezpośredni udział w niektórych pracach, autorzy pragną temat ten czytelnikowi przybliżyć.

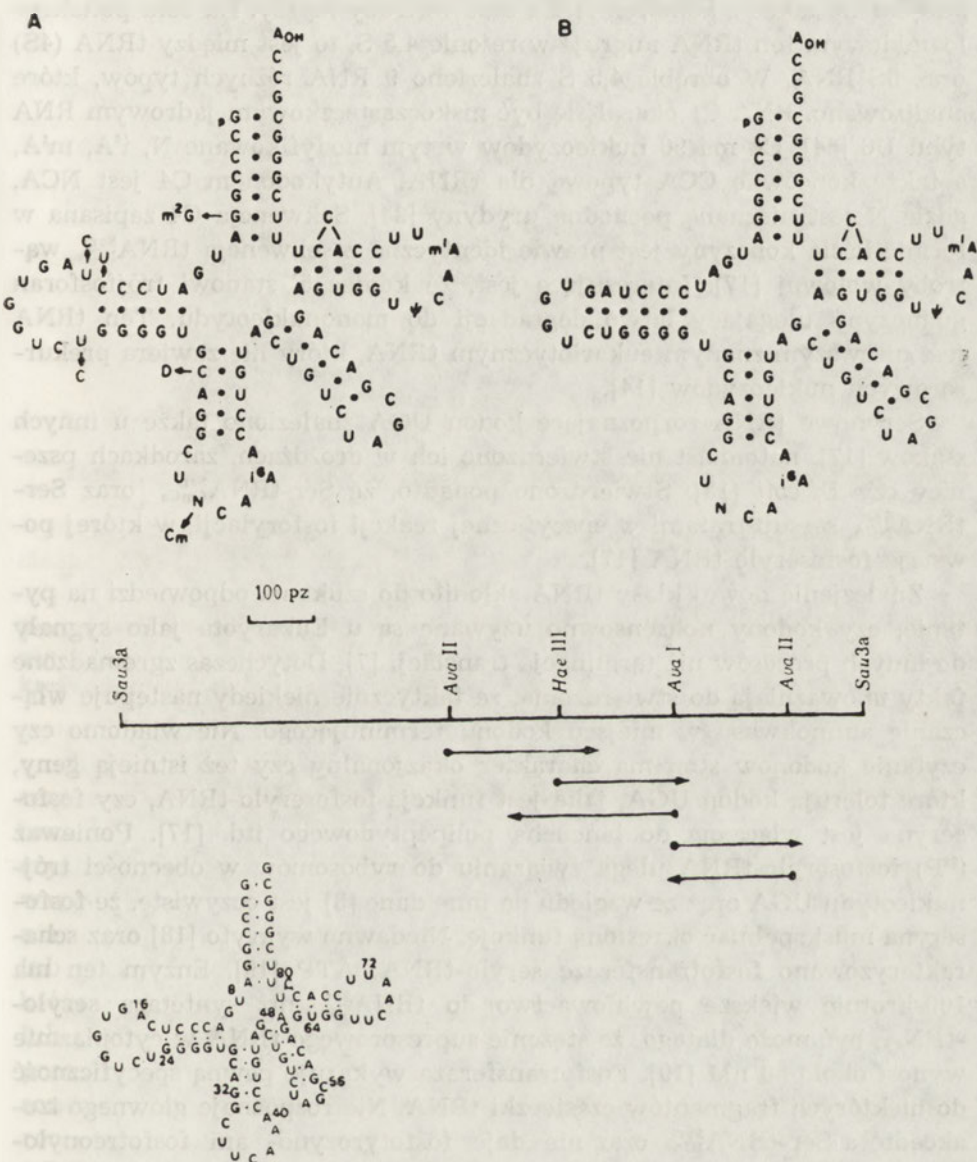
2. Supresja informacyjna u Eukaryota

Zjawisko supresji u Eukaryota wykryto stosując test biosyntezy białka *in vitro*. Proces ten można prowadzić w ekstrakcie retikulocytów królika, w obecności dowolnego informacyjnego RNA. Jak wiadomo matrycowy RNA α -hemoglobiny zawiera kodon terminujący UAA (ochre) oraz następny kodon stop w odległości 63 par zasad (czyli 21 kodonów) w kierunku końca 3'; natomiast mRNA β -hemoglobiny ma kodon terminujący UGA (opal) oraz następny sygnał stop złożony z tandemu kodonów UAA w odległości 22 kodonów w kierunku końca 3' [6]. Jak widać oba globinowe mRNA nadają się doskonale do badania mechanizmu supresji. Syntetyzujące się w ten sposób białko dalszego odczytu (modyfikowana hemoglobina) ma m.c.z. 18 500 D. Masa cząsteczkowa hemoglobiny 16 000 D.

Białko supresorowe powstające podczas translacji RNA wirusa mozaiki tytoniu (TMV-RNA), produkowane jest w wyniku czytania kodonu amber, natomiast otrzymane w wyniku translacji β -globinowego RNA jest rezultatem supresji kodonu opal. Należało zatem, w przypadku retikulocytów królika, wyodrębnić specyficzny tRNA posiadający właściwości czytania kodonu UGA i powodujący powstanie modyfikowanej hemoglobiny o m.c.z. 18 500. Geller i Rich [6] zidentyfikowali tRNA specyficzny dla tryptofanu ($tRNA^{Trp}$) jako odpowiedzialny za ten proces. Niezależnie, czy efekt ten powoduje cytoplazmatyczny czy organelowy tRNA (jak niektórzy sądzą, mitochondrialny $tRNA^{Trp}$ — mt $tRNA^{Trp}$ retikulocytów) było to bardzo ważne stwierdzenie w badaniach naturalnej supresji. Wspomniano tutaj o mt $tRNA^{Trp}$ ponieważ wiadomo, że kod genetyczny w mitochondriach jest szczególnie [10], a mt $tRNA^{Trp}$ sprawnie rozpoznaje kodon UGA [11, 12].

Pierwszym w pełni scharakteryzowanym eukariotycznym supresorowym tRNA był tRNA specyficzny dla seryny wyodrębniony z wątroby bydłej [13]. tRNA ten ma kilka charakterystycznych cech strukturalnych. Występuje w nim antykodon tryptofanu CmCA (Rys. 2), ale tRNA ten przyłącza serynę. Omawiany $tRNA_{CmCA}^{Ser}$ nie wiąże się do rybosomów w obecności kodonu tryptofanu UGG ani też w obecności sześciu kodonów serynowych AGPy i UCX. Jediną trójką katalizującą ten proces był trójnukleozyd UGA. Oddziaływanie $tRNA_{CmCA}^{Ser}$ z kodonem opal potwierdzono następnie w teście biosyntezy białka *in vitro* stosując RNA β -globiny jako matrycę. Interesujące jest, jakie modyfikacje tRNA powodują tak drastyczne zmiany w oddziaływaniu kodon—antykodon. Pewne wnioski można wyciągnąć z porównania sekwencji nukleotydowych tRNA. Najbardziej właściwym układem odniesienia wydaje się być $tRNA^{Trp}$ E.coli tzw. suppressor Hirscha [14]. Oba tRNA, to jest $tRNA^{Trp}$ E.coli [13] oraz $tRNA_{CmCA}^{Ser}$ wątroby bydłej [13] mają podobne antykodony: odpowiednio CCA i CmCA oraz rozpoznają ten sam kodon UGA. Wiadomo również, że

zamiana jednego nukleotydu A na G w ramieniu dwuhydrourydyny tRNA^{Trp} E. coli dzikiego szczepu powoduje zmianę własności kodujących z UGG (tryptofan) na UGA (opal). Sugeruje to, że zmiany w tym fragmencie cząsteczki tRNA mogą być odpowiedzialne za rozpoznanie kodu genetycznego. tRNA^{Ser}_{CmCa} różni się od innych tRNA [15, 16] dwoma dodatkowymi nukleozydami w ramieniu dwuhydrourydyny między „stałymi



Ryc. 2. Sekwencja nukleotydoma supresorów opal wątroby bydłej [17]. Strukturę pierwszorzędową tRNA^{Ser}_{NCA} zapisano w dwóch modelach liścia kończyny (A i B). Strzałkami na rysunku A zaznaczone są nukleotydy występujące w drugim izoakceptorowym tRNA — tRNA^{Ser}_{CmCa}.

pozycjami" 8 i 14 (poz. 8 — urydyna i poz. 14 — adenozyrna). Właśnie te cechy strukturalne mogą powodować zmiany w oddziaływaniu kodon—antykodon. Dalsze badania doprowadziły do znalezienia drugiego izoakceptora, bardzo podobnego do tRNA^{Ser}_{CmCa}, ale różniącego się strukturą antykodonu. Zamiast metylowanej cytydyny w pierwszej pozycji antykodonu stwierdzono nukleozyd N o nieznannej budowie (Ryc. 2, 17). tRNA^{Ser} wyodrębniono także z komórek HeLa oraz wątroby myszy. Na żelu poliakryloamidowym ten tRNA migruje w rejonie 4,5 S, to jest między tRNA (4S) oraz 5S RNA. W obrębie 4,5 S znaleziono 9 RNA różnych typów, które analizowano. RNA C1 okazał się być niskocząsteczkowym jądrowym RNA typu U6 [34]. C4 ma 90 nukleozydów w tym modyfikowane N, i⁶A, m¹A, a także końcówkę CCA typową dla tRNA. Antykodonem C4 jest NCA, gdzie N jest nieznaną pochodną urydyny [34]. Sekwencja C4 zapisana w formie liścia kończyny jest prawie identyczna z sekwencją tRNA^{Ser}_{NCA} wątroby wołowej [17]. Interesujące jest, że koniec 5' stanowi trójfosforan guanozyny ulegający łatwo degradacji do mononukleotydu. Ten tRNA jest pierwszym znanym eukariotycznym tRNA, który nie zawiera prekursorowych nukleozydów [14].

Serynowe tRNA rozpoznające kodon UGA znaleziono także u innych ssaków [17], natomiast nie stwierdzono ich w drożdżach, zarodkach pszenicy czy *E. coli* [13]. Stwierdzono ponadto, że Ser-tRNA^{Ser}_{CmCa} oraz Ser-tRNA^{Ser}_{NCA} są substratami w specyficznej reakcji fosforylacji, w której powstaje fosfoserylo-tRNA [17].

Znalezienie nowej klasy tRNA skłoniło do szukania odpowiedzi na pytanie, czy kodony nonsensowne używane są u Eukaryota jako sygnały do innych procesów niż terminacja translacji [7]. Dotychczas zgromadzone fakty upoważniają do stwierdzenia, że faktycznie niekiedy następuje włączanie aminokwasu w miejscu kodonu terminującego. Nie wiadomo czy czytanie kodonów stop ma charakter okazjonalny czy też istnieją geny, które tolerują kodon UGA, jaka jest funkcja fosfoserylo-tRNA, czy fosfoseryna jest włączana do łańcucha polipeptydowego itd. [17]. Ponieważ (³²P) fosfoserylo-tRNA ulega związaniu do rybosomów w obecności trójnukleotydu UGA oraz ze względu na inne dane [3] jest oczywiste, że fosfoseryna musi spełniać określoną funkcję. Niedawno wykryto [18] oraz scharakteryzowano fosfotransferazę serylo-tRNA: ATP [19]. Enzym ten ma 100-krotnie większe powinowactwo do tRNA^{Ser}_{CmCa} niż syntetaza serylo-tRNA, być może dlatego, że stężenie supresorowego tRNA w cytoplazmie wynosi około 50 nM [19]. Fosfotransferaza wykazuje pewną specyficzność do niektórych fragmentów cząsteczki tRNA. Nie rozpoznaje głównego izoakceptora Ser-tRNA^{Ser}_{ICA} oraz nie daje fosfotyrozyno- ani fosfotreonylo-tRNA z odpowiednimi specyficznymi aminoacylo-tRNA. Wynika stąd wyraźnie istotna rola fosfoserylo-tRNA w procesie biosyntezy białka u ssaków, a także jego udział w odwrotnym szklaku przebiegającym od seryny do 3-fosfohydrosyprogronianu [19].

Niezwykle właściwości spowodowały chęć poznania zależności między strukturą a funkcją supresorowych tRNA przez analizę struktury i organizacji ich genów. Dotychczas badania w tej dziedzinie dotyczyły głównych izoakceptorów tRNA.

			Ava II		-200	
				GXCCCT	CTATTTGCAT	ACGGCGCGG
	-180		-160		-140	
CGTGCTGCCG	GCCCGGCAAG	GGCTGCGGCT	TCTCGCCCT	TCAGCGGTA	CGCTGCGGG	
	-120		-100		-80	
CGGGGCTGA	GGCGGGCAG	CAATAGGGGC	ACCGCTCGGC	GCGGCTGTGC	GGTACTGCGG	
	-60	Hae III	-40		-20	
AGGCCTCGCC	CTGACCTGAC	AACGGCCTAG	TCTTGACCT	TCATATCCTT	GAGGGAAGGA	
	1		20		40	
GGTATAATT	GCCCGATGA	CCCTCAGTGG	TCTGGGGTGC	AGGCTTCAAA	CCTGTAGCTG	
	5'			-----****	-----	
	60		80		100	
TCTAGCGACA	GAGTGCTTCA	ATTCCACCTT	TCGGGCGGTG	TGGCGGAAGC	GAGCAGGTTT	
			-----3'			
	120		Ava I		160	
TGTTTTTGT	CCCGTGGTA	CCCCAAGCCC	GAGGGCTTCG	TAGTGCTACC	CGCGGCTGG	
	180		200		220	
ATAGCAGCGG	AGGATTGAGC	CACAAAGGGG	AACTGCATAC	GCGATGTGGA	CGCTGCGTGC	
	240		260		280	
CCTGCQCGG	TTATAGGACA	CGCGGTGGGG	ACAGTCAAC	AAAACCAGCT	CTGTGTATTT	
	300		Ava I			
TATIGCTTTC	CCTCAGCCCT	TGTCCTTTGC	TTCGGYC			

Ryc. 3. Analiza sekwencji fragmentu DNA kurczęcia (540 par zasad) zawierającego gen supresora opal [20]. Kodujący odcinek genu tRNA (nukleotydy 1—87) jest podkreślony. Gwiazdkami zaznaczono antykodon tRNA.

Supresorowy tRNA^{Ser} wątroby bydłej nie jest głównym izoakceptorem i występuje w cytoplazmie w niewielkiej ilości. Interesujące jest zatem jak wygląda gen takiego tRNA, czy występuje on w wielu pojedynczych kopiach czy też w zgrupowaniach (ang. cluster), czy ma zróżnicowaną ilość i różne lokalizacje intronów sugerujące różne drogi dojrzewania, czy ma ten sam promotor i taką samą sekwencję kończącą, czy gen lub geny stanowią fragmenty większego zbioru genów funkcjonalnych, które mogą stać się pseudogenami (tj. genami nieczynnymi) przez delecję lub przegrupowanie [20]. Dla wyjaśnienia tych kwestii wyodrębniono supresorowy (opal) tRNA^{Ser} z wątroby kurczęcia i wykorzystano go jako sondę do izolacji jego genu z przygotowanej biblioteki genów w fagu, Charon 4a. Ponieważ z wątroby bydłej wyodrębniono dwa tRNA^{Ser} (tRNA^{Ser}_{CmCa} i tRNA^{Ser}_{NCA} pomiędzy którymi istnieje 90% homologii) należało się spodziewać, że podobna sytuacja ma miejsce u kurczęcia i genom zawiera dwa geny supresorowego (UCA) tRNA. Okazało się jednak, że DNA kurczęcia zawiera tylko jeden gen tRNA^{Ser}. Niska zawartość tego tRNA w cy-

toplazmie [19] może być tłumaczona różnicą w liczbie kopii genów izoakceptorowych tRNA lub jako wynik regulacji transkrypcji na skutek zmiany powinowactwa promotora.

Porównanie dotychczas znanych sekwencji wewnętrzznego 5' promotora genów tRNA daje sekwencję największej zgodności (ang. consensus sequence) TRGYNNARTGC: gdzie R — puryna, Y — pirymidyna, N — miejsce występowania różnych nukleotydów. Gen tRNA^{Ser} kurczenia na strukturę „TGACCCTCAGTGC₂₀” różniącą się zamianą G na A w pozycji 10 cząsteczki tRNA oraz obecnością 2 dodatkowych nukleotydów występujących po stałej pozycji 13. Takiej zamiany nie stwierdzono w dotychczas znanych strukturach genów tRNA. W regionie 3' promotora (nukleotydy 65—75) sekwencja genu tRNA^{Ser} i sekwencja największej zgodności są bardzo podobne (Tabela).

gen tRNA ^{Ser}	(pozycje w strukturze)	
consensus	⁸ TGACCCTCACTGC ²⁰ TRGYNN-ARTGG	⁶⁵ GCTTGAATTCC ⁷⁵ GGTTCRANCC

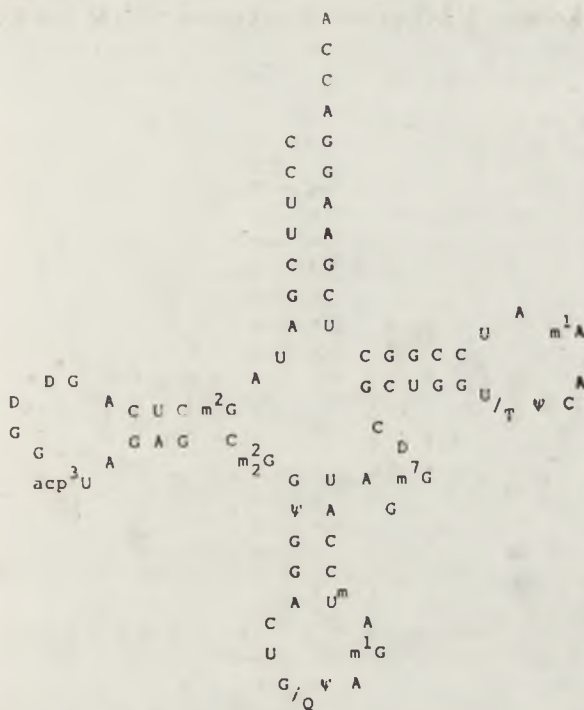
Jak widać z powyższego zestawienia gen strukturalny tRNA^{Ser}_{CCA} ma normalny „3' promotor” oraz niewielkie zmiany w „promotorze 5'”, w stosunku do consensus. Te ostatnie mogą wpływać na proces transkrypcji. Obecność oligo T wymagana zwykle dla terminacji transkrypcji została również potwierdzona. Gen tRNA^{Ser} nie zawiera intronów, a końcówka CCA występująca we wszystkich tRNA nie jest kodowana w genomie (Ryc. 4), [20].

Omawiając eukariotyczne tRNA o właściwościach supresorowych, warto wspomnieć, że tRNA^{Tyr} (antykodon GψA) muszki owocowej *Drosophilla melanogaster* zachowuje się jako naturalny supresor kodonu amber RNA wirusa mozaiki tytoniu, podczas gdy drugi izoakceptor mający antykodon QψA nie wykazuje takich właściwości [21]. Wykonano analizę sekwencji supresorowego tRNA^{Tyr} (Ryc. 5) i stwierdzono obecność zarówno Q jak i G w pierwszej pozycji antykodonu a także T obok U w pętli rybotymidyny [22]. Interesujące jest, że tRNA^{Tyr} wyodrębniony z jedwabnika ma taką samą sekwencję nukleotydową jak tRNA^{Tyr} *Drosophilla* (Ryc. 5) [23]. W *Drosophilla* nie stwierdzono obecności tRNA rozpoczynających kodon opal UGA w RNA β-globiny.

3. Roślinne tRNA o właściwościach supresorowych

RNA wirusa mozaiki tytoniu (TMV-RNA) może również ulegać transkrypcji w różnych systemach bezkomórkowych oraz oocytach (niezapłodnione komórki jajowe żaby afrykańskiej *Xenopus leavis*), dając z jednego

cistronu dwa duże białka, jedno o m.c.z. 126 000 oraz drugie o m.c.z. 183 000 mające w porównaniu z poprzednim dodatkowo 499 aminokwasów przy końcu karboksylowym. *In vivo*, ale nie *in vitro*, syntetyzowane jest białko



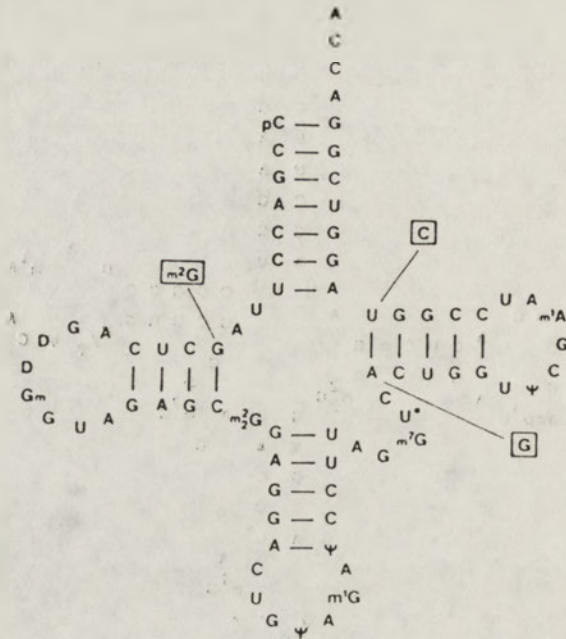
Ryc. 4. Sekwencja nukleotydomowa tRNA^{Tyr} muszki owocowej *Drosophila melanogaster* [22].

płaszczka o m.c.z. 17 000 [9]. Synteza obu ciężkich białek, najprawdopodobniej podjednostek replikazy, przebiega identycznie, z tym, że peptyd o większej m.c.z. powstaje w wyniku czytania kodonu stop (UAG).

Pelham [24] pokazał, że synteza dwóch białek, podjednostek wirusowej replikazy w liściach tytoniu zakażonych wirusem mozaiki tytoniu (TMV) rozpoczyna się w tym samym miejscu inicjacji oraz, że białko o wyższym ciężarze cząsteczkowym syntetyzowane jest w wyniku czytania kodonu amber.

Stwierdzono ponadto, że w obecności zwiększających się ilości drożdżowego supresorowego (UAG) tRNA, synteza *in vitro* białka o m.c.z. 183 000 D zwiększa się, a białka 126 000 D zmniejsza się. Podobny efekt obserwowano po dodaniu tRNA tytoniu, jednak tego interesującego spostrzeżenia nie związane wówczas z żadnym specyficznym tRNA [24]. Kilka lat później inni badacze potwierdzili wcześniejsze obserwacje i wyodrębnili specyficzny tRNA powodujący supresję kodonu amber oraz określili jego strukturę pierwszorzędową. Okazało się, że dwa cytoplazmatyczne tRNA^{Tyr} liści tytoniu stymulują syntezę białka 183 000 D w ekstrakcie

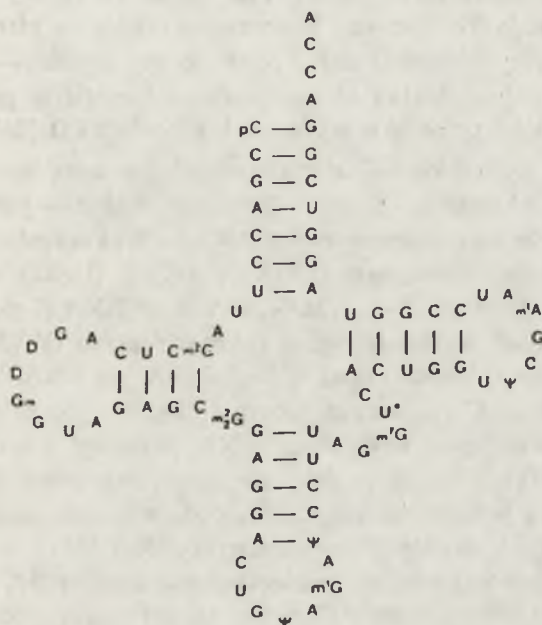
retikulocytów królika programowanych TMV-RNA [25]. Rezultat ten może wskazywać, że w tytoniu nie wykorzystywany jest kodon UAG jako sygnał stop lub też nieznanne czynniki strukturalne TMV-RNA faworyzują rozpoznanie kodonu UAG przez tyrozynowy tRNA. Na Ryc. 5 przedsta-



Ryc. 5. Sekwencja nukleotydomowa tRNA^{Tyr} liści tytoniu [25]. W ramkach pokazano nukleotydy występujące w tRNA^{Tyr}. Pochodna urydyny w pozycji 47 oznacza 3-(3-amino 3-karboksypropylo)urydynę (nukleozyd X).

wione są sekwencje dwóch cytoplazmatycznych tRNA^{Tyr} posiadających właściwości supresorowe [25]. Różnią się one dwoma nukleotydami w ramieniu rybotymidyny. Może to wskazywać, że przynajmniej dwa geny tRNA^{Tyr} tytoniu ulegają ekspresji. Izoakceptor tRNA^{Tyr} zawierający parę A-U w ramieniu rybotymidyny ma również niemodyfikowaną guanozynę w pozycji 10. Struktura antykodonu tRNA^{Tyr} rodzi pytanie w jaki sposób kodon UAG jest rozpoznawany i tworzy kompleks z antykodonem GψA. Tego typu oddziaływanie nie jest zgodne z hipotezą wahadła a także innymi propozycjami [25]. Obecnie nie znamy mechanizmu tego procesu, natomiast możliwe są pewne hipotezy [35]. W przeciwieństwie do innych eukariotycznych tRNA^{Tyr} [15], ten wyodrębniony z liści tytoniu nie zawiera nukleozydu, z którym przynajmniej częściowo wiązano specyficzność oddziaływania kodon-antykodon [21]. Powstaje zatem pytanie, jak wyglądają naturalne supresorowe tRNA w innych roślinach. Badania rozszerzono na zarodki pszenicy oraz łubin żółty. Stwierdzono, że zarodki pszenicy zawierają dwa specyficzne tRNA dla tyrozyny, ale tylko jeden z nich

wykazuje właściwości czytania kodonu amber [26]. Ryc. 6 przedstawia sekwencję nukleotydową tego tRNA. Sytuacja w zarodkach pszenicy jest inna niż w tytoniu. Główny izoakceptor w translacji u pszenicy, tRNA^{Tyr}_{QΨA} (85%) jest nieaktywny w procesie „readthrough”, podczas gdy tRNA^{Tyr}_{GΨA} (15%) jest efektywnym supresorem. Wynika z tego, że antykodon GΨA rozpoznaje tylko kodon tyrozyny tzn. guanozyna (z antykodonu GΨA) ma-



Ryc. 6. Sekwencja nukleotydowa tRNA^{Tyr} (antykonon GUA) zarodków pszenicy [26]. Drugi izoakceptor różni się tylko obecnością nukleozydu Q zamiast G w pierwszej pozycji antykodonu.

jąc możliwość występowania w konformacji syn tworzy wiązania wodorowe z guanozyną kodonu UAG ale nie z adenozyną kodonu UAA [15]. Stwierdzono np. że nie w pełni modyfikowane tRNA zawierające guanozynę zamiast queniny (Q) występują w różnych komórkach rakowatych. Przypuszczano, że tRNA nie zawierające nukleozydu Q są charakterystyczne dla komórek znajdujących się na niskim stopniu zróżnicowania [27, 28]. U roślin sytuacja nie jest jasna. W tytoniu, a także liściach pszenicy [26] nie znaleziono tRNA^{Tyr} z nukleozydem Q, natomiast w zarodkach pszenicy jest on głównym izoakceptorem. Może to mieć konsekwencje biologiczne. Rośliny w różnych okresach wzrostu mogą potrzebować takiego izoakceptora tRNA^{Tyr}, który jest bardziej uniwersalny w rozpoznawaniu kodu genetycznego. tRNA^{Tyr}_{GΨA} może czytać bez różnic oba kodony tyrozynowe UAU i UAC, natomiast tRNA^{Tyr}_{QΨA} zachowuje się inaczej ponieważ nukleozyd Q ma większe powinowactwo do U niż do C [29]. Ostatnio

okazało się, że tRNA zawierający zamiast Q, 6-tioqueninę (S^6Q) efektywnie rozpoznaje kodon UAG [36].

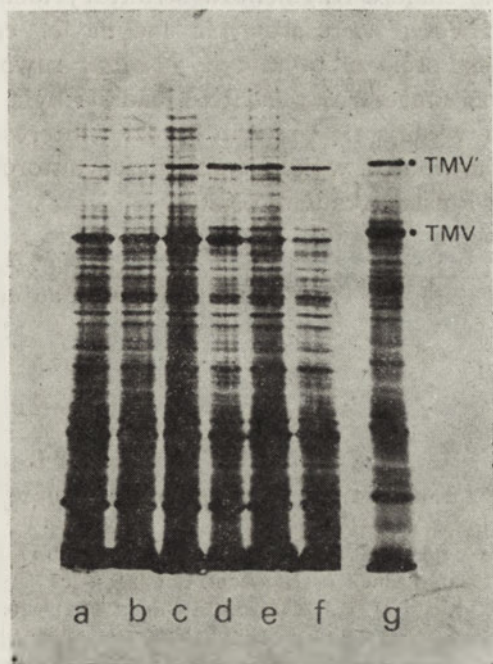
Translacja TMV-RNA w protoplastach tytoniu i lizatach retikulocytów królika zachodzi w podobny sposób, jeżeli rozważać stosunek powstających białek 126 i 183 kD. W systemie bezkomórkowym z zarodków pszenicy jest syntezowane tylko białko 126 kD, podczas gdy białko 183 kD występuje w minimalnych ilościach lub wcale. Ta raczej zaskakująca obserwacja, wskazuje, że systemy biosyntezy białka *in vitro* z roślin mają mniej cech wspólnych aniżeli układ retikulocyty królika — roślinne tRNA. Prowadząc biosyntezę białka w ekstrakcie z zarodków pszenicy w obecności tRNA $_{\text{Q}}^{\text{Tyr}}$ liści tytoniu otrzymano białko 183 kD [26].

Interesujące było również stwierdzenie, czy inny system biosyntezy białka *in vivo* — komórki jajowe *Xenopus laevis* — jest przydatny w badaniach właściwości supresorowych tRNA. Wykorzystano ten układ do poszukiwania supresorów opal (UGA) i amber (UAG) z nasion łubinu żółtego stosując jako matrycę TMV-RNA oraz RNA β -globiny [30]. Z otrzymanych danych wynikało, że w łubinie nie ma tRNA, który mógłby powodować supresję kodonu opal w β -globinowym RNA. Z drugiej strony wiadomo, że kodon UGA wirusa lucerny ulega supresji w ekstrakcie retikulocytów królika pod wpływem tRNA pszenicy i tytoniu, włączając glutaminę [7]. Wynika stąd, że fakt obecności supresora opal w roślinach wymaga dalszego potwierdzenia. Łubin podobnie jak inne badane rośliny zawiera tRNA $^{\text{Tyr}}$, który jest supresorem kodonu UAG w oocytach (Ryc. 7). Okazało się, że sekwencja nukleotydowa tego tRNA jest identyczna z sekwencją tRNA $_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ pszenicy (Ryc. 6). Drugi izoakceptor tRNA $^{\text{Tyr}}$ z łubinu zawiera nukleozyd Q [30]. Roślinne tRNA o właściwościach supresorowych mają kilka interesujących cech: nie zawierają rybotymidyny, zawierają nukleozyd 3-(3-amino 3-karboksypropylo)uridydyne, nukleozyd X w ramieniu dodatkowym (jest to pierwszy przypadek u eukariota), mają dwie pary G-C w ramieniu antykodonu. Ponadto sekwencje roślinnych tRNA $^{\text{Tyr}}$ wykazują pełną identyczność co w pełni potwierdza hipotezę o zachowawczości struktury roślinnych specyficznych tRNA [31].

Szereg kwestii w badaniach roślinnych supresorów pozostaje nadal niewyjaśnionych. Nieobecność nukleozydu Q w tRNA tytoniu jest niezwykle interesująca. Podczas analizy sekwencji tRNA $^{\text{Tyr}}$ tytoniu nie znaleziono nukleozydu Q, ale podczas chromatografii mieszaniny tRNA tytoniu na dwuhydroboryloaminoetylocelulozie (DBAE), wyodrębniono tRNA $^{\text{Tyr}}$ wykazujący duże powinowactwo do jonitu.

DBAE celuloza zawierająca grupy borylowe tworzy kompleks z ugrupowaniem cis-diolowym nukleozydu Q powodując zatrzymanie na kolumnie tRNA zawierających ten związek. Ważny jest także stosunek obu izoakceptorowych tRNA u roślin. Właściwości supresorowe mogą mieć zwią-

zek z procesami starzenia i funkcją enzymów modyfikujących oraz modyfikowanych nukleozydów w tym procesie.



Ryc. 7. Autoradiografia białek oocytów *Xenopus leavis* po dodaniu różnych ilości tRNA^{Tyr} lubinu w obecności TMV-RNA [30]. Pierwsze dwie ścieżki oznaczają kontrole H₂O oraz TMV-RNA. W dalszych doświadczeniach dodawano 1, 3, 10, 30 i 90 ng tRNA na oocyt i obserwowano odpowiednio 15, 12–25, 38 i 42% supresji [30].

4. Podsumowanie

Przedstawione w artykule dane wskazują na różnice w wykorzystywaniu kodonów terminujących UAA, UAG i UGA. Obecność kodonu UAA może oznaczać „zawsze stop”, natomiast kodony UAG i UGA mogą oznaczać „zwykle stop”. U Eukaryota najlepiej poznane są supresory opal u ssaków oraz supresor amber u roślin. U ssaków tRNA^{Ser} występują w minimalnych ilościach, podczas gdy roślinne supresory są to główne cytoplazmatyczne izoakceptorowe tRNA^{Tyr}. Być może wiąże się to z naturą kodu genetycznego. Ponieważ kodon UAG jest kodonem przepuszczającym (ang. leaky), potrzebne są być może większe ilości takiego tRNA aby uzyskać efekt podobny do wywoływanego przez minimalną ilość tRNA w stosunku do supresji kodonu opal, który nie jest leaky. Wspomnieliśmy także, że wyniki dotyczące roślinnych tRNA czytających kodon UGA są sprzeczne. Najprawdopodobniej o rozpoznaniu określonego kodonu decyduje jego otoczenie [32].

Jest oczywiste, że sekwencja mRNA β -globiny oraz wirusa alfalfa w rejonie kodonu UGA jest inna. W poznanych sekwencjach supresorowych tRNA nie udało się znaleźć fragmentów struktury identycznych i specyficznych dla właściwości supresorowych. Jediną ich cechą wspólną, ale nie specyficzną, jest brak rybotymidyny. Należy również podkreślić, że obecność roślinnych supresorowych tRNA badana była w testach in vivo i dlatego wyniki te wydają się być tym bardziej interesujące.

Prace tutaj omówione i wykonywane przez autorów były częściowo finansowane przez Polską Akademię Nauk.

Artykuł otrzymano 8 marca 1987
Zaakceptowano do druku 2 czerwca 1987

PISMIENICTWO

1. Körner A. M., Feinstein S. I., Altman S. (1978), w *Transfer RNA*, Wyd. S. Altman, MIT Press, 105—135.
2. Celis J. E., Piper P. W. (1981), *Trends Biochem. Sci.* 7, 11—13.
3. Hatfield D. (1985), *Trends in Biochem. Sci.* 201—204.
4. Hartman P. E., Roth J. R. (1973), *Adv. Genet.* 17, 1—105.
5. Glass R. E., Rene V., Hunter M. G. (1982), *Biochem. J.* 203, 1—13.
6. Geller A. I., Rich A. (1980), *Nature*, 283, 41—46.
7. Ryoji M., Heis K., Kaji A. (1983), *Trends Biochem. Sci.* 3, 88—90.
8. Weiner A. M., Weber K. (1971), *Nature New Biology* 234, 206—209.
9. Goelat P., Lomonosoff G. P., Butler P. J. G., Akam M. E., Gait M., Kern J. (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5818—5822.
10. Heckman J. E., Sarnoff J., Alzner-DeWeard B., Yin S., RajBhandary U. L. (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3164—3166.
11. Martin N. C., Pham N. D., Underbrink-Lyon K. (1980), *Nature*, 285, 579—581.
12. Martin R. P., Sibling A. P., Dirheimer G., de Henau S., Grosjean H. (1981), *Nature*, 292, 235—237.
13. Diamond A., Dudock D., Hatfield D. (1981), *Cell.* 25, 487—506.
14. Hirsh D. (1971), *J. Mol. Biol.* 58, 439—459.
15. Barciszewski J., Rafalski A. (1981), *Atlas of Transfer Ribonucleic Acids Sequences and Modified Nucleosides*, PWN, Warszawa.
16. Barciszewski J. (1982), *Post. Biochem.* 28, 395—399.
17. Hatfield D., Diamond A., Dudock B. (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6215—6219.
18. Sharp S. J., Stewart T. S. (1977), *Nucleic Acids Res.* 4, 2123—2136.
19. Mizutani T., Hashimoto A. (1984), *FEBS Letters* 169, 319—322.
20. Hatfield D., Dudock B., Eden F. C. (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 4940—4944.
21. Bienz M., Kubli E. (1981), *Nature* 294, 188—190.
22. Suter B., Altwegg M., Choffat Y., Kubli E. (1986), *Arch. Biochem. Biophys.* 247, 233—237.
23. Gross H. J., dane nie opublikowane.
24. Pelham H. R. B. (1978), *Nature* 272, 469—471.

25. Beier H., Barciszewska M., Krupp G., Mitnacht R., Gross H. J. (1984), *EMBO J.* **3**, 351—356.
26. Beier H., Barciszewska M., Sickinger H. D. (1984), *EMBO J.* **5**, 1091—1096.
27. Gündüz U., Katze J. R. (1984), *J. Biol. Chem.* **259**, 1110—1113.
28. Shindo-Okada H., Okada N., Ohgi I., Goto T., Nishimura S. (1980), *Biochemistry* **19**, 395—400.
29. Harada F., Nishimura S. (1972), *Biochemistry* **11**, 301—308.
30. Barciszewski J., Barciszewska M., Suter B., Kubli E. (1985), *Plant Science*, **40**, 193—196.
31. Barciszewski J., Joachimiak A., Rafalski A., Barciszewska M., Twardowski T., Wiewiórowski M. (1979), *FEBS Lett* **102**, 194—197.
32. Barciszewska M., Nalaskowska M., Barciszewski J. (1984), *Abstracts of 14th IUPAC Symposium on Chemistry of Natural Products*, July 9—14, 1984 Poznań, Poland, E—59.
33. Kohli J., Grosjean H. (1981), *Mol. Gen. Genet.* **182**, 430—439.
34. Kato N., Hoshino H., Harada F. (1983), *Biochem. Internat.* **7**, 635—645.
35. Beier H., Barciszewska M., Gross H. J. (1985), *Proc. 16th FEBS Meeting*, VNU Science Press, 259—269.
36. Shindo-Okada N., Akimoto H., Nomura H., Nishimura S. (1985), *Proc. Japan Acad.* **61**, 94—98.

1. The History of the ... 111

2. The ... 112

3. The ... 113

4. The ... 114

5. The ... 115

6. The ... 116

7. The ... 117

8. The ... 118

9. The ... 119

10. The ... 120

11. The ... 121

12. The ... 122

13. The ... 123

14. The ... 124

15. The ... 125

16. The ... 126

17. The ... 127

18. The ... 128

19. The ... 129

20. The ... 130

21. The ... 131

22. The ... 132

23. The ... 133

24. The ... 134

25. The ... 135

26. The ... 136

27. The ... 137

28. The ... 138

29. The ... 139

30. The ... 140

31. The ... 141

32. The ... 142

33. The ... 143

34. The ... 144

35. The ... 145

36. The ... 146

37. The ... 147

38. The ... 148

39. The ... 149

40. The ... 150

41. The ... 151

42. The ... 152

43. The ... 153

44. The ... 154

45. The ... 155

46. The ... 156

47. The ... 157

48. The ... 158

49. The ... 159

50. The ... 160

51. The ... 161

52. The ... 162

53. The ... 163

54. The ... 164

55. The ... 165

56. The ... 166

57. The ... 167

58. The ... 168

59. The ... 169

60. The ... 170

61. The ... 171

62. The ... 172

63. The ... 173

64. The ... 174

65. The ... 175

66. The ... 176

67. The ... 177

68. The ... 178

69. The ... 179

70. The ... 180

71. The ... 181

72. The ... 182

73. The ... 183

74. The ... 184

75. The ... 185

76. The ... 186

77. The ... 187

78. The ... 188

79. The ... 189

80. The ... 190

81. The ... 191

82. The ... 192

83. The ... 193

84. The ... 194

85. The ... 195

86. The ... 196

87. The ... 197

88. The ... 198

89. The ... 199

90. The ... 200

GRAŻYNA PŁAZA*

Zastosowanie fagów M13 w klonowaniu i sekwencjonowaniu DNA

M13 phages in cloning and sequencing of DNA

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Wektor M13 i jego pochodne
- III. Sekwencjonowanie wg metody Sangera i wsp.
- IV. Sekwencjonowanie długich fragmentów DNA
- V. Zakończenie

Contents

- I. Introduction
- II. M13 vector and its derivatives
- III. Sequencing by Sanger's dideoxy chain — termination method
- IV. Sequencing of long DNA fragments
- V. Conclusion

Wykaz stosowanych skrótów: pz — pary zasad, RF DNA — dwuniciowy DNA, SS DNA — jednoniciowy DNA, MCS — wielofunkcyjne miejsce klonowania, X — gal-5 bromo-4-chloro-3-indolo- β -D-galaktozyd, IPTG — izopropylogalaktozyd, ddNTP — dideoksy-nukleotydy

I. Wstęp

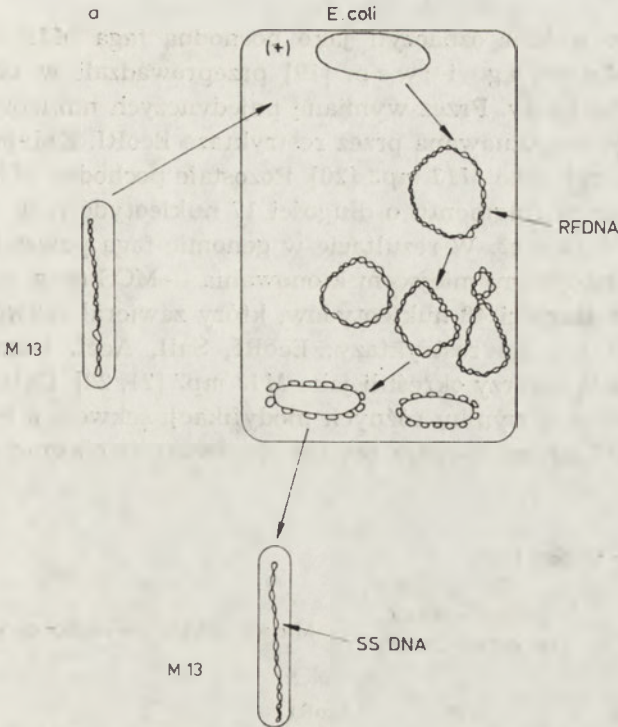
Fagi M13 są najczęściej stosowanymi wektorami w klonowaniu i sekwencjonowaniu DNA. Zarówno fag, jak i komórki jego gospodarza *E.coli* K12 są dobrze poznane pod względem genetycznym i biochemicznym [1—7]. Fagi M13 są łatwe do namnażania; z jednej hodowli płynnej o objętości 1 ml można otrzymać w ciągu 24 godzin około 5×10^{12} cząsteczek faga. Podczas wzrostu fagi te nie powodują lizy komórek gospodarza. Komórki zakażone fagiem rosną 2—3 razy wolniej niż komórki niezakażone, dając na podłożu stałym obraz „pseudolysinek” fagowych. Pseudolysinki są to miejsca występowania zakażonych fagiem komórek *E.coli*, nazwane tak

* Mgr, Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, ul. Wybrzeże Armii Czerwonej 15, 44-100 Gliwice

przez analogię do „łysinek” powstających po lizie komórek bakteryjnych. DNA faga *M13* występuje zarówno w postaci jednoniciowej (SS DNA — ang. single stranded DNA), która jest formą występującą w wirionie, jak i w postaci dwuniciowej, replikacyjnej (RF DNA — ang. replicative form), syntetyzowanej w komórkach gospodarza. Jednoniciowy DNA faga służy jako matryca do sekwencjonowania fragmentów DNA wg metody Sanger i wsp. [9], natomiast dwuniciowy DNA wykorzystuje się do klonowania obcego DNA przy pomocy różnych zestawów enzymów restrykcyjnych. Sposób izolowania DNA obu tych postaci jest względnie prosty: z 1 ml hodowli płynnej bakterii zakażonych fagiem otrzymujemy około 10 µg jednoniciowego DNA i około 1 µg dwuniciowego DNA [7, 8]. Do genomu faga *M13* użytego jako wektora można wprowadzać fragmenty DNA o długości rzędu 40 tys. nukleotydów [2]. Kształt otoczki białkowej nie ogranicza wielkości wprowadzanych do niej fragmentów DNA.

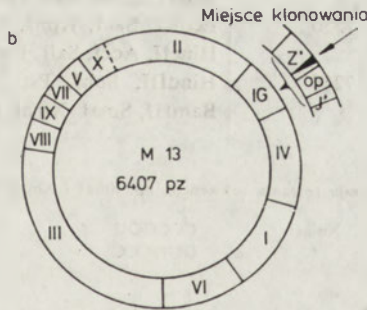
II. Wektor *M13* i jego pochodne

Fag *M13* należy do bakteriofagów Ff (ang. F-specific filamentous coliphages), [1, 6]. Wewnątrz osłonki białkowej znajduje się jednoniciowa, kolista cząsteczka DNA (nić „plus”) dobrze scharakteryzowana fizycznie i genetycznie [4—6, 10]. Genom faga typu dzikiego o długości 6407 nukleotydów zawiera 10 genów, których funkcje są znane. Geny: I, III, V, VI, VII, VIII, IX kontrolują syntezę białek wirionu, produkty białkowe genów V i X biorą udział w syntezie DNA infekcyjnego, białko kodowane przez gen II kontroluje replikację dwuniciowego DNA w komórce gospodarza [5, 11]. Proces infekcji rozpoczyna się od adsorpcji wirusa na powierzchni bakterii F' (komórki męskie zawierające czynnik płciowy F') za pośrednictwem rurkowatych struktur zwanych fimbriami lub pili. Mechanizm penetracji DNA wirusowego jest nieznan. Do komórki wnika infekcyjny, jednoniciowy DNA, a kapsyd pozostaje prawdopodobnie na powierzchni komórki. W początkowym etapie rozwoju wirusa w komórce gospodarza zachodzi synteza komplementarnej do infekcyjnej nici „plus” nici „minus” (synteza SS DNA → RF DNA). W komórce powstaje kolisty, dwuniciowy DNA faga (RF DNA). Następnym etapem jest synteza dalszych 200—300 kopii cząsteczek RF DNA (replikacja RF DNA → RF DNA), która przebiega zgodnie z mechanizmem „toczącego się koła” (ang. rolling — circle mechanism), [7, 16]. Inicjacja syntezy RF DNA rozpoczyna się przez nacięcie jednej z nici DNA przy udziale białka kodowanego przez gen II, z uwolnieniem końca 3'-OH. Miejsce to służy jako starter do syntezy nowego łańcucha DNA. Proces infekcji kończy się syntezą jednoniciowego DNA (RF DNA → SS DNA) oraz białek strukturalnych wirionu. Wirusy potomne wydostają się na zewnątrz komórki bakteryjnej nie powodując jej lizy (Ryc. 1a).



Ryc. 1a. Cykl życiowy faga M13 [7] SS DNA — jednoniciowy DNA; RF DNA — dwuniciowy DNA

W genomie faga M13 typu dzikiego znajdują się dwa regiony: jeden o długości 100 nukleotydów pomiędzy genami VIII i III, drugi o długości 508 nukleotydów pomiędzy genami IV i II, nie mające istotnego znaczenia dla jego funkcji życiowych. W region pomiędzy genami IV i II, Messing i wsp. [17—21] wprowadzili *in vitro* fragment operonu *lac* genomu *E. coli*. Fragment ten zawierał część genu represora, promotor, operator oraz sekwencję kodującą pierwsze 145 aminokwasów β -galaktozydazy Ryc. 1b.



Ryc. 1b. Mapa genetyczna faga M13 [17, 18] I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X — kolejne geny faga M13. Geny II i X są genami zachodzącymi na siebie. IG — (ang. „intergenic region”) — region nie mający istotnego znaczenia dla funkcji życiowych faga; O — operator *lac*, p — promotor *lac*, I' — część genu represora *lac*; Z' — α -region β -galaktozydazy.

Skonstruowany wektor oznaczyli jako pochodną faga *M13 mp1*. Dalsze modyfikacje Messing i wsp. [19] przeprowadzali w obrębie fragmentu β -galaktozydazy. Przez wymianę pojedynczych nukleotydów utworzyli sekwencję rozpoznawaną przez restryktazę *EcoRI*. Kolejną pochodną faga *M13* oznaczyli jako *M13 mp2* [20]. Pozostałe pochodne *M13 mp* otrzymali przez insercję fragmentu o długości 17 nukleotydów, w obszar genu *lac* pochodnej *M13 mp2*. W rezultacie w genomie faga powstał region nazywany wielofunkcyjnym miejscem klonowania — MCS (ang. multipurpose cloning site), o długości 48 nukleotydów, który zawierał sekwencje rozpoznawane przez kolejne restryktazy: *EcoRI*, *Sall*, *AccI*, *BamHI*, *HincII*, *PstI*. Pochodną tą autorzy określili jako *M13 mp7* [21, 22]. Dalsze pochodne *M13 mp* powstały w wyniku różnych modyfikacji sekwencji regionu MCS [17]. W tabeli 1 przedstawiono zestaw stosowanych obecnie pochodnych *M13 mp*.

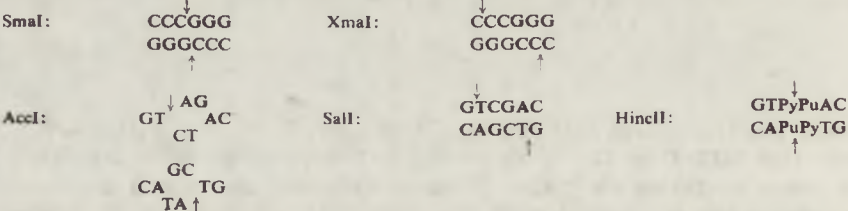
Tabela 1

Niektóre pochodne *M13mp* [7]

Pochodne <i>M13mp</i>	Długość wektora (w parach zasad)	Miejsca restrykcyjne służące do klonowania
<i>M13mp2</i>	7196	<i>EcoRI</i>
<i>M13mp5</i>	7196	<i>EcoRI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> <i>EcoRI</i> , <i>EcoRI</i>
<i>M13mp7</i>	7238	<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> , <i>Sall</i> , <i>AccI</i> , <i>HincII</i> , <i>PstI</i> , <i>HincII</i> <i>Sall</i> , <i>AccI</i> , <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i>
<i>M13mp8</i>	7229	<i>EcoRI</i> , <i>XmaI</i> , <i>SmaI</i> , <i>BamHI</i> , <i>Sall</i> , <i>AccI</i> , <i>HincII</i> , <i>PstI</i> , <i>HindIII</i>
<i>M13mp9</i>	7229	<i>HindIII</i> , <i>PstI</i> , <i>HincII</i> , <i>AccI</i> , <i>Sall</i> , <i>BamHI</i> , <i>SmaI</i> , <i>XmaI</i> , <i>EcoRI</i>
<i>M13mp10</i>	7244	<i>EcoRI</i> , <i>SacI</i> , <i>XmaI</i> , <i>SmaI</i> , <i>BamHI</i> , <i>XbaI</i> , <i>Sall</i> , <i>AccI</i> , <i>HincII</i> , <i>PstI</i> , <i>HindIII</i>
<i>M13mp11</i>	7244	<i>HindIII</i> , <i>PstI</i> , <i>HincII</i> , <i>AccI</i> , <i>Sall</i> , <i>XbaI</i> , <i>BamHI</i> , <i>SmaI</i> , <i>XmaI</i> , <i>SacI</i> , <i>EcoRI</i>
<i>M13mp18</i>	7250	<i>EcoRI</i> , <i>SacI</i> , <i>KpnI</i> , <i>XmaI</i> , <i>SmaI</i> , <i>BamHI</i> , <i>XbaI</i> , <i>HincII</i> , <i>AccI</i> , <i>Sall</i> , <i>PstI</i> , <i>SphI</i> , <i>HindIII</i>
<i>M13mp19</i>	7250	<i>HindIII</i> , <i>SphI</i> , <i>PstI</i> , <i>Sall</i> , <i>AccI</i> , <i>HincII</i> , <i>XbaI</i> , <i>BamHI</i> , <i>SmaI</i> , <i>XmaI</i> , <i>KpnI</i> , <i>SacI</i> , <i>EcoRI</i>

Uwaga:

Niektóre enzymy restrykcyjne rozpoznają tę samą sekwencję, np. *SmaI* i *XmaI*, *Sall* i *AccI* i *HincII*.



Pary wektorów *M13mp8* i *M13mp9*, *M13mp10* i *M13mp11*, *M13mp18* i *M13mp19* posiadają sekwencje rozpoznawane przez te same restryktazy ale ułożone w odwrotnej kolejności.

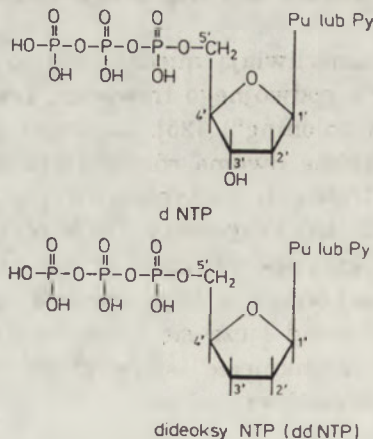
W przypadku wszystkich pochodnych *M13 mp* fragmenty obcego DNA są zawsze wprowadzane w fragment genu β -galaktozydazy. Umożliwia to w sposób prosty i szybki identyfikację fagów zawierających wbudowane fragmenty DNA [23]. Komórki biorcy *E.coli* K12 (np. bakterie oznaczone jako JM 101, 103, 105, 106, 107) mają nieczynny operon laktozowy w episomie F'. Operon ten jest zmutowany w promotorze represora *lac* i posiada delecję kilku nukleotydów w genie β -galaktozydazy [24]. Częsteczki β -galaktozydazy kodowane przez episom są nieaktywne enzymatycznie, w związku z tym niezainfekowane fagiem komórki *E.coli* K12 są *lac*⁻, w przeciwieństwie do komórek zakażonych, które są *lac*⁺. Aktywność enzymatyczna β -galaktozydazy wynika z komplementacji dwóch łańcuchów polipeptydowych zmutowanych genów: genu β -galaktozydazy regionu *lac* w genomie faga i genu β -galaktozydazy regionu *lac* w episomie F' (tzw. komplementacja wewnątrzstronowa). Połączenie dwóch łańcuchów polipeptydowych daje w efekcie jedną, czynną cząsteczkę enzymu. Aktywność enzymatyczną β -galaktozydazy można łatwo stwierdzić dodając do podłoża barwnika X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolo-D-galaktozyd) i induktora operonu *lac*-IPTG (izopropylotiogalaktozyd). Aktywna enzymatycznie β -galaktozydaza rozkłada X-gal do bromochlorindolu, który nadaje koloniom *E.coli* zabarwienie niebieskie. W przypadku wprowadzenia fragmentu obcego DNA w gen *lac Z* genomu faga następuje inaktywacja enzymu, w wyniku zaburzenia fazy odczytu aminokwasów. Wówczas X-gal nie jest rozkładany do bromochlorindolu i powstałe „pseudolysinki” zrekombinowanych fagów są białe.

Wykorzystanie zestawu fagów *M13* do klonowania i sekwencjonowania polega głównie na utworzeniu swego rodzaju „biblioteki” (kolekcji) fagów zawierających wbudowane i analizowane fragmenty obcego DNA. Fragmenty obcego DNA są najczęściej produktami trawienia różnymi restryktazami, nieswoistą DNazą lub degradacji ultradźwiękami (sonikacji) całych genomów [24].

Pochodne *M13 mp* umożliwiają między innymi klonowanie fragmentów DNA otrzymanych z podwójnego trawienia, tzw. „wymuszone klonowanie” — (ang. „forced cloning”) [25]. Zarówno wektor, jak i badany DNA trawi się równocześnie dwoma różnymi enzymami restrykcyjnymi. Najczęściej stosuje się trawienie enzymami tworzącymi lepkie końce, np. BamHI, EcoRI, HindIII itp. Fragmenty DNA otrzymane z podwójnego trawienia wykazują większą specyficzność w reakcji łączenia z wektorem niż fragmenty DNA pochodzące z pojedynczego trawienia. Na zasadzie komplementarności par zasad łączą się tylko cząsteczki wektora z fragmentami obcego DNA. „Zamknięcie” się wektora bez integracji z obcym DNA jest praktycznie niemożliwe.

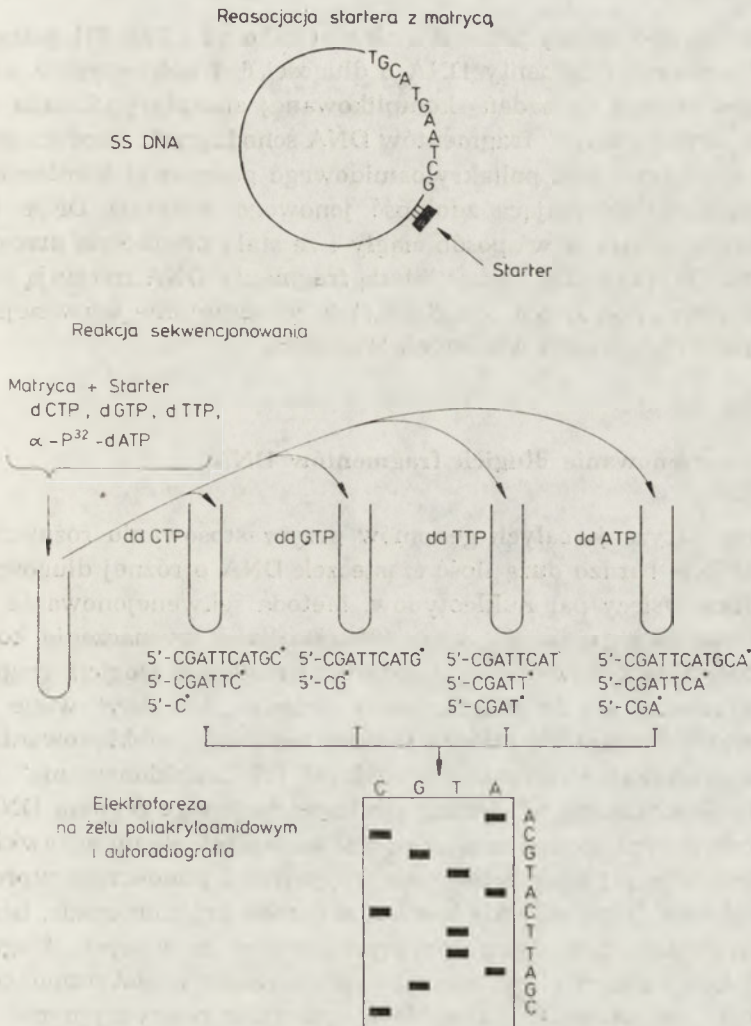
III. Sekwencjonowanie wg metody Sangera i wsp. [9]

Metoda sekwencjonowania opracowana przez Sangera i wsp. [9] polega na enzymatycznej syntezie znakowanych fosforem łańcuchów DNA komplementarnych wobec matrycy. Pierwszym etapem reakcji sekwencjonowania jest połączenie startera z matrycą. Starterem jest fragment DNA (oligonukleotydy) o takiej długości, która gwarantuje stabilne i specyficzne wiązanie z matrycą. Na ogół, w reakcjach sekwencjonowania stosuje się obecnie startery o długości 15 lub 17 nukleotydów, syntetyzowane chemicznie i rozprowadzane, między innymi, przez firmę BIOLABS. Startery takie zawierają kolejno sekwencje: 5'-TCCCAGTACGACGT-3', 5'-GTAAAACGGCCAGT-3'. Umożliwiają one sekwencjonowanie fragmentów DNA o różnej długości. Startery te, stosowane są w przypadku wszystkich pochodnych *M13 mp* i są komplementarne do określonej sekwencji genu *lac Z*, położonej w pobliżu miejsca insercji. Następnym etapem reakcji sekwencjonowania jest przygotowanie czterech mieszanin reakcyjnych, które zawierają kolejno: kompleks starter+matryca, trójfosfodezoksynukleotydy, z których jeden jest znakowany fosforem ^{32}P , jeden określony trójfosfodideoksynukleotydy i fragment Klenowa polimerazy DNA I (który to fragment nie wykazuje aktywności egzonukleolitycznej w kierunku 5'→3'). Enzym ten katalizuje elongację nowo syntetyzowanego łańcucha DNA, która przebiega od końca 3'-OH startera w kierunku 5'→3'. Dideoksynukleotydy spełniają w reakcji sekwencjonowania rolę inhibitorów elongacji łańcucha DNA. Brak grupy hydroksylowej przy węglu 3'dideoksynukleotydu uniemożliwia tworzenie następnego wiązania fosfodwuestrowego w reakcji syntezy łańcucha DNA (Ryc. 2). W mieszaninie reakcyjnej powstają dwuniciowe fragmenty DNA, o różnej długości, które na końcu 3' mają wbudowane w miejsce odpowiedniego dezoksynukleoty-



Ryc. 2. Wzory strukturalne dezoksynukleotydów i dideoksynukleotydów. Pu — puryna; Py — pirymidyna

du dideoksynukleotydu. Ważne jest, żeby w mieszaninie reakcyjnej była odpowiednio dobrana proporcja dideoksynukleotydu do dezoksynukleotydu. Właściwe proporcje ddNTP/dNTP umożliwiają syntezę odpowiedniej ilości łańcuchów DNA o wzrastającej długości. Po zakończeniu elongacji fragmenty DNA denaturuje się i rozdziela elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym. Do wyznaczenia kolejności nukleotydu w badanej sekwencji stosuje się autoradiografię. Położenie prążków na kliszy rentgenowskiej określa kolejność nukleotydu badanego regionu DNA (Ryc. 3). Ogólny schemat postępowania w sekwencjonowaniu opracowany przez



Ryc. 3. Sekwencjonowanie wg Sanger'a i wsp. [9, 46] ddCTP — dideoksytydynotrójfosforan; ddGTP — dideoksyguanozynotrójfosforan; ddTTP — dideoksytymidynotrójfosforan; ddATP — dideoksyadenozynotrójfosforan. Nukleotyd z kropką oznacza wbudowany w miejsce określonego dezoksynukleotydu dideoksynukleotyd.

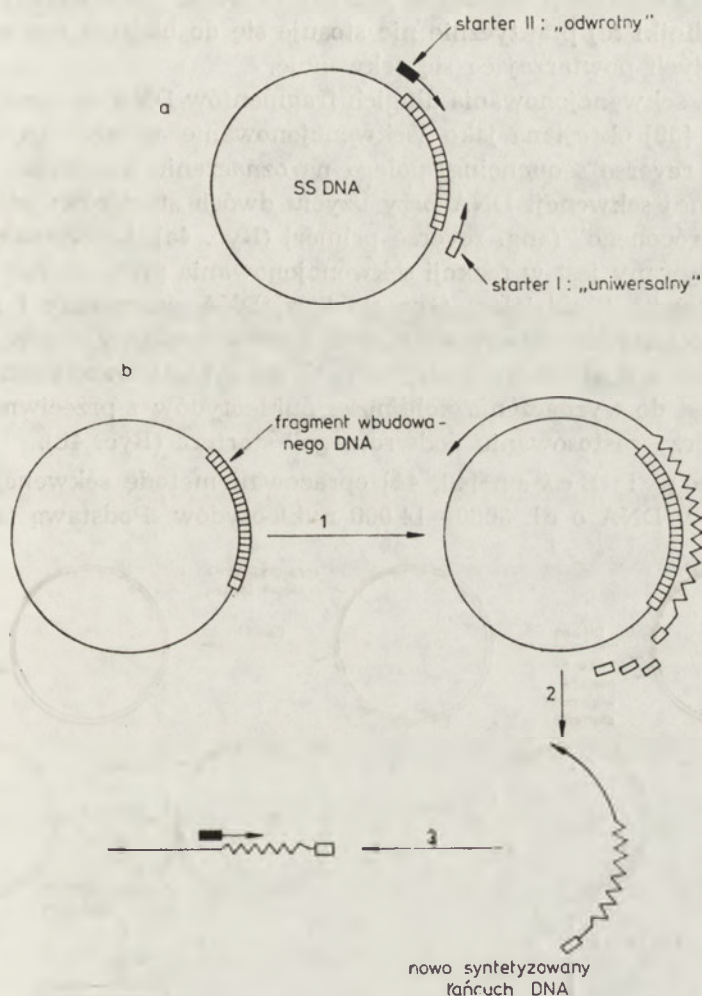
Sangera i wsp. i zwany potocznie metodą „dideoksy” jest prosty i szybki, nie wymaga użycia skomplikowanej aparatury, a przeciętna ilość nukleotydów odczytana w jednej reakcji jest rzędu 200—300. Do standardowej metody „dideoksy” wprowadza się obecnie różnego rodzaju modyfikacje umożliwiające jednorazowe sekwencjonowanie większych fragmentów DNA. Zastosowanie, np. gradientu buforu przy rozdzielach elektroforetycznych w połączeniu z użyciem dezoksynukleotydów znakowanych nie ^{32}P ale ^{35}S umożliwiły odczytanie na żelu o długości 50 cm sekwencji o 150—180 nukleotydów dłuższej w porównaniu z metodą standardową [26—29].

W metodzie opisanej przez Becka i Pöhla [30, 31] jednorazowo sekwencjonowano fragmenty DNA o długości 600 nukleotydów, ale kosztem wprowadzenia do badań skomplikowanej aparatury. Zasadą tej metody jest „wyłapywanie” fragmentów DNA schodzących z krótkiego, o długości od 6—20 cm, żelu poliakryloamidowego podczas elektroforezy przez odpowiednią bibułę mającą zdolność jonowego wiązania DNA. Podczas elektroforezy bibuła ta w sposób ciągły i ze stałą prędkością przesuwa się pod żelem. „Wyłapywane” przez bibułę fragmenty DNA znajdują się mniej więcej w równej od siebie odległości, tak że odczytanie sekwencji po autoradiografii nie sprawia większych trudności.

IV. Sekwencjonowanie długich fragmentów DNA

Fragmentaryzacja całych genomów przy zastosowaniu różnych metod daje w efekcie bardzo dużą ilość cząsteczek DNA o różnej długości, rzędu nawet kilku tysięcy par nukleotydów. Metoda sekwencjonowania opracowana przez Sangera i wsp. [9] umożliwia wyznaczenie kolejności około 600 nukleotydów. W celu sekwencjonowania długich fragmentów DNA wprowadza się do standardowej metody „dideoksy” wiele technik dodatkowych. Stosuje się między innymi technikę „subklonowania” losowego (ang. random subcloning procedure) lub „subklonowania” nielosowego (ang. nonrandom subcloning strategie) badanego regionu DNA [32—36]. Metoda przypadkowej analizy polega na wyizolowaniu wstawki z wektora, strawieniu jej enzymami restrykcyjnymi i ponownym wprowadzeniu do wektora. Otrzymujemy losowo, w bardzo krótkim czasie, bez skomplikowanych zabiegów laboratoryjnych, wiele mniejszych fragmentów DNA. Niektóre z nich mogą być sekwencjonowane wielokrotnie, co wynika z faktu „zachodzenia” na siebie fragmentów restrykcyjnych. Metody „nieprzypadkowego” sekwencjonowania DNA są bardziej kłopotliwe: wymagają użycia wyszukanych endonukleaz i bardziej skomplikowanych manipulacji technicznych. Metody te jednocześnie eliminują wielokrotną analizę regionów DNA już sekwencjonowanych.

Jedną z technik „nieprzypadkowego” sekwencjonowania długich fragmentów DNA polega na tworzeniu, przy pomocy egzonukleazy BAL-31, wielu progresywnych delecji w badanym regionie DNA [37]. Enzym ten trawi liniowy DNA usuwając w ciągu minuty 100—200 nukleotydów. Wydłużając stopniowo czas trawienia enzymem uzyskuje się zbiór fragmentów o stopniowo zmniejszającej się długości. Fragmenty te są rozdzielane elektroforetycznie, a następnie izolowane z żelu i powtórnie wprowadzane



Ryc. 1a. Ogólny schemat sekwencjonowania długich fragmentów DNA wg Honga [40]

b. Sekwencjonowanie z udziałem drugiego startera (ang. „reverse primer”):

1. Reasocjacja „uniwersalnego” startera z matrycą. Synteza nowej matrycy przy udziale DNA polimerazy I i czterech dezoksynukleotydów.

2. Uwolnienie nowo syntetyzowanej matrycy.

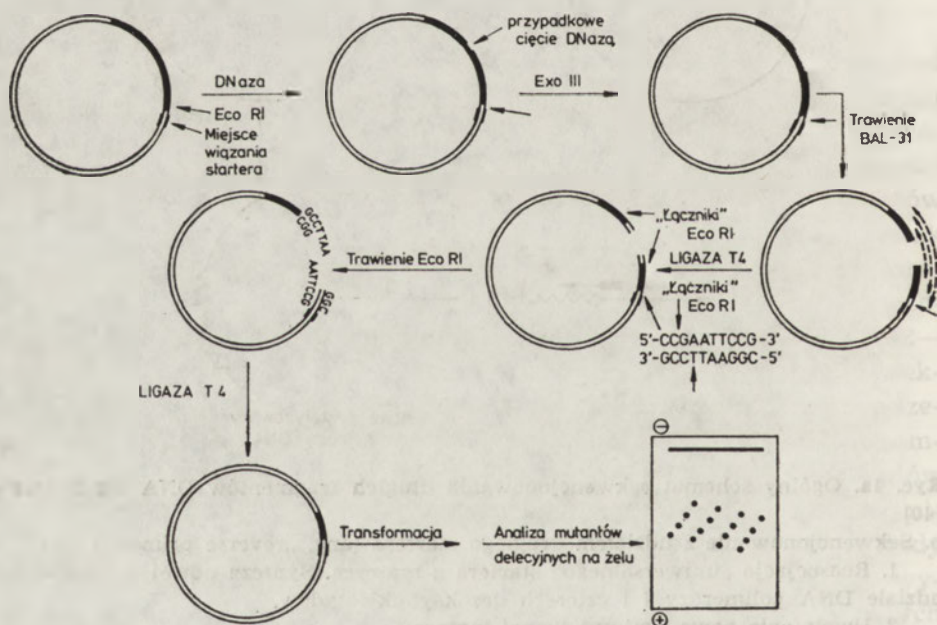
3. Reasocjacja drugiego startera „odwrotnego” z nową matrycą. Reakcja sekwencjonowania przebiega z przeciwnego końca wbudowanego fragmentu DNA.

do wektora. Analiza sekwencyjna pojedynczych fragmentów DNA umożliwia ustalenie kolejności nukleotydów w całej badanej sekwencji.

Sekwencjonowanie długich fragmentów DNA może się także odbywać przy udziale tzw. „wewnętrznych starterów” [38]. Technika ta polega na wykorzystaniu fragmentów restrykcyjnych badanego regionu DNA jako starterów sekwencjonowania. Startery te są komplementarne wobec różnych miejsc badanej sekwencji. W celu wyznaczenia kolejności nukleotydów całej sekwencji niezbędne jest użycie wielu „wewnętrznych starterów”. Techniki tej praktycznie nie stosuje się do badania regionów DNA zawierających powtarzające się sekwencje.

Metoda sekwencjonowania długich fragmentów DNA opracowana przez H o n g a [39] określana jako „sekwencjonowanie w odwrotnym kierunku” (ang. reverse sequencing) polega na oznaczeniu kolejności nukleotydów badanej sekwencji DNA przy użyciu dwóch starterów: uniwersalnego i „odwrotnego” (ang. reverse primer) (Ryc. 4a). Uniwersalny starter wykorzystywany jest w reakcji sekwencjonowania prowadzonej z jednego końca wstawki. Z udziałem tego startera, DNA polimerazy I i czterech dezoksynukleotydów powstaje łańcuch komplementarny wobec oryginalnej sekwencji („odwrotna matryca”). Nowo syntetyzowana matryca potrzebna jest do wyznaczenia kolejności nukleotydów z przeciwnego końca wstawki przy zastosowaniu „odwrotnego” startera (Ryc. 4b).

B a r n e s i B e v a n [40, 41] opracowali metodę sekwencjonowania fragmentów DNA o dł. 3000—14 000 nukleotydów. Podstawą tej metody



Ryc. 5. Schemat sekwencjonowania długich łańcuchów DNA wg metody Barnes i Bevana [41, 42].

jest tworzenie wielu jednokierunkowych delecji we wbudowanym fragmencie obcego DNA. Badany rejon trawi się wstępnie w sposób przypadkowy przez kolejne enzymy: DN-azę, egzonukleazę III, egzonukleazę BAL-31. Enzym BAL-31 tworzy tępe końce umożliwiające przyłączenie przy udziale ligazy faga T4 łączników oligonukleotydowych zawierających sekwencję rozpoznawaną, np. przez enzym EcoRI. Enzym ten rozpoznaje sekwencję w pobliżu miejsca wiązania startera. Po cięciu EcoRI powstają jednokierunkowe delecje zaczynające się z określonego miejsca rozpoznawanego przez „unikalny” enzym restrykcyjny. Zamknięcie wektora ze zmniejszoną wstawką następuje przy udziale ligazy faga T4. Wielkość delecji określa się porównując ruchliwość elektroforetyczną całych fagów (Ryc. 5).

V. Zakończenie

Opracowanie szybkich i względnie prostych metod klonowania i sekwencjonowania DNA umożliwia ustalenie struktury pierwszorzędowej wielu genów strukturalnych, plazmidów, bakteriofagów, wirusów onkogennych [42—44]. W artykule starano się przedstawić jedną z najczęściej stosowanych, tzw. szybkich metod klonowania i sekwencjonowania DNA przy użyciu fagów M13. Stosując liczne modyfikacje praktycznie rzecz biorąc, w ciągu jednego dnia można oznaczyć sekwencję DNA o długości kilku tysięcy par nukleotydów.

Artykuł otrzymano 9 kwietnia 1987 r.
Zaakceptowano do druku 30 kwietnia 1987 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Wezenbeek P. M. G. F., Hulsebos T. J. M., Schoenmakers G. G., (1980), *Gene*, **11**, 129—148.
2. Zinder N. D., Boeke J. D., (1982), *Gene*, **19**, 1—10.
3. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. (1985), *Gene*, **33**, 103—119.
4. Horiuchi K., Yovis G. F., Model P., (1978), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 113—137.
5. Zinder N. D., Horiuchi K., (1985), *Microbiol. Reviews*, **49**, 101—106.
6. Peeters B. P. H., Peters R. M., Schoenmakers J. G. G., Konings R. N. H., (1985), *J. Molec. Biol.*, **181**, 27—39.
7. Messing J., (1983), w: *Methods Enzymology*, red. Wu R., Grossman L., Moldave K., t. 101C, str. 20—79, Academic Press, New York, London.
8. Schreir P. H., Cortese R., (1979), *J. Mol. Biol.*, **129**, 16—172.
9. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463—5467.
10. Hondel C. A., Pennings L., Schoenmakers J. G. G., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **68**, 55—70.

11. Meyer T. F., Geider K., (1978), *J. Biol. Chem.*, **254**, 12636—12641.
12. Lin T. C., Webster R. E., Konigsberg W., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10331—10337.
13. Simons G. F. M., Konings R. N. H., Schoenmakers J. G. G., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4194—4198.
14. Model P., McGill C., Fulford W. D., (1982), *Cell*, **29**, 329—335.
15. Dotto G. P., Horiuchi K., Zinder N. D., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7122—7126.
16. Baas P. D., (1985), *Bioch. et Bioph. Acta*, **825**, 111—139.
17. Messing J., Gronenborn B., Müller-Hill B., Hofschneider P. H., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3642—3646.
18. Gronenborn B., Messing J., (1978), *Nature*, **272**, 357—377.
19. Messing J., (1978), *Recomb. DNA Techn. Bulletin*, **2**, 43—48.
20. Messing J., Crea R., Seeburg P. H., (1981), *Nucl. Acids Res.*, **9**, 309—321.
21. Messing J., (1981), w: In the Third Cleveland Symposium on Macromolecules: Recombinant DNA, Ed. A. Walton, Elsevier, Amsterdam, 142—153.
22. Rothstein R., Wu R., (1981), *Gene*, **15**, 167—176.
23. Hindley J., (1983), DNA Sequencing, red. Work T. S., Burdon R. H., str. 121—221, Academic Press, Amsterdam, New York, Oxford.
24. Anderson S., (1981), *Nucl. Acids Res.*, **9**, 3015—3027.
25. Messing J., Vieira J., (1982), *Gene*, **19**, 269—276.
26. Sanger F., Coulson A. R., (1978), *FEBS Lett.*, **87**, 107—110.
27. Ansorge W., Barker R., (1984), *J. Biochem. Biophys. Methods*, **9**, 33—47.
28. Chen E. Y., Seeburg P. H., (1985), *Gene* **4**, 165—170.
29. Biggin M. D., Gibson T. J., Hong G. F., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3963—3965.
30. Beck S., Pohl F. M., (1984), *EMBO J.*, **3**, 2905—2909.
31. Wilde D., (1985), *Essays Biochem.*, **2**, 124—126.
32. Deininger P. L., (1983), *Anal. Biochem.*, **129**, 216—223.
33. Langhorn A., Scott M. P., (1984), *Nature*, **30**, 25—31.
34. Lin H. Ch., Lei S. P., Wilcox G., (1985), *Anal. Biochem.*, **147**, 114—119.
35. Guo L. H., Wu R., (1982), *Nucl. Acids Res.*, **10**, 2065—2994.
36. Guo L. H., Yang E. C. A., Wu R., (1983), *Nucl. Acids Res.*, **11**, 5521—5540.
37. Poncz M., Solowiejczyk D., Ballantine M., Schwartz E., Surrey S., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4298—4302.
38. Hindley J., Phear G. A., (1981), *Biochem. J.*, **198**, 813—823.
39. Hong G. F., (1981), *Biosci. Reports*, **1**, 246—252.
40. Barnes W. M., Bevan M., Son P. H., (1983), w: Methods Enzymology, red. Wu R., Grossman L., Moldave K., t. 101C, str. 98—123, Academic Press, New York, London.
41. Barnes W. M., Bevan M., (1983), *Nucl. Acids Res.*, **11**, 349—368.
42. Sanger F., Coulson A. R., Hong G. F., Hill D. F., Petersen G. B., (1982), *J. Mol. Biol.*, **162**, 729—773.
43. Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., Bruijn M. H. L., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. G., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J., Staden E., Young I. G., (1983), *Nature*, **290**, 457—465.
44. Baer R., Bankier A. T., Biggin M. D., Deininger P. L., Farrell P. J., Gibson T. J., Hatfull G., Hudson G. S., Satchwell S. G., Seguin G., Tuffnel P. S., Barrell B. G., (1984), *Nature* **310**, 207—211.
45. M13 cloning and sequencing handbook, (1983), Amersham International plc. Amersham UK.

ZBIGNIEW PIETRZKOWSKI*

Cytoskielet a mitogenne działanie czynników wzrostowych

Cytoskeleton and mitogenic action of growth factors

Spis treści:

- I. Wstęp — udział zmian cytoskieletu w aktywności podziałowej komórek
- II. Budowa cytoskieletu i jego znaczenie
 - II-1. Mikrotubule
 - II-2. Mikrofilamenty
 - II-3. Filamenty pośrednie
- III. Działanie czynników wzrostowych na morfologię komórek
- IV. Wpływ czynników wzrostowych na aktywność ruchową komórek
- V. Sposoby oddziaływania czynników wzrostowych na reorganizację cytoskieletu

Contents

- I. Introduction — participation of cytoskeleton changes in cell division activity
- II. Cytoskeleton structure and its significance
 - II-1. Microtubules
 - II-2. Microfilaments
 - II-3. Intermediate filaments
- III. Effects of growth factors on cell morphology
- IV. Effects of growth factors on cell motility
- V. Modes of action of growth factors on cytoskeleton reorganization

Wykaz stosowanych skrótów: EGF — epidermalny czynnik wzrostowy, FGF — fibroblastyczny czynnik wzrostowy, NGF — nerwowy czynnik wzrostowy, PDGF — czynnik wzrostowy pochodzący z płytek krwi, RDGF — czynnik wzrostowy pochodzący z siatkówki, pH_i — cytoplazmatyczne pH, Ca²⁺ — cytoplazmatyczne stężenie jonów Ca²⁺, MAP1 — ang. microtubule associated protein 1, MAP2 — ang. microtubule associated protein 2, komórki PC 12 — komórki guza chromochłonnego

I. Wstęp — udział zmian cytoskieletu w aktywności podziałowej komórek

Mechanizm aktywacji syntezy DNA i podziału komórek prawidłowych od wielu lat jest przedmiotem intensywnej badań. Dotyczą one zarówno metabolizmu komórek jak i występujących w tym okresie zmian organizacji cytoskieletu. Zmiany te mają wpływ na adhezję i rozplaszczanie ko-

* Mgr, Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. Jana Zyrzyckiego, Uniwersytet Jagielloński, al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

mórek prawidłowych *in vitro* na podłożu stałym, morfologię (kształt oraz architekturę powierzchni), migrację (tzn. ukierunkowaną aktywność ruchową komórki), bezkierunkową aktywność ruchową (tzn. aktywność ruchową, która nie zmienia położenia geometrycznego centrum komórki) [1], podział komórki [2—8], a także rozmieszczenie receptorów błonowych [9—11]. Na czasową zbieżność obu procesów, aktywacji syntezy DNA i reorganizacji cytoszkieletu wskazywały wcześniejsze badania, w których stwierdzono, że:

— wzrost komórek prawidłowych zależy od przyłączenia i rozplaszczania na podłożu stałym [12, 13], a ograniczanie rozplaszczania tych komórek poprzez modyfikację adhezywności podłoża prowadzi do zahamowania syntezy DNA, RNA i białek [14—19],

— zwiększenie liczby komórek w populacji powoduje wzrost częstotliwości wzajemnych kontaktów między komórkami, co hamuje ich migrację [20, 21],

— w hodowli jednowarstwowej jest zahamowana zarówno migracja jak i proliferacja komórek [22—25], dalsze podziały mogą wystąpić po udostępnieniu wolnej powierzchni do migracji [26—28] lub po dodaniu do środowiska komórek np. insuliny [29] względnie trypsyny [28, 30, 31],

— komórki zahamowane kontaktowo zatrzymane są w fazie G1 cyklu komórkowego [32—34] (dzisiaj przyjmuje się, że komórki te opuszczają cykl komórkowy w drugiej połowie fazy G1 przechodząc do fazy G0 [35]),

— rozpoczęciu migracji komórek towarzyszy wzrost aktywności podziałowej [36], podobnie jak podczas migracji komórek z eksplantatów tkanek [37, 38].

Wykazano czasową zbieżność aktywności podziałowej z aktywnością ruchową komórki, co stało się przedmiotem wielostronnych badań. Między innymi, zmiernają one do poznania przyczyn i skutków dynamicznych zmian w metabolizmie i strukturze cytoszkieletu zachodzących pod wpływem działania czynników wzrostowych oraz do ustalenia charakteru zależności między reorganizacją cytoszkieletu a aktywacją syntezy DNA. Badania te dotyczą budowy czynników wzrostowych, drogi ich oddziaływania na błonę, mechanizmu przetworzenia sygnału, metabolizmu komórki, znaczenia zmian w organizacji elementów cytoszkieletu [39].

Dotychczas opisano wiele efektów działania czynników wzrostowych, które poprzedzają indukcję syntezy DNA. Dwa z nich wydają się być szczególnie ważne ze względu na szybkość działania oraz ich powszechność. Są to: zwiększenie stężenia jonów wapnia w cytoplazmie oraz alkaliczacja cytoplazmy. Znaczenie jonów wapniowych w regulacji metabolizmu i proliferacji komórek od wielu lat jest przedmiotem intensywnych badań, bowiem jon Ca^{2+} jest czynnikiem regulującym przebieg wielu procesów komórkowych [40—42] i aktywność wielu enzymów [43, 44]. Tu przedstawiono dane wskazujące na to, że obserwowane pod wpływem czynników

wzrostowych zmiany morfologii i aktywności ruchowej komórek są wynikiem zwiększenia cytoplazmatycznego stężenia jonu Ca^{2+} oraz alkalizacji cytoplazmy.

II. Budowa i znaczenie cytoszkieletu

II-1. Mikrotubule

Wyniki biochemicznych i ultrastrukturalnych badań ujawniły obecność trzech typów struktur włóknistych w komórce: mikrotubul, mikrofilamentów i filamentów pośrednich, które razem tworzą trójwymiarowy cytoszkielet.

Mikrotubule są zbudowane z alfa i beta tubuliny oraz białek towarzyszących o charakterze regulatorowym: MAP1, MAP2, białka Tau [45]. Dimery alfa i beta tubuliny w procesie polimeryzacji tworzą mikrotubule. Białko MAP2 po fosforylacji przez kinazę zależną od cAMP [46] uczestniczy we wzajemnym oddziaływaniu mikrotubul z mikrofilamentami [47, 48]. Oddziaływania te nadają ciału komórek pewną sprężystość i kształt [49—53]. Natomiast białko Tau uczestniczy w regulacji polimeryzacji tubuliny przy udziale kompleksu kalmodulina-Ca [40, 54] i swoistej kinazy [55]. Zewnętrzna średnica mikrotubul wynosi 24 nm, a ich długość może wynosić 50 μm [56, 57]. Jak stwierdzono przy użyciu technik immunofluorescencyjnych [58—60] oraz przeciwciał monoklonalnych specyficznych dla tubuliny [61, 62], mikrotubule tworzą w komórce przestrzenną sieć, która jest strukturą ulegającą reorganizacji w zależności od stanu fizjologicznego komórki, czynników środowiska, charakterystyki kontaktu z podłożem. Mikrotubule spełniają ważną funkcję w formowaniu i stabilizacji miejsc kontaktu komórki z inną powierzchnią [63, 64]. Poza tym odgrywają one dużą rolę w orientacji i stabilizacji całego cytoszkieletu [59, 64] oraz migracji komórek [65]. Mogą być połączone z białkami błony jądra komórkowego [61], mitochondriów [66] oraz błony komórkowej [67]. W czasie podziałów komórek uczestniczą w regulacji ruchu chromosomów [68].

II-2. Mikrofilamenty

Mikrofilamenty często określa się jako filamenty cienkie ze względu na ich średnicę wynoszącą 6 nm. Ich składnikiem jest F-aktyna będąca polimerem globularnego białka, G-aktyny. Na stan organizacji aktyny ma wpływ wiele białek o charakterze regulatorowym [69]. W kontrolowaniu procesu polimeryzacji G-aktyny bierze udział profilina i inne białka [70, 71]. Żelzolina [72], fragmina [73], wilina [74] to białka ograniczające długość filamentów aktynowych i wpływające na szybkość polimeryzacji G-aktyny. Białka te przyczepiają się do rosnącego końca filamentu akty-

nowego i blokują przyłączanie kolejnych monomerów G-aktyny. Uczestniczą w procesie skracania filamentów aktynowych oraz w inicjacji polimeryzacji G-aktyny [75—77]. Połączenie mikrofilamentów z żelazoliną, fragminą, wiliną i kalmoduliną zmienia stopień żelifikacji cytoplazmy, co jest ważne dla prawidłowego przebiegu określonych procesów komórkowych [78]. Białka wiążące filanty aktynowe (fimbryna, alfa-aktynina, filamina) inicjują powstawanie różnych układów przestrzennych tych struktur [74]. Może to być izotropowa sieć filamentów aktynowych, jak ma to miejsce w lamelipodium i filopodium [79] lub równoległy układ filamentów [80]. Połączenia mikrofilamentów z taliną [81] lub winkuliną [82, 83] mają wpływ na powstawanie połączeń filamentów aktynowych z białkami błony komórkowej [84]. Filaminie przypisuje się też udział w procesie wysuwania pseudopodiów [85, 86]. Jest to białko obecne we wszystkich komórkach; występuje na obrzeżu komórki oraz we włóknach naprężeniowych. Homologi tego białka wyizolowane z płytek krwi oraz z makroflagów mogą zmieniać reologiczne właściwości cytoplazmy [87, 88]. Oddziaływanie z aktyną większości wymienionych białek jest zależne od stężenia jonu Ca^{2+} w cytoplazmie [89—95]. Na skutek oddziaływania F-aktyny z miozyną [96], tropomiozyną [97], alfa-aktyniną [98] i filaminą [99] powstają funkcjonalne włókna aktomiozynowe odpowiedzialne za cytomechaniczne własności cytoszkieletu [100]. Wykazano także istnienie połączeń mikrofilamentów z mikrotubulami [101] i filamentami pośrednimi [102].

II-3. Filamenty pośrednie

Średnica filamentów pośrednich wynosi 7—11 nm. Obecnie wyróżnia się 5 klas filamentów pośrednich:

— filanty wimentynowe — homopolimer wimentyny występujący w komórkach tkanek mezynchymalnych [103—105],

— filanty glejowe zbudowane z kwaśnego białka o masie 51 000, występujące w komórkach glejowych, astrocytach ale nieobecne w neuronach [106],

— filanty desminowe zbudowane z desminy i występujące w komórkach mięśniowych [107, 108],

— neurofilanty — heteropolimery trzech białek o masie 68 000, 145 000, 2 000 000, występują w neuronach [109, 110],

— filanty keratynowe zbudowane z 20-stu białek o masie 40 000—7000 [103]. Występują w komórkach naskórka. Powstają w tym samym czasie co desmosomy [111].

Filanty pośrednie tworzą połączenia z białkami błony jądrowej [112] i mitochondriów [113], polirybosomami i elementami aparatu translacyjnego [114], błoną komórkową [115], elementami strukturalnymi desmosomów [111], mikrotubulami [116].

III. Działanie czynników wzrostowych na morfologię komórek

W powstawaniu miejsc kontaktu komórki z podłożem biorą udział integralne białka błony oraz między innymi F-aktyna i białka regulatorowe mikrofilamentów, spośród których szczególne znaczenie ma winkulina, która może być substratem kinazy C [117]. Jak stwierdzono, w pierwszych trzech minutach działania PDGF następuje przemieszczenie winkuliny do cytoplazmy podstawowej i rozpoczyna się proces reorganizacji cytoszkieletu [118]. W miejscach kontaktu z podłożem powoduje to zanik połączeń filamentów aktynowych z błoną, a w konsekwencji reorganizację cytoszkieletu, zmianę kształtu komórki oraz zwiększenie ilości winkuliny w cytoplazmie podstawowej [118]. Natomiast nie obserwowano podobnych zmian, gdy na te komórki działano EGF, insuliną czy somatomedyną C. Takie same rezultaty działania PDGF uzyskano w komórkach Swiss 3T3 i ludzkich diploidalnych komórkach glejowych [119, 120]. Jednocześnie wykazano, że przemieszczanie winkuliny do cytoplazmy podstawowej i synteza DNA mogą zachodzić w tym samym czasie [121].

Jak wcześniej wspomniano, zmniejszenie liczby połączeń między białkami błony a mikrofilamentami prowadzi do zaniku miejsc kontaktu z podłożem, szczególnie w obrębie lamelipodiów, które tworzą wtedy fałdy przemieszczające się poprzez całą powierzchnię komórki [122—124]. Innymi, często opisywanymi efektami działania czynników wzrostowych na morfologię komórek są zmiany w ilości i wielkości mikrowypustek na powierzchni, co wykazano przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronicznej [122—126].

IV. Wpływ czynników wzrostowych na aktywność ruchową komórek

Strukturalne zmiany cytoszkieletu wywołane działaniem czynników wzrostowych obejmują również reorganizację filamentów aktomiozynowych [120]. W wielu pracach wykazano, iż poszczególne czynniki wzrostowe w różnym stopniu stymulują migrację komórek. EGF i RDGF zwiększają szybkość migracji komórek śródbłonka [127, 128] oraz komórek RIE-1 [129]. Natomiast PDGF aktywuje migrację komórek mięśni gładkich [130, 131], fibroblastów [132] i monocytów [133]. EGF zwiększa szybkość migracji komórek Swiss 3T3 z 2 do 30 $\mu\text{m}/\text{h}$ [134] oraz obrót ATP [135]. Te wyniki potwierdzają wcześniejsze dane o sprzężeniu syntezy DNA z aktywnością ruchową, jakie uzyskano w badaniach wpływu surowicy na aktywność podziałową komórek prawidłowych i ich migrację [20, 136—139], surowicznych czynników stymulujących proliferację [140] i EGF [141.] Stwierdzono wtedy, że zwiększeniu szybkości migracji komórek towarzyszy wzrost aktywności podziałowej.

Aktywność ruchowa komórek jest wynikiem funkcjonowania włókien aktomiozynowych [142]. Z ich cytomechanicznymi właściwościami wiąże

się duże zapotrzebowanie na energię. W czasie skurczu jest ona dostarczana z reakcji hydrolizy ATP przez ATP-azę aktomiozynową [143—147]. Zwiększona aktywność ATP-zowa filamentów aktomiozynowych obniża stosunek ATP/ADP, a tym samym pobudza metabolizm energetyczny komórki [25, 146, 147].

Stwierdzono, że podczas migracji fibroblasty zarodka kurczenia oddychają intensywniej niż niemigrujące [148]. Zwiększona aktywność ruchu komórek jest sprzężona z aktywacją metabolizmu energetycznego [25, 149, 150]. Co więcej aktywacja procesów energetycznych komórki może prowadzić do zwiększenia puli pośredników metabolicznych potrzebnych do syntezy DNA [149, 150].

V. Drogi oddziaływania czynników wzrostowych na reorganizację cytoszkieletu

Czynniki mające wpływ na reorganizację cytoszkieletu oddziałują na te procesy komórkowe, które przebiegają z udziałem struktur włóknistych. Do takich czynników m.in. należą: zmiana cytoplazmatycznego stężenia jonu Ca^{2+} oraz, w mniejszym stopniu, alkalizacja cytoplazmy. Zmiana tych parametrów jest wynikiem m.in. działania czynników wzrostowych. Zwiększenie cytoplazmatycznego stężenia jonów Ca^{2+} występuje w pierwszych 10 sekundach działania czynników wzrostowych [151], a maksymalne podwyższenie pH_i ma miejsce kilka minut później [152].

Badania aktywacji syntezy DNA przez czynniki wzrostowe wykazały, że mikrotubule są ważnym elementem mechanizmu transdukcji sygnału pochodzącego z kompleksu receptor-czynnik wzrostowy [153, 154]. Regulacja procesu polimeryzacji i depolimeryzacji tubuliny przez poszczególne białka jest zależna od poziomu cAMP, kompleksu kalmodulina-Ca i stężenia jonów Ca^{2+} oraz od aktywności specyficznych dla tych białek kinaz białkowych [46, 55, 155, 156].

Przestrzenna organizacja mikrofilamentów zależy od stopnia polimeryzacji G-aktyny, funkcjonowania białek regulujących stan aktyny, obecności połączeń filamentów aktynowych z miozyną i mikrotubulami oraz od stanu skurczu komórki (izometrycznego lub izotonicznego [157]). Proces polimeryzacji i wydłużania oraz powstawania połączeń między mikrofilamentami zachodzi przy udziale białek regulacyjnych wrażliwych na zmiany stężenia jonów Ca^{2+} [158, 159]. Podobnie, oddziaływanie F-aktyny z miozyną jest zależne od stężenia jonów Ca^{2+} i kompleksu kalmodulina-Ca [95, 160, 161, 162] tak jak powstawanie kontaktów aktyny i miozyny z białkami błony [163, 164].

Znaczenie filamentów pośrednich dla funkcjonowania cytoszkieletu jest stosunkowo słabo poznane. Stwierdzono, że są bardziej wrażliwe na enzymy proteolityczne niż mikrotubule czy mikrofilamenty. Specyficzne, za-

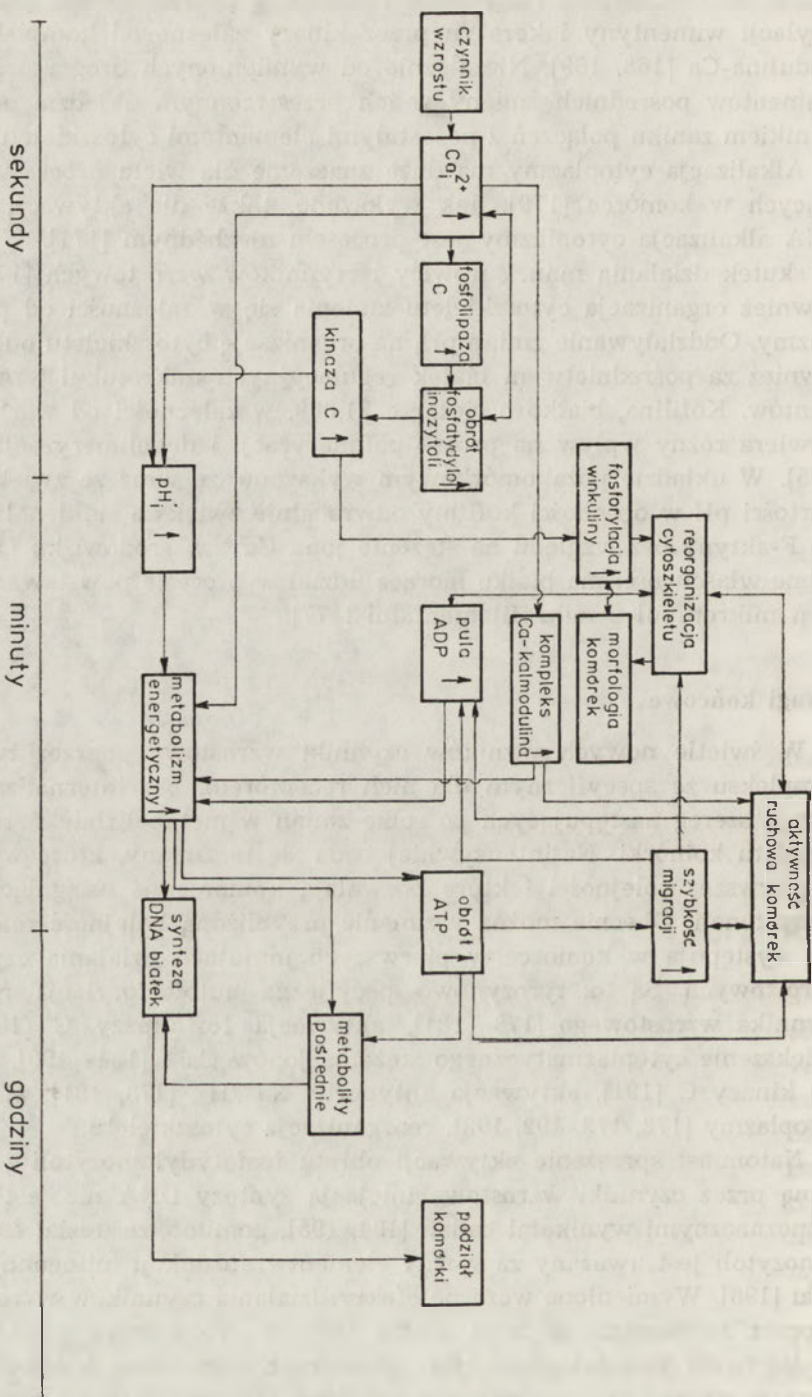
leżne od wapnia proteazy wpływają na stan organizacji filamentów desminowych i wimentynowych [165, 166] oraz keratynowych [167]. Duże znaczenie dla formowania i agregacji filamentów pośrednich ma proces fosforylacji wimentyny i keratyn przez kinazy zależne od kompleksu kalmodulina-Ca [168, 169]. Niezależnie od wymienionych dróg reorganizacji filamentów pośrednich zmiany w ich przestrzennym układzie mogą być wynikiem zaniku połączeń z pozostałymi elementami cytoszkieletu.

Alkalizacja cytoplazmy ma duże znaczenie dla wielu procesów zachodzących w komórce [170]. Jak wykazano, także dla aktywacji syntezy DNA alkalizacja cytoplazmy jest procesem niezbędnym [171]. Występuje na skutek działania m.in. surowicy i czynników wzrostowych [172—174]. Również organizacja cytoszkieletu zmienia się w zależności od pH cytoplazmy. Oddziaływanie zmian pH_i na organizację cytoszkieletu odbywa się również za pośrednictwem białek regulacyjnych mikrotubul i mikrofilamentów. Kofilina, białko o ciężarze 21 000, w zależności od wartości pH_i wywiera różny wpływ na proces polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny [175]. W układzie pozakomórkowym wykazano, że wraz ze zwiększeniem wartości pH w obecności kofiliny odwracalnie zwiększa się depolimeryzacja F-aktyny bez względu na stężenie jonu Ca²⁺ w środowisku [176]. Podobne właściwości ma białko biorące udział w procesie powstawania połączeń mikrotubul z mikrofilamentami [177].

Uwagi końcowe

W świetle nowych wyników czynniki wzrostowe poprzez tworzenie kompleksu ze specyficznym dla nich receptorem, bez internalizacji wywołują szereg następujących po sobie zmian w metabolizmie i strukturze szkieletu komórki. Najintensywniej bada się te zmiany, które występują w pierwszej kolejności i które pozwalają komórce na osiągnięcie stanu kompetencji. Obecnie można wymienić przybliżoną kolejność reakcji, jakie występują w komórce w pierwszych minutach działania czynników wzrostowych. Są to: tyrozynowo-specyficzna autofosforylacja receptora czynnika wzrostowego [178—181], aktywacja fosfolipazy C [182—183], zwiększenie cytoplazmatycznego stężenia jonów Ca²⁺ [184—190], aktywacja kinazy C [191], aktywacja antyportu Na⁺/H⁺ [173, 191], alkalizacja cytoplazmy [172, 173, 192, 193], reorganizacja cytoszkieletu.

Natomiast sprzężenie aktywacji obrotu fosfatydyloinozytoli z indukowaną przez czynniki wzrostowe inicjacją syntezy DNA nie jest poparte jednoznacznymi wynikami badań [194, 195], pomimo, że udział fosfatydyloinozytoli jest uważany za ważny element transdukcji mitogennego sygnału [196]. Wymienione wczesne efekty działania czynników wzrostowych poprzez zwiększenie stężenia jonów Ca²⁺ w cytoplazmie, często za pośrednictwem powstałego w tych warunkach kompleksu kalmodulina-Ca inicjują zmiany w metabolizmie komórek [91—95, 197], ich aktywności



Ryc. 1. Schemat ilustrujący współzależność rozmaitych zmian w aktywności komórki po zadziałaniu na nią czynników wzrostu. (Strzałki w prostokątach oznaczają wzrost stymulację lub aktywację)

ruchowej oraz morfologii [198—201]. Wzajemne związki omawianych tu procesów przedstawia rys. 1.

W wyniku działania czynników wzrostowych po upływie kilku godzin następuje zwiększenie syntezy białek cytoszkieletu. W astrocytach stwierdzono 4-krotne zwiększenie syntezy białek filamentów glejowych na skutek działania FGF [123]. Ponadto w obecności NGF, w komórkach SH-SY5Y obserwowano podwyższony poziom mRNA dla alfa i beta tubuliny i G-aktyny. Te efekty można zaliczyć do zmian związanych z przejściem komórek z fazy G1 do fazy S, podczas gdy wczesne efekty działania PDGF i EGF, bez internalizacji kompleksów receptor-czynnik wzrostowy stymulują przejście komórek z fazy G0 do fazy G1 i aktywują proces syntezy DNA [202].

*Artykuł otrzymano 5 czerwca 1986 r.
 Zaakceptowano do druku 6 maja 1987 r.*

PISMIENICTWO

1. Haemmerli G., (1985), *Exp. Biol. Med.*, **10**, 89—117.
2. Buckley I. K., (1981), w: *Cell and Muscle Motility*, red. Dowben R. M., Shay J. W., Plenum Press., **1**, 135—203.
3. Byers H. R., White G. R., Fujiwara K., (1982), w: *Cell and Muscle Motility*, red. Skay J. W., Plenum Press, **5**, 83—137.
4. Norberg R., Lidman K., Fagraeus A., (1975), *Cell*, **6**, 507—512.
5. Weber K., Rathke P. C., Osborn M., Franke W. W., (1976), *Exp. Cell Res.*, **102**, 285—297.
6. Talha S., Harel L., (1985), *Exp. Cell Res.*, **158**, 311—320.
7. Drubin D. G., Feinstein S. C., Shooter E. M., Kirchner M. W., (1985), *J. Cell Biol.*, **101**, 1799—1807.
8. Ben-Ze'ev A., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **780**, 197—212.
9. Buckley I. K., Porter K. R., (1967), *Protoplasma*, **64**, 349—380.
10. Albrecht-Buechler G., (1977), *J. Cell Biol.*, **72**, 595—603.
11. Albrecht-Buechler G., (1977), *Cell*, **12**, 333—339.
12. Stoker M., O'Neill C., Berryman S., Waxman V., (1968), *Int. J. Cancer*, **3**, 683—693.
13. Maroudas N. G., (1973), *Exp. Cell Res.*, **81**, 104—110.
14. Folkman J., Moscona A., (1978), *Nature*, **273**, 345—349.
15. Benecke B. J., Ben-Ze'ev A., Penman S., (1978), *Cell*, **14**, 931—939.
16. Benecke B. J., Ben-Ze'ev A., Penman S., (1980), *J. Cell. Physiol.*, **103**, 247—254.
17. Farmer S. R., Ben-Ze'ev A., Benecke B. J., Penman S., (1978), *Cell*, **15**, 627—637.
18. Ben-Ze'ev A., Raz A., (1981), *Cell*, **26**, 107—115.
19. Ben-Ze'ev A., (1983), *J. Cell. Physiol.*, **114**, 145—152.
20. Castor L. N., (1971), *Exp. Cell Res.*, **68**, 17—24.
21. Castor L. N., (1970), *J. Cell. Physiol.*, **75**, 57—64.
22. Abercrombie M., Heaysman J., (1953), *Exp. Cell Res.*, **5**, 111—131.

23. Abercrombie M., Heaysman J., (1954), *Exp. Cell Res.*, **6**, 293—306.
24. Ambrose E. J., (1986), w: *The Proliferation and Spread of Neoplastic Cells*, red. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 23—39.
25. Korohoda W., (1972), *Acta Protozool.*, **11**, 161—172.
26. Todaro G. J., Lazar G. K., Green H., (1965), *J. Cell Comp. Physiol.*, **66**, 325—334.
27. Dulbecco R., (1970), *Nature*, **227**, 802—805.
28. Vasiliev J. M., Gelfand I. M., Domnina L. V., Rappaport R. I., (1969), *Exp. Cell Res.*, **54**, 83—93.
29. Vaheri A., Ruohslahti E., Hove T., Nordling S., (1973), *J. Cell. Physiol.*, **81**, 355—364.
30. Sefton B. M., Rubin H., (1970), *Nature*, **227**, 843—845.
31. Burger M. M., (1970), *Nature*, **227**, 170—171.
32. Nilausen N., Green H., (1965), *Exp. Cell Res.*, **40**, 166—168.
33. Clarke G. D., Stoker M. G., Ludlow A., Thornton M., (1970), *Nature*, **227**, 798—801.
34. Zetterberg A., Auer G., (1970), *Exp. Cell Res.*, **62**, 268—270.
35. Denhardt D. T., Edwards D. R., C. L. J. Parfeit, (1986), *Biochim. Biophys. Acta*, **865**, 83—125.
36. Castor L. N., (1968), *J. Cell. Physiol.*, **86**, 161—172.
37. Couchman J. R., Rees D. A., (1979), *J. Cell. Sci.*, **39**, 149—165.
38. Gierthy J. F., Rothstein H., (1971), *Exp. Cell Res.*, **64**, 170—178.
39. Farbiszewski R., Gabryel H., (1982), *Post. Biochemii*, **28**, 71—89.
40. Means A. R., Lagace L., Guerriero V., Chafoules J. and J. G., (1982), *J. Cell Biochem.*, **20**, 317—330.
41. Whitfield J. F., Boynton A. L., Rixon R. H., Youdale T., (1985), *Control of Animal Cell Proliferation*, t. 1, str. 331—365.
42. Marcean N., Swierenga S. H. H., (1985), w: *Cell and Muscle Motility 6*, red. Shay J. W., Plenum Press, NY, 97—140.
43. Weigl M. L., Vanaman T. S., Sedwick W. D., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **755**, 21—48.
44. Cheung W. Y., (1984), *Fed. Proc.*, **43**, 2995—2999.
45. Weatherboe J. A., (1981), *Int. Rev. Cytol.*, **12**, 113—164.
46. Vallee R. B., DiBartomeis M. J., Therkauf W. E., (1981), *J. Cell Biol.*, **90**, 568—604.
47. Griffith L., Polard T. D., (1978), *J. Cell Biol.*, **78**, 958—963.
48. Griffith L., Polard T. D., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 9143—9148.
49. Bannikov G. A., Guelstein V. I., Montesano R., Tint I. S., Tomatis L., Troyanovsky S. M., Vasiliev J. M., (1982), *J. Cell Sci.*, **54**, 47—59.
50. Vallee R. B., Bloom G. S., Therkauf W. E., (1984), *J. Cell Biol.*, **99**, 38—44.
51. Bloom G. S., Vallee R. B., (1983), *J. Cell Biol.*, **96**, 1523—1533.
52. Geiger B., Singer S. J., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4769—4777.
53. Ball E. H., Singer S. J., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6986—6992.
54. Berkowitz S. A., Wolff J., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 11216—11219.
55. Pierre M., Nunez J., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **115**, 212—219.
56. Weber K., Osborn M., (1979), w: *Microtubules*, red. Roberts K., Hyams J. S., Acad. Press., str. 279—313.
57. Brinkley B. R., Fistel S. H., Marcum J. M., Pardue L. R., (1980), *Int. Rev. Cytol.*, **63**, 59—95.
58. Weber K., Pollack R., Birbring T., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 459—463.

59. Brinkley B. R., Fuller G. M., Highfield D. P., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4981—4985.
60. Fuller G. M., Brinkley B. K., Boughter M. J., (1975), *Science*, **187**, 948—950.
61. Webster R. S., Hendersen D., Osborn M., Weber K., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5511—5515.
62. Weber K., Rathke P. C., Osborn M., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1821—1824.
63. Geiger B., Avnur Z., Rinnenthaler G., Hinssen H., Small V. J., (1984), *J. Cell Biol.*, **99**, 83—91.
64. Osborn M., Weber K., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 867—871.
65. Bergman J. E., Kupfer A., Singer S. J., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1367—1371.
66. Heggeness M. H., Simon M., Singer S. J., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3863—3866.
67. Wolesewick J. J., Porter K. R., (1979), *J. Cell. Biol.*, **82**, 114—139.
68. Otto A. M., (1982), *Cell. Biol. Int. Rep.*, **6**, 1—21.
69. Strzelewska-Gołaszewska H., (1986), *Post. Biol. Kom.*, **13**, 97—125.
70. Geiger B., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **737**, 305—341.
71. Weeds A., (1982), *Nature*, **296**, 811—816.
72. Yin H. L., Stossel T. P., (1979), *Nature*, **281**, 583—586.
73. Hasegawa T., Takahashi S., Hayashi H., Hatano S., (1980), *Biochemistry*, **19**, 2679—2683.
74. Weber K., Glenney J. P., (1981), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **46**, 541—552.
75. Bryan J., Kurth M. C., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 7480—7487.
76. Janmey P. A., Chapponier C., Lind S. E., Zaner K. S., Stossel T. P., Yin H. L., (1985), *Biochemistry*, **24**, 3614—3723.
77. Kilimann M. W., Isenberg G., (1982), *EMBO J*, **1**, 889—894.
78. Sanger J. W., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1913—1916.
79. Nachmias V. T., (1984), w: *Microfilaments*, red. Head J. J., Carolina Biology Readers, North Carolina, 1—16.
80. Sanger J. N., Sanger J. W., (1980), *J. Cell Biol.*, **86**, 568—575.
81. Burrige K., Connell L., (1983), *J. Cell Biol.*, **97**, 359—367.
82. Geiger B., (1979), *Cell*, **18**, 193—205.
83. Burrige K., Feramisco J. R., (1980), *Cell*, **19**, 587—595.
84. Ben-Ze'ev A., Duerr A., Solomon F., Penman S., (1979), *Cell*, **17**, 859—865.
85. Wang K., (1977), *Biochemistry*, **16**, 1857—1864.
86. Wang K., Singer S. J., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2021—2025.
87. Rosenberg S., Stracher A., Lucas R., (1981), *J. Cell Biol.*, **91**, 201—211.
88. Stossel T., Hartwig J., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5706—5712.
89. Yin H. L., Hartwig J. H., Maruyama K., Stossel T. P., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 9693—9697.
90. Harris H. E., Weeds A. G., (1983), *Biochemistry*, **22**, 2728—2741.
91. Kirschner M. W., (1978), *Int. Rev. Cytol.*, **54**, 1—11.
92. Margolis R. L., Wilson L., (1981), *Nature*, **293**, 705—711.
93. Weisenberg R. C., (1981), *Cell Motil.*, **1**, 485—497.
94. Korn E. D., (1982), *Physiol. Rev.*, **62**, 672—737.
95. Adelstein R. S., (1982), *Cell*, **30**, 349—350.
96. Weber K., Groschel-Stewart U., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4561—4564.

97. Lazarides E., (1975), *J. Cell Biol.*, **65**, 549—561.
98. Lazarides E., Burridge K., (1975), *Cell*, **6**, 289—298.
99. Wang K., Asn J. F., Singer S. J., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4483—4486.
100. Dąbrowska R., (1986), *Post. Biol. Kom.*, **13**, 145—175.
101. Birchmeier W., (1984), *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 192—195.
102. Schliwa M., van Blerkom J., (1981), *J. Cell Biol.*, **90**, 222—235.
103. Osborn M., Weber K., (1982), *Cell*, **31**, 303—306.
104. Trenke W. W., Schmid E., Winter S., Osborn M., Weber K., (1979), *Exp. Cell Res.*, **123**, 25—46.
105. Virtanen I., Lehto V. P., Lehtonen E., Vartio P., Stenman D., Bradley R. A., (1981), *J. Cell Sci.*, **50**, 45—53.
106. Bignani A., Dahl D., Renger D. C., (1980), *Adv. Cell. Neurobiol.*, **7**, 285—310.
107. Lazarides E., Hubmard B. D., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 4344—4348.
108. Small J. V., Sobieszek A., (1977), *J. Cell. Sci.*, **23**, 243—268.
109. Yen S. H., Fields K. L., (1981), *J. Cell Biol.*, **85**, 115—126.
110. Shaw G., Osborn M., Weber K., (1991), *Eur. J. Cell Biol.*, **26**, 68—72.
111. Farquhar M. G., Polade G., (1963), *J. Cell Biol.*, **17**, 375—412.
112. Fey E. G., Wan K. M., Penman S., (1984), *J. Cell. Biol.*, **98**, 1973—1984.
113. Mose L. P., Small S. V., Celis J. L., (1982), *Cell*, **31**, 681—692.
114. Zumbe A., Stahli C., Trachsel H., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2927—2931.
115. Ramaekers F. C., Dunia , Dodemonth H. J., Benedetti E. L., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3208—3212.
116. Geiger B., Singer S. J., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4769—4773.
117. Werth D. K., Wiedel J. E., Papstan I., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 11423—11426.
118. Herman B., Pledger W. J., (1985), *J. Cell. Biol.*, **100**, 1031—1040.
119. Bockus J., Stiles C. D., (1984), *Exp. Cell Res.*, **153**, 186—197.
120. Mellstrom K., Hoglund A. S., Nister M., Heldin C. H., Westermark B., Linberg U., (1983), *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **4**, 589—609.
121. Nishimura J., Huang J., Deuel T. F., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4303—4310.
122. Drubin D. G., Feinstein S. C., Shooter E. M., Kirschner M. W., (1985), *J. Cell Biol.*, **101**, 1799—1807.
123. Morrison R. S., de Vellis J., Lee Y. L., Bradshaw R. A., Eng L. F., (1985), *J. Neurosci. Res.*, **14**, 167—176.
124. Mill J. F., Chao M. V., Ishi D. W., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7126—7130.
125. Caron J. M., Jones A. L., Kirschner M. W., (1985), *J. Cell Biol.*, **101**, 1763—1772.
126. Wang Y. L., (1984), *J. Cell Biol.*, **99**, 1478—1485.
127. McAuslan B. R., Bender V., Reilly W., Moss B. A., (1985), *Cell Biol. Intern. Rep.*, **9**, 175—182.
128. Herman I. M., D'Amore P. A., (1984), *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **5**, 697—709.
129. Blay J., Brown K. D., (1985), *J. Cell. Physiol.*, **124**, 107—112.
130. Grotendorst G. R., Seppa H. E., Kleinmen H. K., Martin G. R., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3669—3672.
131. Grotendorst G. R., Cheng T., Seppa H. E., Kleinman H. K., Martin G. R., (1982), *J. Cell. Physiol.*, **113**, 262—266.

132. Seppa H. E., Grodendorst G. R., Seppa S., Schiffman S., Martin G. R., (1982), *J. Cell Biol.*, **92**, 584—588.
133. Duel T. F., Senior R. M., Huang J. S., Griffin G. L., (1982), *J. Clin. Invest.*, **69**, 1046—1049.
134. O'Neill C., Riddle P., Rozengurt E., (1985), *Exp. Cell Res.*, **156**, 65—78.
135. Talha S., Harel L., (1986), *Exp. Cell Res.*, **163**, 261—265.
136. Abercrombie M. A., Dunn G. A., Heath J. P., (1979), *Cell and Tissue Interaction*, red. Lash J. W., Burger M. W., 57—83, Raven Press New York.
137. Pollack R. E., Kopelowitch L., (1979), *Meth. Arch. Exp. Pathol.*, **9**, 207—214.
138. Vasiliev J. M., Gelfand I. M., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2594—2600.
139. Gail M. H., Sher C. D., Boone C. W., (1972), *Exp. Cell Res.*, **70**, 439—445.
140. Baker J. B., Humphreys T., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 2161—2164.
141. Westermarck B., Blonquist C., (1980), *Cell Biol. Int. Rep.*, **4**, 649—654.
142. Abercrombie M., (1980), *Proc. Roy. Soc. Lond. B.*, **207**, 129—147.
143. Hoffman-Berling H., (1956), *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 453—463.
144. Schafer-Danneel S., Weisefels N., (1969), *Cytobiologia*, **1**, 85—98.
145. Erecińska M., Stubbs M., Miyata Y., Ditra C. M., Wilson D. F., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **462**, 20—35.
146. Racker E., (1976), *J. Cell. Physiol.*, **89**, 697—700.
147. Atkinson D. E., (1965), *Science*, **150**, 851—857.
148. Korohoda W., (1971), *Folia Biol.*, **19**, 41—51.
149. Kajstura J., Korohoda W., (1982), *Studia Biophysica*, **90**, 199—205.
150. Kajstura J., Korohoda W., (1983), *Eur. J. Cell Biol.*, **31**, 9—14.
151. Owen W. E., Villereal M. L., *J. Cell Physiol.*, **117**, 23—29.
152. Rothenberg P., Glaser L., Schlesinger P., Cassel D., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 12644—12653.
153. Edelman G. M., (1976), *Science*, **192**, 218—223.
154. Tucker R. W., (1982), w: *Cell and Muscle Motility*, red. Dowben R. M., Shay J. W., Plenum Press, NY, 259—295.
155. Selden S. C., Pollard T. D., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 7064—7069.
156. Lee Y. C., Wolf J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6306—6311.
157. Korohoda W., Kajstura J., (1982), *Folia Histochem. Cytochem.*, **20**, 153—156.
158. Burridge K., Feramisco J. R., (1981), *Nature*, **294**, 565—568.
159. Bretcher A., Weber K., (1980), *Cell*, **20**, 839—844.
160. Dąbrowska R., Hartshorne D. J., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 1352—1359.
161. Hathaway D. R., Adelstein R. S., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1653—1657.
162. Yerna M., Dąbrowska R., Hartshorne D., Goldman R. D., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 184—188.
163. Burridge K., Kelly T., Mangeat P., (1982), *J. Cell Biol.*, **95**, 478—483.
164. Glenney J. R., Glenney P., Weber K., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4002—4007.
165. Nelson W. J., Traub P., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5544—5548.
166. Nelson W. J., Traub P., (1983), *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 1146—1149.
167. Lazarides E., (1982), *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 219—227.
168. Spruil W. A., Zysk J. R., Tres L. L., Kierszenbaum A., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 760—765.

169. O'Connor C. M., Gard D. L., Lazarides E., (1981), *Cell*, **23**, 135—141.
170. Busa W. B., Nuccitelli R., (1984), *Am. J. Physiol.*, **246**, 409—438.
171. Pouyssegur J., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4833—4837.
172. Schuldiner S., Rozengurt E., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7778—7782.
173. Moolenaar W., Tsien R. Y., van der Saag P., de Last S., (1983), *Nature*, **304**, 645—648.
174. Moolenaar W. H., (1984), *Nature*, **312**, 371—374.
175. Nishida E., Maekawa S., Sakai H., (1984), *Biochemistry*, **23**, 5307—5313.
176. Yonezawa N., Nishida E., Sakai H., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 14410—14412.
177. Nishida E., Kuwaki T., Sakai H., (1981), *J. Biochem.* **90**, 575—578.
178. Carpenter G., King L., Cohen S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4884—4890.
179. Hunter T., Cooper J. A., (1981), *Cell*, **24**, 741—749.
180. Fernandez-Pol J. A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 9742—9749.
181. Ek B., Heldin C. H., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 10486—10492.
182. Nishizuka Y., (1984), *Nature*, **308**, 693—698.
183. Berridge M. J., (1984), *Biochem. J.*, **220**, 345—360.
184. Moolenaar W. H., Tertoolen L. G., de Last S. W., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 8066—8069.
185. Tupper J. T., Del Rosso M., Hazelton B., Zorgniotti F., (1978), *J. Cell. Physiol.*, **95**, 71—84.
186. Lopez-Rivas A., Rozengurt E., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 240—247.
187. Owen N. E., Villereal M., (1983), *J. Cell. Physiol.*, **117**, 23—29.
188. Villereal M., (1981), *J. Cell. Physiol.*, **107**, 359—369.
189. Benos D. J., (1982), *Am. J. Physiol.*, **242**, C 131—C 145.
190. Owen N. E., Villereal M., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**, 3537—3541.
191. Moolenaar W., Tertoolen L., de Last S., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 7563—7569.
192. Cassel D., Rothenberg P., Zhuang Y., Deuel T., Glaser R., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6224—6228.
193. L'Allemain G., Paris S., Pouyssegur J., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 5809—5815.
194. Habenicht A., Glomset J., King W. C., Nist C., Mitchell C. D., Ross A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 12329—12334.
195. Besterman J. M., Watson S. P., Cuatrecasas P., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 723—727.
196. Sekar Ch., Hokin L. E., (1986), *J. Membrane Biol.*, **89**, 193—210.
197. Berridge M. J., (1983), *Biochem. J.*, **212**, 849—858.
198. Herman M., Crisona N. J., Pollard T. D., (1981), *J. Cell Biol.*, **90**, 84—91.
199. Korn E. D., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 588—599.
200. Wehland J., Osborn M., Weber K., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5613—5617.
201. Chen W. T., (1981), *J. Cell Biol.*, **90**, 187—200.
202. Leaf E. B., van Wyk J. J., O'Keefe E. J., Pledger W. J., (1983), *Exp. Cell Res.* **147**, 202—206.

Składam serdeczne podziękowania Panu prof. Włodzimierzowi Korohodzie oraz Panu dr Janowi Kajsturze za cenne uwagi podczas przygotowywania niniejszej pracy.

JÓZEF A. CZYRSKI*
I BARBARA NARCZEWSKA**

PDGF — czynnik wzrostowy z płytek krwi

PDGF — platelet-derived growth factor

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Oczyszczanie i badanie struktury PDGF
- III. Wiązanie PDGF z receptorami. Heterologiczna i homologiczna regulacja działania receptorów
- IV. Biochemiczne konsekwencje przyłączenia się PDGF do receptora komórkowego
- V. Biologiczna rola PDGF
- VI. PDGF jako białkowy produkt onkogenu *c-sis*
- VII. Układ para- i autokryny

Contents:

- I. Introduction
- II. Purification and structure of PDGF
- III. PDGF and its receptors. Heterospecific and homospecific regulation of receptors
- IV. Biochemical results of the binding of PDGF to cellular receptors
- V. Biological role of PDGF
- VI. PDGF jako białkowy produkt onkogenu *c-sis*
- VII. Paracrine and autocrine systems

Wykaz stosowanych skrótów: Bo-PDGF — czynnik wzrostowy z bydłych płytek krwi, CSF-1 — czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów, FDGF — czynnik wzrostowy fibroblastów, Hu-PDGF — czynnik wzrostowy z ludzkich płytek krwi, ODFG — czynnik wzrostowy ludzkiego mięsaka kości, Po-PDGF — czynnik wzrostowy ze świńskich płytek krwi, SDS — siarczan dodecyłu sodu, Mr — masa cząsteczkowa, SSV — wirus mięsaka małych włośniastych, SV-40 — wakuolizujący wirus małpi, VSV — wirus pęcherzykowatego zapalenia jamy gębowej u bydła, *v-ros* — onkogen wirusa ptasiego mięsaka, *v-erb-B* — onkogen wirusa ptasiej erythroblastoma, *v-fms* — onkogen wirusa kociego mięsaka, *c-fms* — odpowiednik komórkowy *v-fms*, *src* —

*Dr **Dr, Laboratorium Wirusologii Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, 53-114 Wrocław, ul. Czerska 12

rodzina onkogenów ptasiego mięsaka, *c-fos* — onkogen kocięgo mięsaka kości, *c-myc* — rodzina onkogenów ptasiej mieloblastoma, *v-sis* — onkogen wirusa małego włośnicy, *c-sis* — odpowiednik komórkowy onkogenu *v-sis*

I. Wstęp

Mechanizm namnażania się komórek eukariotycznych jest jednym z ważniejszych problemów biologii, który nie doczekał się jeszcze pełnego wyjaśnienia, choć wiele znanych obecnie faktów pozwala na tworzenie w tym zakresie prawdopodobnych hipotez. Poszukiwanie substancji odpowiedzialnych za regulację wzrostu komórek, swoistych nośników informacji genetycznej, oraz sposobów ich działania trwają już od wielu lat.

H. Eagle [1] pierwszy zwrócił uwagę na to, że substancje niezbędne do wzrostu tkanek *in vitro* mają charakter białkowy i znajdują się w surowicy.

Późniejsze badania nad wpływem białek surowicy ludzkiej [2, 3, 4, 5, 6] i bydłowej [7, 8] na rozwój hodowanych komórek potwierdziły obecność w niej czynników odpowiedzialnych za prawidłowy wzrost. Jednocześnie wykazano, że komórki stransformowane niektórymi wirusami potrzebują tych czynników znacznie mniej niż komórki normalne [4, 9, 10].

Stwierdzenie, że osocze znacznie słabiej pobudza wzrost hodowanych fibroblastów niż surowica [3] doprowadziło do udowodnienia, że czynnik powodujący wzrost komórek tkanki łącznej znajduje się w α -ziarnistościach płytek krwi i nazwano go platelet-derived growth factor — PDGF [10, 11, 12, 13, 14]. Nie jest jednak znane miejsce syntezy PDGF, chociaż badania Chernoff'a i wsp. [15] wskazują na to, że może on być syntetyzowany w megakariocycie i znajdować się w płytce w chwili jej przejścia ze szpiku kostnego do krwi.

PDGF może być uwalniany z płytek krwi tylko w efekcie ich rozpadu w czasie krzepnięcia krwi lub przylegania płytek w miejscu uszkodzenia naczynia krwionośnego. Przypuszczalnie czynnik ten odgrywa ważną rolę w gojeniu się ran, a także w powstawaniu miażdżycy tętnic [3, 14, 16].

II. Oczyszczanie i badanie struktury PDGF

Po raz pierwszy PDGF otrzymali Antoniadou i wsp. [17] z surowicy krwi ludzkiej i podali jego wstępną charakterystykę. Obecnie do izolowania tego czynnika używane są zagęszczone preparaty płytek krwi ludzkiej [18, 19, 20, 21, 22, 23, 24], bydłowej [25] lub świńskiej [26] chociaż obecność PDGF stwierdzono we krwi wszystkich kręgowców [27].

Hu-PDGF oczyszczano z surowego, jedynie odwłóknionego lizatu płytkowego [21, 23, 24], bądź wykorzystując jego termostabilność, bądź też sto-

sując etanolowo-kwaśną ekstrakcję lizatu (co sprzyja denaturacji enzymów i pozwala uzyskać około 40-krotne oczyszczenie PDGF) [20].

Aktywność PDGF oznaczano dokonując pomiaru ilości wbudowanej do DNA hodowanych komórek ^3H -tymidyny [18, 19, 21, 22, 23, 24] albo biologicznym testem mitogennym polegającym na obserwowaniu proliferacji komórek BALB/c 3T3 pod mikroskopem [20, 25].

Tabela 1

Porównanie właściwości biochemicznych PDGF wyizolowanych z płytek ludzkich różnymi metodami

Metody uzyskania PDGF	Mr		Punkt izoelektryczny
	przed redukcją	po redukcji	
Heldin i wsp. [23]	33 000	17 000	9,5-10,2
Deuel i wsp. [21]	I 31 000	17 000	10,2
		14 000	
	II 28 000	14 000	
Raines i Ross [24]	31 000*	14 400	9,0
	29 000	16 000	
	28 500	17 000	
	27 000		
Antoniades i wsp. [19]	35 000	13 000-16 000	9,8
Czyrski i wsp. [20]	I 34 000	16 000-17 000	9,4-10,65
	II 31 000		

* źle wybarwiane były srebrem

Dochodząc do uzyskania wysokoaktywnego, homogennego preparatu różnymi drogami, wszyscy autorzy otrzymali podobne wyniki (Tab. 1). Jak wykazano drogą elektroforezy poliakryloamidowej w obecności SDS, PDGF jest mieszaniną polipeptydów o Mr 27 000—34 000, które wykazują podobną aktywność biologiczną. Np. Deuel i wsp. [21] uzyskali dwie frakcje glikoproteinowe: PDGF I i PDGF II, z których każda pobudza hodowane komórki do syntezy DNA w stężeniu 0,2 ng/ml. Skład aminokwasowy obydwóch czynników wzrostowych jest bardzo zbliżony. Każdy z nich zawiera 18 reszt cysteinowych. Różnią się one natomiast stopniem glikozylacji. W skład PDGF I wchodzi: mannoza, galaktoza, N-acetyloglukozamina, N-acetylogalaktozamina i fukoza. W PDGF II występują tylko pierwsze trzy wymienione cukry. Redukcja cząsteczki Hu-PDGF β -merkaptopetanolom prowadzi zawsze do powstania dwóch, nieaktywnych biologicznie łańcuchów polipeptydowych (widocznych w elektroforegramach) o Mr około 14 000 i 16 000 [18, 20, 23, 24, 28]. Tak więc ludzki PDGF jest

heterodimerem o M_r około 30 000, składającym się z dwóch łańcuchów polipeptydowych powiązanych wieloma mostkami dwusiarczkowymi, których obecność jest niezbędna do zachowania jego biologicznej aktywności. Odporność PDGF na wysoką temperaturę można wiązać z brakiem wolnych grup SH w cząsteczce [21], natomiast jego wrażliwość na redukujące działanie β -merkaptopetanolu wskazuje na obecność wiązań S-S między polipeptydami [18, 20, 21, 23, 24, 28]. Możliwe, że fragmenty łańcuchów są odszczepione przez enzymy proteolityczne, co jest przyczyną ich różnych mas cząsteczkowych. Nie wiadomo jednak, czy następuje to w czasie oczyszczania, czy też jest wynikiem procesów, jakim jest poddana cząsteczka prekursora PDGF przed, lub w związku z jej uwolnieniem z płytki [29].

	67	90	100	120
łańcuch B Hu-PDGF	SLGSLTIAEPAMIAECKTRTEVFEISRRLIDRTNANFLVPPCVEVQRCSGCCNNRNVQCRPTQVQLRVPQ			
łańcuch A Hu-PDGF	SI-E-VP-V----VIY--P-SQV-PT-----K--T---NTSS-K-X-XXXXXXXXXX			
	140	160	180	
łańcuch B Hu-PDGF	VRKIEIVRKKPIFKKATVTLEDHLACKCEIXAAARAVTRSPGT			
łańcuch A Hu-PDGF	XXXX-Y----KL-EVQ-X--E--E-XXXXXXXXXXXXXXXXXX			

Ryc. 1. Porównanie sekwencji aminokwasowej łańcucha A i B ludzkiego PDGF podanej przez Waterfielda i wsp. [33]

Poszczególne litery oznaczają nazwy następujących aminokwasów:

A — alanina, C — cysteina, D — kwas asparaginowy, E — glutamina, F — fenyloalania, G — glicyna, H — histydyna, I — izoleucyna, K — lizyna, L — leucyna, M — metionina, N — asparagina, P — protamina, Q — glutamina, R — arginina, S — seryna, T — treonina, V — walina, W — tryptofan, Y — tyrozyna.

X — nieznaną sekwencją

x — przypuszczalne miejsce glikozylacji

--- — sekwencje homologiczne

Numerację reszt aminokwasowych rozpoczęto od N-końca białkowego produktu onkogeny *v-sis*.

Badania sekwencji aminokwasowej PDGF [30, 31, 32, 33] potwierdziły przedstawione wyżej przypuszczenia wielu autorów dotyczące budowy biochemicznej PDGF. Na ryc. 1 przedstawiono sekwencję aminokwasów łańcucha A (odpowiednik PDGF I) i łańcucha B (odpowiednik PDGF II) podaną przez Waterfielda i wsp. [33]. Łańcuch A jest w 60% homologiczny z łańcuchem B.

PDGF z bydlęcych płytek krwi jest najprawdopodobniej również heterodimerem, gdyż po redukcji β -merkaptopetanołem otrzymuje się dwa prążki o różnej ruchliwości elektroforetycznej [25]. Natomiast świński PDGF jest prawdopodobnie homodimerem zbudowanym z dwóch polipeptydów homologicznych z łańcuchem B Hu-PDGF [26].

Oprócz płytek krwi, źródłem PDGF mogą być również płyny hodowlane, w których rosły między innymi komórki ludzkiego lub świńskiego śródbłonka naczyń krwionośnych [34, 35, 36, 37] lub mięśni gładkich szczyrej aorty [38, 39]. Wykazano, że komórki te wydzielają do płynu hodowlanego czynnik wzrostowy, który współzawodniczy z ludzkim PDGF o receptory obecne na powierzchni komórek docelowych. Ponadto, substancje przypominające swymi biologicznymi i biochemicznymi właściwościami PDGF są produkowane przez komórki (głównie fibroblasty) transformowane: wirusem SSV, SV-40 lub chemicznie — metylocholanrenem [37]. Substancje te wytwarzane są także przez aktywowane monocyty [40] oraz komórki białaczki człowieka [41, 41a].

III. Wiązanie PDGF z receptorami.

Heterologiczna i homologiczna regulacja działania receptorów

Na działanie PDGF wrażliwe są przede wszystkim komórki pochodzenia mezenchymalnego: fibroblasty, komórki glejowe i komórki mięśni gładkich [2, 3, 13, 14, 42, 43, 44, 45]. Opracowanie testu radioreceptorowego stworzyło możliwość swoistego i czułego ilościowego oznaczania PDGF w płynach biologicznych, hodowlanych i ekstraktach tkankowych. Na powierzchni jednej wrażliwej komórki liczba miejsc wiążących ten polipeptyd (wykazywana, tą samą radioreceptorową metodą, przez różnych autorów) waha się w granicach 150 000 do 400 000. Stała dysocjacji kompleksu hormon-receptor wynosi od 10^{-11} do 10^{-9} M, co świadczy o wysokim powinowactwie PDGF do receptorów [27, 34, 46, 47, 48, 49, 50].

Po związaniu się PDGF z receptorem, błona komórkowa ulega wpukleniu do wewnątrz i wytwarza zamknięty pęcherzyk — endosom, wewnątrz którego znajduje się kompleks ligand — receptor. Endosom przemieszcza się w cytoplazmie w kierunku lizosomu, jednak jeszcze przed wniknięciem do niego dochodzi do dysocjacji kompleksu i podziału endosomu. PDGF wraz z otaczającym go pęcherzykiem wnika do lizosomu, gdzie ulega degradacji, natomiast receptor znajdujący się w endosomie wędruje w kierunku powierzchni komórki i może być zdolny do ponownego wiązania PDGF [48, 51, 52, 53].

Możliwość wiązania PDGF przez wiele różnych komórek, a także powinowactwo receptorów powierzchniowych na fibroblastach mysich, wobec PDGF z różnych organizmów [27] świadczyć może o tym, że ich budowa jest taka sama, lub podobna u zwierząt wielu gatunków. Wykazano, że komórki 3T3 mają na swej powierzchni receptor o Mr 164 000 [50, 54], który ma zdolność wiązania PDGF. Receptor ludzkich fibroblastów, o Mr 185 000, oczyszczony przy użyciu przeciwciała skierowanego przeciwko fosfotyrozynie, wiąże się z niektórymi lektynami. Można więc przypusz-

czać, że jest glikoproteina. Oczyszczone białko 185 000 umieszczone wewnątrz liposomu odzyskuje zdolność wiązania czynnika wzrostowego charakterystyczną dla natywnego receptora [29, 55, 56]. Przy przyłączeniu PDGF receptor ten zyskuje zdolność autofosforylacji tyrozyn obecnych prawdopodobnie w jego części enzymatycznej. Do jego aktywności kinazowej niezbędne są szczególnie jony manganu [57, 58, 59, 60, 61, 62]. Receptory insuliny [63, 64, 65], EGF [66] oraz CSF-1 [67] są również glikoproteinami; w cząsteczkach ich można wyróżnić trzy główne obszary: część wiążącą hormon (N-koniec białka receptorowego), transmembranową (bogatą w aminokwasy zasadowe) oraz wewnątrzkomórkową sekwencję o cechach enzymu, która ma zdolność autofosforylacji tyrozyn [67, 68].

Receptory PDGF, EGF i CSF-1 są białkami nierozgałęzionymi o Mr 165 000 i 175 000 natomiast receptory insuliny i IGF-1 są tetramerami (Mr 360 000—380 000) zbudowanymi z dwóch podjednostek α i dwóch podjednostek β połączonych mostkami dwusiarczkowymi [67, 68, 69].

Ostatnio poznano budowę aminokwasową receptora PDGF. Wykazano, że zawiera on pojedynczy obszar bogaty w aminokwasy zasadowe (część transmembranowa), N-końcowy fragment wiąże PDGF, a część wewnątrzkomórkowa zawiera obszar aktywności enzymatycznej. Potwierdzone zostały przypuszczenia, że receptor ten jest glikoproteina. Region zawierający kinazę, który jest w wysokim stopniu homologiczny z produktem białkowym onkogenu *src*, przedzielony jest sekwencją o niewyjaśnionych do końca właściwościach biologicznych [68]. Podobna budowa części enzymatycznej cechuje również białkowe produkty onkogenów *v-fms* i *c-fms* [67]. Ten ostatni, jak już wspomniano, jest receptorem czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów (CSF-1). Hydrofilowe sekwencje przedzielające obszary enzymatyczne omawianych wyżej produktów onkogenów wykazują również wysoki stopień homologii z sekwencją przedzielającą receptora PDGF. Możliwe, że sekwencje te biorą udział w regulacji aktywności kinazowej. Przypuszcza się również, że mogą one wiązać substrat obecny w cytoplazmie.

Opierając się na budowie biochemicznej poznane dotychczas receptory czynników wzrostowych podzielić można na dwie grupy:

Do pierwszej z nich zalicza się receptory PDGF, CSF-1 i białkowy produkt onkogenu *v-kit*. W cytoplazmatycznej części tych receptorów obszary homologiczne z produktem onkogenu *src* przedzielone są sekwencjami niehomologicznymi (ang. insert region). Ponadto receptory PDGF i CSF-1 mają podobny układ reszt cysteinowych w ich części zewnątrzkomórkowej.

Do drugiej grupy zaliczyć można receptory EGF i TGF α , receptory insuliny, insulinopodobnego czynnika wzrostowego (IGF-1) [67, 68] oraz białkowy produkt onkogenu *v-erb-B*. Części cytoplazmatyczne tych receptorów, które są homologiczne z białkowym produktem onkogenu *src* nie

zawierają sekwencji rozdzielających. Ponieważ części receptorów odpowiedzialne za ich aktywność biologiczną są produktami onkogenów — jak się przypuszcza — ich liczba może ulegać zwielokrotnieniu w przypadku transformacji nowotworowej komórki.

W warunkach fizjologicznych może dochodzić do współdziałania wielu różnych czynników wzrostowych. Ich wpływ na komórkę może być inny, niż w przypadku kiedy działają pojedynczo [70]. Wykazano, że pod wpływem PDGF zmniejsza się liczba aktywnych biologicznie receptorów EGF na powierzchni fibroblastów [71, 72]. Uważa się, że PDGF powoduje obniżenie termostabilności tych receptorów, co w warunkach eksperymentu może prowadzić do zmniejszenia ich powinowactwa. Efekt taki wydaje się być bardziej prawdopodobny niż wciąganie do wnętrza komórki wolnego receptora EGF przez kompleks PDGF-receptor. Podobnie reguluje aktywność biologiczną receptorów EGF czynnik wzrostowy fibroblastów (FDGF) [73] i wazopresyna [74].

Podane wyżej efekty biologiczne określa się jako heterospecyficzną regulację aktywności receptorów. Dochodzi do niej wtedy, gdy właściwości receptora jednego czynnika wzrostowego zmieniają się pod wpływem innego czynnika wzrostowego. W omawianych przypadkach zmniejsza się ich liczba i ich powinowactwo. Stwierdzono jednak, że w efekcie heterospecyficznej regulacji dochodzić również może do zwiększania się wrażliwości receptora na swoisty dla niego czynnik wzrostowy. Tak wpływa na przykład insulina na receptory IGF (insulino-podobny czynnik wzrostowy) [75].

Dołączenie się hormonu tkankowego do właściwego receptora, po którym rozpoczynają się określone przemiany biochemiczne określa się jako regulację homospecyficzną [75]. W wyniku internalizacji hormonu związanego z receptorem dochodzi do zmniejszenia liczby receptorów na powierzchni komórki (tzw. down regulation) [75, 76].

IV. Biochemiczne konsekwencje przyłączenia się PDGF do receptora komórkowego

Podczas indukcji podziałów komórkowych PDGF stymuluje między innymi następujące procesy biochemiczne: glikolizę, transport aminokwasów do wnętrza komórki, przyspiesza powstawanie polisomów i powoduje reorganizację filamentów aktyny [77, 78, 79, 80]. Mechanizmu działania PDGF na te procesy jeszcze dokładnie nie poznano. Wiadomo jednak, że już w kilka minut po przyłączeniu się tego czynnika wzrostowego do receptorów dochodzi do autofosforylacji tyrozyn obecnych w części cytoplazmatycznej jego receptora [56, 57, 60, 61, 70]. Dochodzi również do podwyższenia aktywności enzymatycznej kinazy białkowej C, która katalizuje między innymi fosforylację rybosomalnego białka S6 [81].

Innym, ważnym dla prawidłowego rozwoju (czyli proliferacji i różnicowania się) komórki procesem biologicznym indukowanym przez PDGF jest przemiana komórkowego fosfatydyloinozytolu, który wraz z GTP może regulować przemieszczanie się jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego w kierunku błony cytoplazmatycznej. Jony Ca^{+2} są niezbędne w procesie przekazywania sygnału do wnętrza komórki przez kompleks czynnik wzrostowy-receptor. PDGF przyspiesza również resyntezę fosfatydyloinozytolu z monoacyloglicerolu i kwasu arachidonowego. Jednocześnie obserwuje się przyspieszenie syntezy fosfatydylocholiny.

Jednym z produktów przemian fosfatydyloinozytolu jest kwas arachidonowy będący prekursorem prostaglandyn. W płytkach krwi znajduje się on w formie zestryfikowanej z fosfolipidami błon. Jednym z enzymów niezbędnych do rozpoczęcia przemian kwasu arachidonowego jest fosfolipaza A_2 , której aktywność wzrasta wielokrotnie pod wpływem PDGF. Zjawisku temu towarzyszy zwiększanie wydzielania prostaglandyn przez fibroblasty mysie BALB/c 3T3 do płynu hodowlanego [85].

Na obecnym etapie badań dotyczących czynników wzrostowych nie można jeszcze odpowiedzieć na pytanie, w jaki sposób opisane powyżej procesy biochemiczne powiązane są z autofosforylacją tyrozyn na białkach receptorowych wrażliwych na dany czynnik wzrostowy komórek. Obecnie panuje pogląd [86, 87] że po przyłączeniu się czynnika wzrostowego do receptora podwyższa się aktywność enzymatyczna fosfolipazy C, co prowadzi do przyspieszenia metabolizmu fosfatydyloinozytolu. Jednym z jego produktów jest 1,4,5-trójfosfoinozytol, który stymulując wzrost stężenia jonów Ca^{+2} w cytoplazmie jest wraz z nimi aktywatorem swoistych kinaz białkowych, które poprzez fosforylację określonych białek pośredniczą w przekazywaniu sygnału mitogennego. Hipotezę taką wysunięto badając przemiany metaboliczne zachodzące w komórkach BALB/c 3T3 pod wpływem epidermalnego czynnika wzrostowego (EGF), insuliny, PDGF lub surowicy. Warto również zwrócić uwagę na fakt, że PDGF może wpływać pośrednio na poziom komórkowego cAMP. Ilość cAMP zwiększa się pod wpływem prostaglandyny E_1 (PGE), której produkcja jest pobudzana przez PDGF [88].

Ostatnie badania dowiodły, że czynnik ten przyczynia się do wzrostu ekspresji onkogenów komórkowych takich jak *c-fos* i *c-myc* [89, 90, 91, 92, 93, 94]. Pod jego wpływem dochodzi również do ekspresji genu odpowiedzialnego za syntezę interferonu oraz genu odpowiedzialnego za syntezę (2'-5')-oligoadenilanu, o których dotychczas wiadomo było, że są indukowane przez dwuniciowy RNA i wirus VSV [95].

Na zakończenie omawiania wpływu PDGF na procesy metaboliczne zachodzące w komórce można dodać, że przyspieszanie tych procesów jest wspólną cechą wielu czynników wzrostowych, szczególnie tych, które izolowano z tkanek stransformowanych [78].

V. Biologiczna rola PDGF

Głównym efektem biologicznym jaki wywołuje PDGF w komórkach docelowych jest stymulowanie syntezy DNA [76, 96] i przyspieszanie podziałów komórkowych. Efekt mitogeny PDGF ujawnia się jedynie w obecności innych występujących w plazmie regulatorów, z którymi działa synergistycznie [5, 97, 98, 99, 100], np. takich jak insulino-podobne czynniki wzrostowe. PDGF pobudzając komórki do podziałów uwrażliwia je na działanie innych czynników (np. somatomedyny C), która powoduje ich przejście w fazę S. PDGF chroni również dzielące się komórki przed wejściem w fazę spoczynkową — G_0 [101].

Drugim efektem biologicznym wywoływanym przez PDGF jest pobudzenie wędrówki (działanie chemotaktyczne — przyciągające) hodowanych komórek takich jak: monocyty, granulocyty obojętnochłonne, fibroblasty i komórki mięśni gładkich [78, 102, 103, 104]. Wszystkie one występują w miejscach powstawania stanów zapalnych i regeneracji tkanek. Mitogenne i chemotaktyczne (przyciągające) właściwości PDGF pozwalają przypuszczać, że fizjologiczna rola tego czynnika wzrostowego polega dzięki temu na przyspieszeniu procesów regeneracji i gojenia się ran oraz na ułatwianiu angiogenezy związanej z regeneracją prawidłowych tkanek.

Prawdopodobnie inne obszary cząsteczki PDGF są odpowiedzialne za chemotaktyczną i mitogenną aktywność w odniesieniu do fibroblastów a inne za działanie chemotaktyczne na monocyty [105]. Regulacja aktywności biologicznej płytkowego czynnika wzrostowego *in vivo* nie jest jeszcze poznana. Wiadomo jednak, że czas półtrwania PDGF jest niższy od dwóch minut oraz, że jest on wiązany przez białka osocza m.in. przez α_2 -makroglobulinę [106, 107, 108].

Według najnowszych danych, PDGF ze względu na swoje właściwości mitogenne i chemotaktyczne może pełnić ważną rolę w powstawaniu miażdżycy. Komórki śródbłonka, mięśni gładkich, makrofagi i płytki krwi, których migracja i proliferacja prowadzi do powstawania miażdżycy, zawierają lub są zdolne do uwalniania różnych czynników wzrostowych między innymi PDGF.

Uważa się [109], że istnieją co najmniej dwie drogi powstawania tej choroby:

- 1) w hipercholesterolemii, kiedy nie występuje uszkodzenie śródbłonka dochodzi do wzajemnego oddziaływania między pobudzonymi (w nieznanym dotąd sposób) makrofagami a płytkami krwi,

- 2) „zranienie” śródbłonka prowadzi do oddziaływania między komórkami śródbłonka, makrofagami i płytkami krwi. Następnie aktywne substancje uwalniane z rozpadających się płytek, takie jak serotonina, adrenalina i prawdopodobnie histamina zwiększają lokalną przepuszczalność śród-

blonka, ułatwiając przenikanie PDGF do ściany naczynia, gdzie wspólnie z innymi czynnikami wzrostowymi może stymulować rozplam komórek mięśni gładkich, przyspieszając powstawanie blaszki miażdżycowej [14, 110, 111].

Ostatnio wykazano [112], że PDGF ma zdolność kurczenia mięśni gładkich aorty szczura w stężeniach niższych niż angiotensyna II, która jest klasycznym peptydem zwężającym naczynia. Jednak różnice w czasie pojawiania się maksymalnego stężenia wolnego Ca^{+2} w cytosolu oraz natężenie skurczu pozwalają przypuszczać, że PDGF i angiotensyna II działają innymi drogami pośrednimi.

PDGF przyspieszać może rozwój procesu miażdżycowego również poprzez wpływ na agregację płytek. Zmiany patologiczne, do których dochodzić może w czasie procesu regeneracji naczyń krwionośnych, mogą być wynikiem zaburzenia równowagi pomiędzy poziomem tromboksanu, który powoduje agregację płytek, a poziomem prostacykliny, która jest silnym inhibitorem tego procesu. PDGF poprzez wpływ na syntezę prostaglandyn może być włączony w mechanizm regulujący agregację płytek [113].

VI. PDGF jako białkowy produkt onkogenu *c-sis*

Biologiczne i biochemiczne właściwości czynnika wzrostowego wyizolowanego z płynu hodowlanego, w którym rosły komórki ludzkiego mięsaka — ODFG opisali Heldin i w s p. [114]. Wykazano, że oczyszczony przez nich czynnik jest zasadowym, wrażliwym na redukcję, termostabilnym białkiem o Mr około 30 000. Stymuluje on wzrost fibroblastów oraz komórek glejowych, osłabiany przez surowicę anti-PDGF. Uzyskane wyniki świadczą o wysokim biologicznym i immunologicznym podobieństwie PDGF — pochodzącego z tkanki prawidłowej oraz ODFG — pochodzącego z tkanki transformowanej. Ostatnio całkowicie oczyszczono oraz zbadano sekwencję aminokwasową ODFG [115]. Z badań tych wynika, że ODFG zbudowany jest z dwóch polipeptydów homologicznych wobec łańcuchów A PDGF. Białko podobne do PDGF wyizolowano również z komórek BHK (komórki nerki zarodka chomika) transformowanych wirusem SV-40. Działało ono synergistycznie z innymi czynnikami wzrostowymi jak na przykład insulina czy EGF [116].

Na podstawie przedstawionych powyżej danych można sądzić, że gen odpowiedzialny za syntezę PDGF może pełnić ważną rolę w transformacji nowotworowej komórek. Przypuszczenie takie potwierdzić może obserwacja iż czynnik ten może przyspieszać wzrost indukowanego wirusem mięsaka Moloneya u myszy [117]. W następnych badaniach wykryto w takich nowotworach jak glejak lub mięsak mRNA dla PDGF [118, 119, 120, 121], oraz wykazano wysoki stopień homologii sekwencji polipeptydowej ludz-

kiego PDGF z sekwencją transformującego białka p28^{sis}, które jest produktem onkogenu wirusa mięsaka małp-SSV [31, 33, 122, 123, 124].

Onkogen *v-sis* produkuje transformujące białko p28^{sis}, które w odróżnieniu od wielu innych białek — produktów onkogeny nie jest fosfoproteiną. Analiza mutanta delecyjnego wirusa (nie zawierał on onkogeny *v-sis*) wykazała, że nie jest on zdolny do transformacji [124, 125]. Ponadto stwierdzono, że transformacja wywołana przez wirusa SSV może być hamowana przez przeciwciała anty-PDGF [126]. Warto dodać, że ludzki analog onkogeny *v-sis*, *c-sis* znajduje się na 22 chromosomie [77, 127].

Jak wykazały badania sekwencji i struktury Hu-PDGF jest on heterodimerem zbudowanym z dwóch łańcuchów polipeptydowych: ciężkiego A oraz lekkiego B połączonych mostkami dwusiarczkowymi [21, 23, 24, 30]. Taka budowa może nasuwać przypuszczenie, że czynnik ten kodowany jest przez dwa różne geny, z których jeden, *c-sis*, koduje prawdopodobnie prekursor łańcucha B, a inny gen łańcucha A, który jest w 60% homologiczny wobec łańcucha B [33]. W odróżnieniu od PDGF wyizolowanego z ludzkich płytek krwi, PDGF świński jest najprawdopodobniej homodimerem zbudowanym z dwóch, częściowo homologicznych w stosunku do łańcucha B Hu-PDGF, łańcuchów polipeptydowych [26]. Ta częściowa homologia może świadczyć o tym, że również PDGF pochodzący z tego źródła jest produktem onkogeny *c-sis*.

Homodimerem jest również opisywany w poprzednim rozdziale czynnik wzrostowy wyizolowany z ludzkiego mięsaka kości ODGF. W odróżnieniu jednak od Po-PDGF zbudowany on jest z dwóch polipeptydów homologicznych z łańcuchem A ludzkiego PDGF. Nie wyklucza się jednak możliwości, że komórki mięsaka syntetyzują również łańcuch B lub heterodimer AB, lecz ta postać czynnika wzrostowego może nie być wydzielana na zewnątrz komórek lub może się natychmiast wiązać z receptorami i dlatego nie można jej wykryć w płynie hodowlanym [115].

Nie wiadomo, w jaki sposób dochodzi do powstawania homodimerów w przypadku świńskiego PDGF lub ODGF. Prawdopodobnie te dwa łańcuchy (B w Po-PDGF i A w ODGF) łączą się ze sobą po translacji. Dalsze badania wykażą, który fragment polipeptydu, budującego te czynniki, jest odpowiedzialny za ich właściwości mitogenne i czy struktura tej części jest jednakowa w Hu-PDGF, Bo-PDGF oraz ODGF. Jest to bardzo prawdopodobne, ponieważ wymienione tu czynniki wzrostowe (Bo, Po- i Hu-PDGF) wykazują bardzo zbliżone powinowactwo wobec receptorów znajdujących się na błonach komórkowych ludzkich fibroblastów HAT i łożyska ludzkiego (badania własne przy zastosowaniu testu radioreceptorowego).

VII. Układ para- i autokrynnny

Czynniki wzrostowe, a wśród nich i PDGF, wykazują przypisywane hormonom właściwości biologiczne. W odróżnieniu jednak od hormonów klasycznych, produkowanych przez gruczoły wydzielania wewnętrznego i działających endokrynnie, hormony tkankowe są „hormonami lokalnymi” parakrynnymi lub autokrynnymi [38, 128, 129].

Przy omawianiu właściwości biologicznych PDGF opisano jego zdolność do przyspieszania podziałów komórek pochodzenia mezenchymalnego w kooperacji z somatomedyną C oraz jego udział w gojeniu się ran. Ponieważ w omawianych przypadkach czynnik ten działa na niewielkie odległości (wpływa na tkanki znajdujące się w jego najbliższym sąsiedztwie) możemy mówić o jego działaniu parakrynnym. Parakrynnie działają również inne czynniki wzrostowe, jak np. czynnik wzrostu komórek nerwowych (NGF), który wpływa na morfologię neurytów oraz na rozwój komórek współczulnych, erytropoetyna regulująca erytropoezę oraz interleukiny, które regulują leukopoezę [75].

Innym sposobem pobudzania komórek do podziałów jest stymulacja autokrynnna. W ten sposób pobudzane są do wzrostu te same komórki, które produkują dany czynnik i posiadają na swej powierzchni receptory wrażliwe na jego działanie. Taki rodzaj regulacji jest charakterystyczny głównie dla tkanek embrionalnych i nowotworowych. Produkują one transformujące czynniki wzrostowe, dla których komórki tych tkanek są jednocześnie komórkami docelowymi. Umożliwia im to częściowe uniezależnienie się od „hormonalnego importu” i w rezultacie nieograniczoną proliferację. Do polipeptydów, które mogą działać autokrynnie należą transformujące czynniki wzrostowe α i β , bombezyna oraz peptydy przypominające swymi właściwościami biologicznymi i budową PDGF. Zaobserwowano, że czynniki te powodują fenotypową transformację normalnych komórek docelowych, tzn. że komórki pod ich wpływem mogą wykazywać niektóre cechy morfologiczne komórek nowotworowych.

PDGF może również działać autokrynnie. Wykazano, że niektóre komórki nowotworowe mogą wykorzystywać produkowany przez siebie PDGF, co sprzyja niekontrolowanemu wzrostowi [130, 131]. Ponadto stwierdzono, że TGF β może pobudzać protoonkogen *c-sis* w mysich fibroblastach, którego produkt jest podobny do PDGF [132]. Jednakże wiadomo, że PDGF stymuluje syntezę interferonu w hodowanych komórkach Balb/c 3T3, a więc sam włącza system kontroli pobudzonego przez siebie wzrostu [95].

*Artykuł otrzymano 14 października 1986 r.
Zaakceptowano do druku 2 czerwca 1987 r.*

PIŚMIENNICTWO

1. Eagle H., (1955), *Science*, **122**, 501—507.
2. Antoniades H. N., Stathakos D., Stiles C. D., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2635—2639.
3. Balk S. D., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1689—1692.
4. Balk S. D., Whitfield J. F., Youdele T., Braun A. C., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 675—679.
5. Pledger W. J., Stiles S. D., Antoniades H. N., Scher S. D., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4481—4485.
6. Scher C. D., Stathakos D., Antoniades H. N., (1974), *Nature*, **247**, 279—281.
7. Lieberman I., Ove P., (1958), *J. Biol. Chem.*, **233**, 637—642.
8. Lieberman I., Ove P., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 2754—2758.
9. Dulbecco R., (1970), *Nature*, **227**, 802—806.
10. Kohler N., Lipton A., (1974), *Exp. Cell. Res.*, **87**, 297—301.
11. Busch C., Wasteson A., Westermark B., (1976), *Thromb. Res.*, **8**, 493—500.
12. Gerrard J. M., Philips D. R., Rao G. H. R., (1980), *J. Clin. Invest.*, **66**, 102—109.
13. Kaplan D. R., Chao F. C., Stiles C. D., Antoniades H. N., Scher C. D., (1979), *Blood*, **53**, 1043—1052.
14. Ross R., Glomset J., Kariya B., Harker L., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1207—1210.
15. Chernoff A., Levine R. F., Goodman D. S., (1980), *J. Clin. Invest.*, **65**, 926—930.
16. Ross R., Glomset J. A., (1976), *New Engl. J. Med.*, **295**, 369—377 i 420—425.
17. Antoniades H. N., Scher C. D., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1973—1977.
18. Antoniades H. N., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7314—7317.
19. Antoniades H. N., Scher C. D., Stiles C. D., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1809—1813.
20. Czyrski J. A., Narczewska B., Inglot A. D., (1984), *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **32**, 589—598.
21. Deuel T. F., Huang J. S., Proffit R. T., Baenziger J. U., Chang D., Kennedy B. B., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8896—8899.
22. Heldin C.-H., Westermark B., Wasteson A., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3722—3726.
23. Heldin C.-H., Westermark B., Wasteson A., (1981), *Biochem. J.*, **193**, 907—913.
24. Raines E. W., Ross R., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5154—5160.
25. Narczewska B., Czyrski J. A., Inglot A. D., (1985), *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, **63**, 187—194.
26. Stroobant P., Waterfield M. D., (1984), *EMBOJ.* **12**, 2963—2967.
27. Singh J. P., Chaikin M. A., Stiles C. D., (1982), *J. Cell. Biol.*, **95**, 667—671.
28. Johnsson A., Heldin C.-H., Westermark B., Wasteson A., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 66—74.
29. Heldin C.-H., Wasteson A., Westermark B., (1985), *Molec. Cell. Endocrinol.*, **39**, 169—187.
30. Antoniades H. N., Hunkapiller M. W., (1983), *Science*, **220**, 963—965.
31. Doolittle R. F., Hunkapiller M. W., Hood M. W., Devare S. G., Robbins K. C., Aaronson S. A., Antoniades H. N., (1983), *Science*, **221**, 275—277.

32. Johnsson A., Heldin C.-H., Wasteson A., Westermark B., Deuel T., Huang J. S., Seeburg P. H., Gray A., Ullrich A., Scrace G., Stoobant P., Waterfield M., (1984), *EMBO J.*, **3**, 921—928.
33. Waterfield M. D., Scrace G. T., Whittle N., Stroobant P., Johnsson A., Wasteson A., Westermark B., Heldin C.-H., Huang J. S., Deuel T., (1983), *Nature*, **304**, 35—39.
34. Barret T. B., Gajdusek C. M., Schwartz S. M., Mc Dougall J. K., Benditt E. P., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6772—6774.
35. Collins T., Ginsburg D., Boss J. M., Orkin S. H., Pober J. S., (1985), *Nature*, **316**, 748—750.
36. DiCorleoto P. E., Bowen-Pope D. F., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1919—1923.
37. Bowen-Pope D. F., Vogel A., Ross R., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2396—2400.
38. Sporn M. B., Roberts A. B., (1985), *Nature*, **313**, 745—747.
39. Seifert R. A., Schwartz S. M., Bowen-Pope D. F., (1984), *Nature*, **311**, 669—671.
40. Martient Y., Bitterman P. E., Mornex J. F., Grotendorst G. R., Martin G. R., Crystal R. G., (1986), *Nature*, **319**, 158—160.
41. Pantazis P., Lanfrancone L., Pelicci P. G., Dalla-Favera R., Antoniades H. N., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5526—5530.
- 41a. Pantazis P., Sariban E., Kufe D., Antoniades H. N., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6455—6459.
42. Heldin C.-H., Wasteson A., Westermark B., (1977), *Exp. Cell. Res.*, **109**, 429—437.
43. Heldin C.-H., Wasteson A., Westermark B., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6611—6615.
44. Rutherford R. B., Ross R., (1976), *J. Cell. Biol.*, **69**, 196—203.
45. Westermark B., Wasteson A., (1976), *Exp. Cell. Res.*, **98**, 170—174.
46. Bowen-Pope D. F., Ross R., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5161—5171.
47. Heldin C.-H., Westermark B., Wasteson A., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3664—3668.
48. Huang J. S., Huang S. S., Kennedy B., Deuel T. F., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 8130—8136.
49. Williams L. T., Tremble P., Antoniades H. N., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5867—5870.
50. Williams L. T., Tremble P. M., Lavin M. F., Sunday M. E., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 5287—5294.
51. Garret J. S., Coughlin S. R., Niman H. L., Tremble P. M., Giels G. M., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7466—7470.
52. Heldin C.-H., Wasteson A., Westermark B., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 4216—4221.
53. Rosenfeld M. E., Bowen-Pope D. F., Ross R., (1984), *J. Cell. Physiol.*, **121**, 263—275.
54. Glenn K., Bowen-Pope D. F., Ross R., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5172—5176.
55. Daniel T. O., Tremble P. M., Frackelton A. R., Jr., Williams L. T., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2684—2687.
56. Heldin C.-H., Ek B., Rönnstrand L., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 10054—10061.
57. Cooper J. A., Bowen-Pope D. F., Raines E., Hunter T., (1982), *Cell*, **31**, 263—273.

58. Ek B., Heldin C.-H., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 10486—10492.
59. Ek B., Westermark B., Wasteson A., Heldin C.-H., (1982), *Nature*, **295**, 419—420.
60. Huang S. S., Huang J. S., Deuel T. F., (1984), *Cancer Cell*, **1**, 43—49.
61. Nishimura J., Huang J. S., Deuel T. F., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4303—4307.
62. Pike L. J., Bowen-Pope D. F., Ross R., Krebs E., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 9383—9390.
63. Kasuga M., Zick Y., Blithe D. L., Crettaz M., Kahn C. R., (1982), *Nature*, **298**, 667—669.
64. King G. L., Kahn C. R., Heldin C.-H., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1308—1312.
65. Ullrich A., Bell J. R., Chen E. Y., Herrera R., Petruzelli L. M., Dull T. J., Gray A., Coussens L., Liao Y. C., Tsubokawa M., Mason A., Seeburg P. H., Grunfield C., Rosen O. M., Ramachandran J., (1985), *Nature*, **313**, 756—761.
66. Cohen S., Carpenter G., King L., Jr., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4834—4842.
67. Coussens L., Van Beveren Ch., Smith D., Chen E., Mitchell R. L., Isacke C. M., Verma I. M., Ullrich A., (1986), *Nature*, **320**, 277—280.
68. Yarden Y., Escobedo J. A., Kuang W.-J., Yang-Feng T. L., Daniel T. O., Tremble P. M., Chen E. Y., Ando M. E., Harkins R. N., Francke U., Fried V. A., Ullrich A., Williams L. T., (1986), *Nature*, **323**, 226—232.
69. Ullrich A., Gray A., Tam A. W., Yang-Feng T., Tsubokawa M., Collins C., Henzel W., Le Bon T., Kathuria S., Chen E. Y., Jacobs S., Francke U., Ramachandran J., Fujita-Yamaguchi Y., (1986), *EMBO J.*, **2503—2512**.
70. Assoian R. K., Grotendorst G. R., (1984), *Nature*, **309**, 804—806.
71. Wharton W., Leaf E., Pledger W. J., Keefe E. J., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5567—5571.
72. Wrann M., Fox C. F., Ross R., (1980), *Science*, **210**, 1363—1364.
73. Rozengurt E. M., Collins K. D., Brown K. D., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 3680—3686.
74. Rozengurt E., Brawn K. D., Pettican P., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 716—722.
75. Hollenberg M. D., (1985), *Trends Pharmacol., Sci.*, **6**, 242—245.
76. Hock R. A., Hollenberg M. D., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10731—10736.
77. Canalis E., (1981), *Metabolism*, **30**, 970—975.
78. Deuel T. F., Huang J. S., (1984), *J. Clin. Invest.*, **74**, 669—676.
79. Owen A. J. III, Geyer R. P., Antoniades H. N., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3202—3207.
80. Schneider J. A., Doamont J., Rozengurt E., (1979), *J. Biol. Chem.*, **253**, 872—877.
81. Nishimura J., Deuel T. F., (1983), *FEBS*, **156**, 130—133.
82. Baker P. F., (1986), *Nature*, **320**, 395.
83. Gill L. D., Ueda T., Chueh S. H., Noel M. W., (1986), *Nature*, **320**, 461—464.
84. Habenich A. J. R., Glomset J. A., King W. C., Nist C., Mitchel O., Ross R., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 12329—12335.
85. Coughlin S. R., Moskowitz M. A., Zeffer B. R., Antoniades H. N., Levin L., (1980), *Nature*, **228**, 600—601.
86. Shier W. T., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 137—141.

87. Rozengurt E., Stoobant P., Waterfield M. D., Deuel T. F., Keehan M., (1983), *Cell*, **34**, 265—272.
88. Kelly K., Cochran B. H., Stiles C. D., Leder P., (1983), *Cell*, **35**, 603—610.
89. Greenberg M. E., Ziff E. B., (1984), *Nature*, **311**, 433—438.
90. Muller R., Bravo R., Burckhardt J., Curran T., (1984), *Nature*, **312**, 716—720.
91. Kruijjer W., Cooper J. A., Hunter T., Verma I. M., (1984), *Nature*, **312**, 711—716.
92. Goustin A. S., Betsholtz C., Pfeifer-Ohlsson S., Persson H., Rydnert J., Bywater M., Holmgren G., Heldin C. H., Westermark B., Ohlsson R., (1985), *Cell*, **41**, 301—312.
93. Armelin H. A., Armelin M. C. S., Kelly K., Stewart T., Leder P., Cochran B. H., Stiles C. D., (1984), *Nature*, **310**, 655—660.
94. Cochran B. H., Zullo J., Verma I. M., Stiles C. D., (1984), *Science*, **226**, 1080—1082.
95. Zullo J. N., Cochran B. H., Huang A. S., Stiles C. D., (1985), *Cell*, **43**, 793—800.
96. Nilson J., Olsson A. G., (1984), *Atherosclerosis*, **53**, 77—82.
97. Scher C. D., Shepard R. C., Antoniades H. N., Stiles C. D., *Biochim., Biophys. Acta*, **560**, 217—241.
98. Stiles C. D., Isberg R. R., Pledger W. J., Antoniades H. N., Scher C. D., (1979), *J. Cell. Physiol.*, **99**, 395—406.
99. Stiles C. D., Capone G. T., Scher C. D., Antoniades H. N., Wyk J. J., Pledger W. J., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1279—1283.
100. Van Damme J., De Ley M., Opdenakker G., Billiau A., De Somer P., Van Beeuman J., (1985), *Nature*, **314**, 266—269.
101. Scher C. D., Stone M. E., Stiles C. D., (1979), *Nature*, **281**, 390—392.
102. Deuel T. F., Senior R. M., Huang J. S., Griffin G. L., (1982), *J. Clin. Invest.*, **69**, 1046—1049.
103. Grotendorst G. R., Chang T., Seppa H. E. J., Kleinman H. K., Martin G. R., (1982), *J. Cell. Physiol.*, **113**, 261—266.
104. Senior M. R., Griffin G. L., Huang J. S., Walz D. A., Deuel T. F., (1983), *J. Cell. Biol.*, **96**, 382—385.
105. Senior R. M., Huang J. S., Griffin G. L., Deuel T. F., (1985), *J. Cell. Biol.*, **100**, 351—356.
106. Boven-Pope D. F., Malpass T. W., Foster D. M., Ross R., (1984), *Blood*, **64**, 458—469.
107. Huang J. S., Huang S. S., Deuel T. F., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 342—346.
108. Raines E. W., Bowen-Pope D. F., Ross R., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3424—3428.
109. Ross R., (1986), *New Engl. J. Med.*, **314**, 488—500.
110. Ross R., Harker L., (1976), *Science*, **193**, 1094—1099.
111. Weinstein R., Stemarman M. B., Maciag T., (1981), *Science*, **212**, 818—820.
112. Berk B. C., Aleksander R. W., Brosk T. A., Gimbrone M. A. Jr., Webb R. C., (1986), *Science*, **232**, 87—90.
113. Gryglewski R., (1981), w: *Prostacyklina a miażdżycy*. Wrocław, Zakład Narodowy im. Ossolińskich, str. 1—73.
114. Heldin C.-H., Westermark B., Wasteson A., (1980), *J. Cell. Physiol.*, **105**, 235—246.
115. Heldin C.-H., Johnsson A., Wennergren S., Wernstedt C., Betsholtz C., Westermark B., (1986), *Nature*, **319**, 511—514.

116. Dicker Ph., Pohjanpelto F., Pettican P., Rozengurt E., (1981), *Exp. Cell. Res.*, **135**, 221—227.
117. Inglot A. D., Inglot O., (1981), *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **29**, 431—437.
118. Betsholtz C. H., Heldin C.-H., Nister M., Ek. B., Westermark B., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **117**, 176—182.
119. Graves D. T., Owen A. J., Barth R. K., Tempst P., Winoto A., Fors L., Hood L. E., (1984), *Science*, **226**, 972—974.
120. Nister M., Heldin C.-H., Wasteson A., Westermark B., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 926—930.
121. Pantazis P., Pelicci P. G., Dalla-Favera R., Antoniades H. N., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2404—2408.
122. Deuel T. F., Huang J. S., Huang S. S., Stroobant P., Waterfield M. D., (1983), *Science*, **221**, 1348—1350.
123. Devare S. G., Reddy E. P., Law J. D., Robbins K. C., Aaronson S. A., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 731—735.
124. Robbins K. C., Devare S. G., Reddy P. E., Aaronson S. A., (1982), *Science*, **218**, 1131—1133.
125. Robbins K. C., Antoniades H. N., Devare S. G., Hunkapiller M. W., Aaronson S. A., (1983), *Nature*, **305**, 605—608.
126. Johnsson A., Betsholtz Ch., Heldin C.-H., Westermark B., (1985), *Nature*, **317**, 438—440.
127. Dalla-Favera R., Gelman E. P., Gallo R. C., Wong-Staal F., (1981), *Nature*, **292**, 31—35.
128. Sporn M. B., Todaro G. J., (1980), *N. Engl. J. Med.*, **303**, 878—880.
129. Stiles C. D., (1984), *Nature*, **311**, 604—605.
130. Heldin C.-H., Westermark B., w Oncogenes and growth control, Eds. P. Hahn and T. Graf, Springer Verlag, Heidelberg w druku.
131. Goustin A. S., Leof E. B., Shipley G. D., Moses H. L., (1986), *Cancer Res.*, **46**, 1015—1029.

- 116 The
- 117 The
- 118 The
- 119 The
- 120 The
- 121 The
- 122 The
- 123 The
- 124 The
- 125 The
- 126 The
- 127 The
- 128 The
- 129 The
- 130 The
- 131 The
- 132 The
- 133 The
- 134 The
- 135 The
- 136 The
- 137 The
- 138 The
- 139 The
- 140 The
- 141 The
- 142 The
- 143 The
- 144 The
- 145 The
- 146 The
- 147 The
- 148 The
- 149 The
- 150 The
- 151 The
- 152 The
- 153 The
- 154 The
- 155 The
- 156 The
- 157 The
- 158 The
- 159 The
- 160 The
- 161 The
- 162 The
- 163 The
- 164 The
- 165 The
- 166 The
- 167 The
- 168 The
- 169 The
- 170 The
- 171 The
- 172 The
- 173 The
- 174 The
- 175 The
- 176 The
- 177 The
- 178 The
- 179 The
- 180 The
- 181 The
- 182 The
- 183 The
- 184 The
- 185 The
- 186 The
- 187 The
- 188 The
- 189 The
- 190 The
- 191 The
- 192 The
- 193 The
- 194 The
- 195 The
- 196 The
- 197 The
- 198 The
- 199 The
- 200 The

BARBARA RZESZOTARSKA*,
ZBIGNIEW KUBICA**,
JERZY TARNAWSKI***

O wpływie reszt α, β -dehydroaminokwasowych na aktywność biologiczną peptydów

On the influence of α, β -dehydroamino acid residues on peptide biological activity

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Rola reszt α, β -dehydroaminokwasowych w naturalnych α, β -dehydropeptydach
- III. Efekt biologiczny α, β -odwodorowania naturalnych peptydów lub ich analogów
 - III-1. α, β -dehydro-enkefaliny i -substancja P
 - III-2. α, β -dehydrohormony
 - III-3. Inhibitory enzymów
 - III-4. α, β -dehydroantybiotyki
- IV. Syntetyczne α, β -dehydropeptydy aktywujące funkcję cytotoksyczną makrofagów
- V. Właściwości α, β -dehydroaminokwasów wpływające na aktywność biologiczną związków
- VI. Uwagi końcowe

Contents

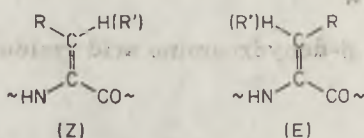
- I. Introduction
- II. A role of α, β -dehydroamino acid residues within natural α, β -dehydropeptides
- III. Biological effect of α, β -dehydrogenation of natural peptides or their analogues
 - III-1. α, β -dehydro-enkephalins and -substance P
 - III-2. α, β -dehydrohormones
 - III-3. Enzyme inhibitors
 - III-4. α, β -dehydroantibiotics
- IV. Synthetic α, β -dehydropeptides activating a cytotoxic function of macrophages
- V. Properties of α, β -dehydroamino acids affecting a biological activity of compounds
- VI. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: Δ — przed symbolem aminokwasu oznacza obecność w cząsteczce wiązania podwójnego między węglem α a β , Abu — kwas α -aminomasłowy, Dpr — kwas α, β -diaminopropionowy, MeAla — N-metyloalanina, 3^o-MeHis — τ -metylohistydyna, MePhe — N-metylofenyloalanina, Met(O)-ol — S-tlenek metioninolu, Orn — ornityna, Sar — sarkozyna.

* Prof. dr hab., ** Dr, *** Mgr, Instytut Chemii, Wyższa Szkoła Pedagogiczna, ul. Oleska 48, 45-052 Opole

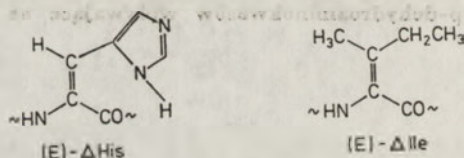
I. Wstęp

α , β -dehydroaminokwasy wyróżniają się wśród naturalnych α -aminokwasów tym, że obok grup α -aminowej i α -karboksylowej (oraz ewentualnie innych znajdujących się w łańcuchach bocznych) mają zawsze wiązanie podwójne między atomem węgla α a β . Pierwszą oczywistą konsekwencją tego faktu jest to, że — w miejsce izomerii optycznej L lub D innych α -aminokwasów — w cząsteczkach α , β -dehydroaminokwasów występuje izomeria geometryczna (Z) lub (E) (Ryc. 1). Spośród izomerów geometrycz-



Ryc. 1. Izomeria (Z) i (E) α , β -dehydroaminokwasów. R i R' rodniki alifatyczne lub aromatyczne. R większe od R' według reguł pierwszeństwa.

nych w materiale biologicznym spotyka się przede wszystkim izomery (Z) dehydroaminokwasów, a tylko w nielicznych antybiotykach — izomery (E), mianowicie w rokfortynie (ang. roquefortine) i oksalinie stwierdzono (E)- Δ His [1] oraz w antrymycynach, które okazały się identyczne z cyrratiomycynami (ang. antrimycins i cirratiomycins) — (E)- Δ Ile [2] (Ryc. 2). Po-



Ryc. 2. Reszta (E)- α , β -dehydrohistydyny i reszta (E)- α , β -dehydroizoleucyny.

nadto sugeruje się, że reszta (E)-Ile występuje też w MC-toksynie (toksyna wytwarzana przez *Helminthosporium carbonum*) [3]. Umieszczenie trzech grup funkcyjnych w pozycji- α dehydroaminokwasu daje znaczne możliwości sprzężeń elektronowych między nimi [4—11], a to z kolei możliwości następstw chemicznych, fizykochemicznych i sterycznych, omówionych w rozdziale V.

Zainteresowanie związkami zawierającymi reszty α , β -dehydroaminokwasowe sięga lat trzydziestych. Jednak dopiero współczesne sprawne techniki rozdzielania pozwoliły na wyodrębnienie ze źródeł naturalnych wielu α , β -dehydropeptydów, α , β -dehydropiperazyno-2,5-dionów i pochodnych α , β -dehydroaminokwasowych, a sprawne techniki badania struktury — na opis budowy tych związków. Związki, o których mowa, znajduje się głównie w produktach metabolizmu drobnoustrojów. Lecz spotyka się je także w roślinach wyższych i w organizmach zwierzęcych. α , β -dehydropeptydy — to przeważnie oligopeptydy i najczęściej cykliczne. Znane są jednak

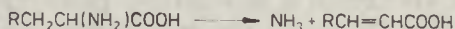
i α, β -dehydropolipeptydy i α, β -dehydrobiałka. Związki zawierające reszty α, β -dehydroaminokwasowe mają różnorodną aktywność biologiczną. Są antybiotykami, alkaloidami, fitotoksynami, prohormonami, inhibitorami wzrostu, inhibitorami lub grupami prostetycznymi enzymów [1—6, 12—43]. Niektóre pochodne α, β -dehydroaminokwasów, α, β -dehydropiperazy-no-2,5-diony i α - β -dehydrooligopeptydy wykazują czynność przeciwnowotworową o potencjalnej lub faktycznej użyteczności farmakologicznej [4, 6, 13—16]. Takim stosowanym od dawna w leczeniu antybiotykiem przeciwnowotworowym jest bleomycyna ze *Streptomyces verticillus* [13, 15, 16]. Do używanych przez medycynę α, β -dehydropeptydowych antybiotyków należą też antybiotyki przeciwgruźlicze, kapreomycyna produkowana przez *Streptomyces capreolus* [17a] i wiomycyna wytwarzana przez *Streptomyces griscoverticillatus* [17a, 18]. Ponadto α, β -dehydropeptydami są cefalosporyny tak naturalne, jak półsyntetyczne [17b, 19, 20]. Inny α, β -dehydropeptydowy antybiotyk, nizynę (*Streptococcus lactis*) stosuje się do konserwacji serów [21].

Wyrazem wzrostu zainteresowania α, β -dehydroaminokwasami i peptydami zawierającymi reszty takich aminokwasów są między innymi trzy obszernie monografie na ich temat, z przełomu lat siedemdziesiątych/osiemdziesiątych oraz z początku lat osiemdziesiątych. W opracowaniach tych omawia się przede wszystkim występowanie w przyrodzie α, β -dehydroaminokwasów i peptydów, metody identyfikacji i syntezy pierwszych z nich oraz ich rolę w przemianach metabolicznych, synteze i reaktywność chemiczną substancji modelowych zawierających reszty α, β -dehydroaminokwasowe, jak i synteze biologicznie aktywnych peptydów z resztami α, β -dehydroaminokwasowymi [4—6]. Najnowszy z cytowanych artykułów [6] wzmiankuje o zależności między strukturą a aktywnością α, β -dehydropeptydów. Celem niniejszego opracowania jest rozwinięcie tego ostatniego tematu i wzbogacenie go o dodatkowe oraz najświeższe dane.

II. Rola reszt α, β -dehydroaminokwasowych w naturalnych α, β -dehydropeptydach

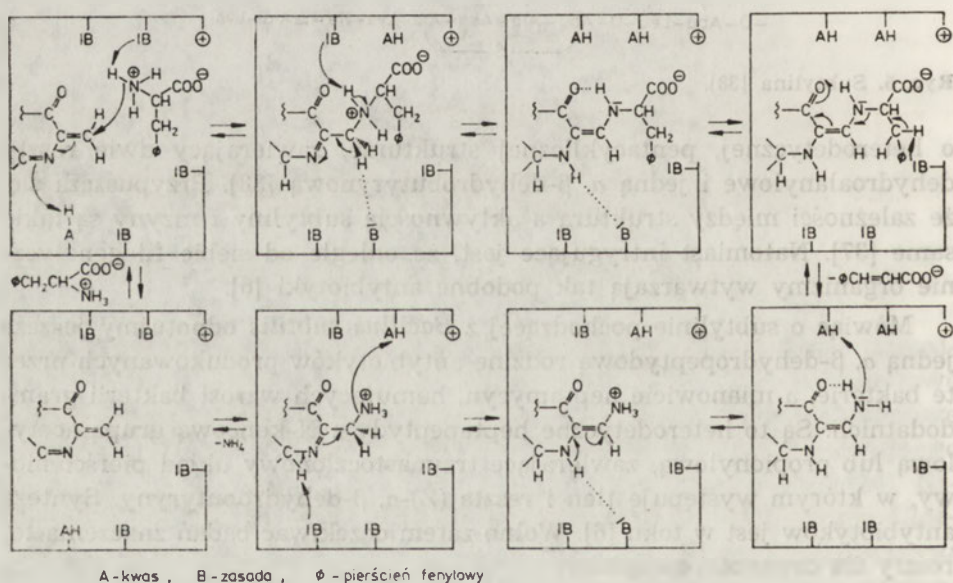
Niezbędnym pierwszym krokiem w badaniu roli reszt α, β -dehydroaminokwasowych w naturalnych peptydach jest przeprowadzenie reakcji addycji do wiązania podwójnego i badanie aktywności biologicznej otrzymanych związków. Najczęściej przyłącza się wodór [6, 22—24] lub tryt [25—27], czasami związki tiolowe [28] lub znakowany ^{14}C nitrometan [25, 29]. Inny sposób — to wbudowanie w drodze syntezy chemicznej w miejsce aminokwasu nienasyconego analogicznego aminokwasu nasyconego L lub D [6, 24] albo czasami innego aminokwasu nienasyconego [30]. W przypadku polipeptydów można selektywnie rozszczepić łańcuch peptydowy w celu ustalenia fragmentu odpowiedzialnego za czynność biologiczną [31,

Enzymy zwane amoniako-liazami L-aminokwasów (EC 4.3.1) katalizują eliminację z cząsteczki α -aminokwasu amoniaku i powstanie odpowiedniego α , β -dehydrokwasu (Ryc. 6). Wykryto je w tkankach zwierzęcych [29], materiale roślinnym [27] i w bakteriach [25, 26]. Brak niektórych z wy-



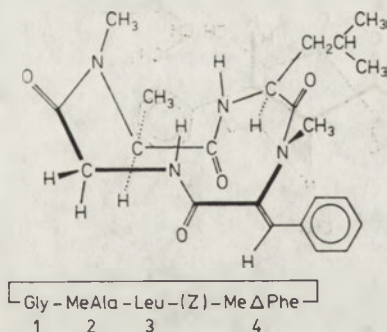
Ryc. 6. Tworzenie się amoniaku i α , β -dehydrokwasu z α -aminokwasu.

mienionych enzymów może być przyczyną chorób. Np. brak amoniako-liazy L-histydyny (EC 4.3.1.3) powoduje u ludzi histydynemię [29]. Badanie aktywności dwóch z nich, amoniako-liazy L-histydyny (EC 4.3.1.3) pochodzenia bakteryjnego [25, 26] i ssaczego [29] oraz amoniako-liazy L-feniloalaniny (EC 4.3.1.5) pochodzenia roślinnego [27] doprowadziło do wniosku, że w ich centrum aktywnym znajduje się reszta dehydroalaniny. Podstawą tego poglądu jest obserwacja zanikania aktywności enzymów po działaniu odczynników, które wybiórczo reagują z wiązaniem podwójnym między atomami węgla. Po hydrolizie zdezaktywowanego enzymu wyodrębnia się produkty przyłączenia do podwójnego wiązania dehydroalaniny. Sądzi się, że grupa aminowa tego aminokwasu tworzy najprawdopodobniej zasadę Schiffa z jakimś związkiem karbonylowym, a hipotetyczny mechanizm katalitycznej eliminacji amoniaku z cząsteczki substratu [27] przedstawia (Ryc. 7).



Ryc. 7. Hipotetyczny mechanizm reakcji eliminacji amoniaku z cząsteczki feniloalaniny w obecności amoniako-liazy L-feniloalaniny (EC 4.3.1.5) (według [27] zmodyfikowane). A — kwas; B — zasada; ϕ — pierścień fenylowy.

Grzyb *Alternaria tenuis* produkuje tentoksynę (Ryc. 8), cykliczny tetrapeptydowy toksyczny metabolit wywołujący chlorozę kiełkujących nasion roślin niektórych gatunków. Tentoksyna zawiera resztę (Z)-N-metylodehydrofenyloalaniny [39]. W celu wyjaśnienia zależności między budo-

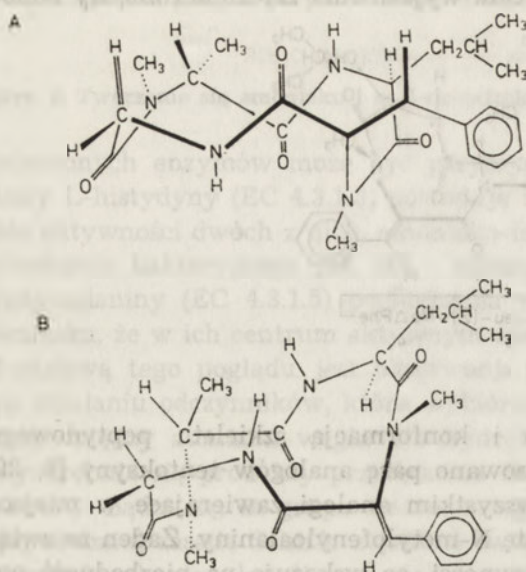


Ryc. 8. Konformacja tentoksyny [39]

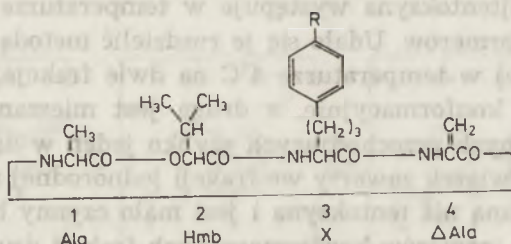
wą jej reszt aminokwasowych i konformacją szkieletu peptydowego a czynnością biologiczną zsyntezowano parę analogów tentoksyny [6, 39, 40]. Wśród nich były przede wszystkim analogi zawierające w miejsce aminokwasu nienasyconego resztę N-metylofenyloalaniny. Żaden ze związków nasyconych nie miał aktywności, co wskazuje na niezbędność podwójnego wiązania w pozycji 4 dla działania biologicznego [6, 40]. Jeden z analogów, [D-MeAla²]tentoksyna występuje w temperaturze 25°C jako mieszanina trzech konformerów. Udało się je rozdzielić metodą chromatografii cienkowarstwowej w temperaturze 4°C na dwie frakcje, z których jedna jest jednorodna konformacyjnie, a druga jest mieszaniną dwóch izomerów konformacyjnych przechodzących szybko jeden w drugi w warunkach normalnych. Związek zawarty we frakcji jednorodnej ma konformację (Ryc. 9,A) [40] inną niż tentoksyna i jest mało czynny biologicznie [41]. Natomiast jeden z izomerów konformacyjnych frakcji drugiej wykazuje w sąsiedztwie reszty N-metylodehydrofenyloalaniny konformację (Ryc. 9,B) [40] analogiczną do związku naturalnego. Frakcja ta ma także i aktywność biologiczną zbliżoną do aktywności związku naturalnego [41]. Uwodornienie w cząsteczce analogu, o którym mowa, podwójnego wiązania N-metylodehydrofenyloalaniny daje związek o konformacji innej [40] niż tentoksyna. Zatem rola reszty (Z)-N-metylodehydrofenyloalaniny, strukturotwórcza dla aktywnej konformacji tej fitotoksyny, wydaje się udowodniona.

Badano także zależność struktura — aktywność AM-toksyn, produkowanych przez grzyby *Alternaria mali* i powodujących nekrozę liści jabłoni niektórych odmian. AM-toksyny są cyklicznymi tetradepsipeptydami zawierającymi resztę dehydroalaniny. Wyodrębniono trzy związki różniące się budową bocznego łańcucha w pozycji 3 (Ryc. 10) [6]. [D-Ala⁴]AM-toksyna I ma aktywność 2000—5000 razy mniejszą niż związek macierzysty,

a [Ala⁴]AM-toksyna I nie jest w ogóle toksyczna [24]. [(Z)- Δ Abu⁴]AM-toksyna I jest też nieaktywna. Sądzi się, że w tym ostatnim przypadku brak toksyczności wynika albo ze zmiany konformacyjnej, która chociaż nie-



Ryc. 9. Konformery (D-MeAla⁴)-tossyny: A — biologicznie nieaktywny, B — jeden z dwóch występujących we frakcji biologicznie aktywnej [40].



AM-toksyna	R	X = kwas
I	OCH ₃	L-2-amino-5-(4-metoksyfenyl)pentanowy
II	H	L-2-amino-5-fenylpentanowy
III	OH	L-2-amino-5-(4-hydroksyfenyl)pentanowy

Ryc. 10. AM-toksyny [6].

wielka, może być istotna, albo z braku chemicznej reaktywności reszty (Z)- Δ Abu⁴ z miejscem receptorowym w przeciwieństwie do domniemanej reaktywności reszty Δ Ala⁴ [30]. Wykazano dalej, że dla aktywności biologicznej AM-toksyn ważna jest też długość łańcucha alifatycznego w pozycji 3. Ponadto wydaje się, że niezbędne jest współdziałanie reszt 3 i 4 [42]. Tak więc dla aktywności AM-toksyny reszta dehydroalanylowa jest istotna. Jednak wyjaśnienie jej roli wymaga dalszych badań [43].

Kończąc omówienie α, β -dehydrofitotoksyn, wymienimy jeszcze jedną, mianowicie HC-toksynę, wytwarzaną przez grzyb *Helminthosporium carbonum* Ullstrup i toksyczną dla ziarn kukurduzy o stopniu dojrzałości szklistej. Struktura związku nie jest znana. Wiadomo tylko, że cząsteczka jest cykliczna i zbudowana z pięciu reszt aminokwasowych, wśród których znajduje się (E)- α, β -dehydroizoleucyna. Uwodorowanie tej ostatniej pozabawia związek aktywności [3].

III. Efekt biologiczny α, β -odwodorowania naturalnych peptydów lub ich analogów

Skoro wykazano, że reszty α, β -dehydroaminokwasowe mogą być niezbędne dla biologicznej aktywności niektórych peptydów, to podjęto syntezę α, β -dehydroanalogów tych aktywnych peptydów, które w stanie naturalnym wiązania podwójnego nie mają. Przedmiotem modyfikacji są przede wszystkim hormony, a następnie neuromediatory, neuromodulatory, substraty enzymów, antybiotyki, a także analogi tych wszystkich związków. W wymienionych cząsteczkach modyfikuje się aminokwasy istotne dla działania biologicznego, co może dostarczyć dalszych informacji o zależności między strukturą a aktywnością badanych peptydów, a także doprowadzić do uzyskania produktów o lepszych właściwościach terapeutycznych niż przed modyfikacją [5].

III-1. α, β -dehydro-enkefalin i -substancja P

Enkefalin są pentapeptydami o sekwencjach:

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met

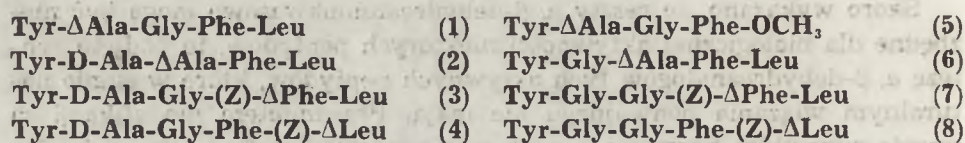
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

o działaniu podobnym do opiatów [44—49a]. Silnie aktywne biologicznie analogi enkefalin zawierają w pozycji-2 resztę D-aminokwasu, zwłaszcza D-Ala [44, 45, 49a, 50]. Nieduża masa cząsteczkowa związków czyni stosunkowo łatwą syntezę chemiczną ich analogów i dlatego najobszerniejszy materiał eksperymentalny z zakresu α, β -dehydromodyfikacji peptydów dotyczy właśnie enkefalin.

Modyfikacja amidu [D-Ala²]Met-enkefalin przez wbudowanie (Z)- Δ Phe w pozycję 4, jak się przypuszcza istotną do indukcji konformacji aktywnej biologicznie [51—54], doprowadziła do otrzymania amidu [D-Ala², (Z)- Δ Phe⁴]Met-enkefalin pięciokrotnie bardziej czynnego przeciwbólowo niż związek wyjściowy [55—57], najprawdopodobniej dzięki zarówno podwyższonej oporności na hydrolizę enzymatyczną, jak i zwiększonemu powinowactwu do receptora [55]. Również peptyd Tyr-D-Ala-

Gly-(Z)- Δ Phe-Met(O)-ol jest tak samo wysoko aktywny, jak peptyd macierzysty [Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Met(O)-ol] [54]. Natomiast inny analog Met-enkefalin, w którym pierścień fenyłowy reszty 4 jest — tak jak w analogach z resztą (Z)- Δ Phe⁴ — skierowany do azotu, lecz nie ma możliwości rotacji, ma znacznie niższe powinowactwo do receptora i jest nieaktywny *in vivo*. Stąd wniosek, że aby cząsteczka enkefaliny mogła reagować z receptorem, pierścień fenyłowy reszty 4 winien być skierowany do jej azotu, lecz mieć możliwość swobodnej rotacji [54].

α , β -dehydromodyfikacje Leu-enkefaliny objęły wszystkie jej pozycje, z wyjątkiem pierwszej, gdyż synteza [Δ Tyr¹]Leu-enkefaliny się nie powiodła [58]. Modyfikowano zarówno [D-Ala²]Leu-enkefalinę, jak i cząsteczkę natywną ([Gly²]). Otrzymano:



Badano aktywność uzyskanych związków stosując test wiązania z receptorami δ wobec [³H]Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu ([³H]DADLE) i z receptorami μ wobec [³H]dihydromorfiny ([³H]DHM). Aktywność wyrażono w ED₅₀ (dawka powodująca 50% hamowania wiązania z receptorem a więc im mniejsze ED₅₀, tym większa aktywność). Za miarę selektywności oddziaływania peptydów z receptorami przyjęto stosunek ED₅₀ receptorów μ do ED₅₀ receptorów δ . Otrzymane wyniki zebrano w Tabelach 1 i 2 oraz pokazano na (Ryc. 11 i 12) [51, 52, 59—62].

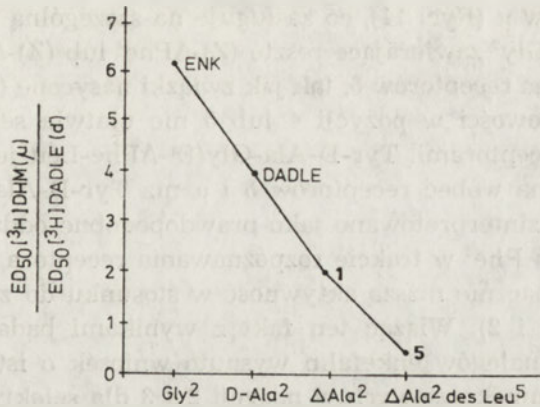
Tabela 1

Powinowactwo [D-Ala²]Leu-dehydroenkefalin do receptorów δ i μ (według [51] zmodyfikowane)

Analog enkefaliny		δ ([³ H]DADLE) ED ₅₀ % DADLE		μ ([³ H]DHM) ED ₅₀ % DADLE		Selektywność μ/δ
(1)	Tyr- Δ Ala-Gly-Phe-Leu	2.8	68	6.1	125	2.2
(2)	Tyr-D-Ala- Δ Ala-Phe-Leu	4.5	42	26	29	5.8
(3)	Tyr-D-Ala-Gly-(Z)- Δ Phe-Leu	1.9	100	6.4	119	3.4
(4)	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-(Z)- Δ Leu	2.5	76	8.7	87	3.5
(5)	Tyr- Δ Ala-Gly-Phe-OMe	180	1	76	10	0.4
(DADLE)	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu	1.9	100	7.6	100	4.0

DHM — dehydromorfina

Zastąpienie D-Ala² przez Δ Ala² (1), Phe⁴ przez (Z)- Δ Phe⁴ (3) i Leu⁵ przez (Z)- Δ Leu⁵ (4) praktycznie nie zmienia aktywności biologicznej peptydu. Z tabeli 1 i 2 widać, że enkefaliny generalnie mają większe powinowactwo do receptorów δ niż do receptorów μ . Jednak wzrost hydrofobowości reszty aminokwasowej w pozycji 2 przesuwa selektywność w kie-



Ryc. 11. Selektywność receptorowa Leu-enkefalin jako funkcja modyfikacji jej pozycji-2 [51]. DHM — dihydromorfina, DADLE — Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu, ENK — enkefalina. Inne objaśnienia w tekście i w Tabelach 1 i 2.

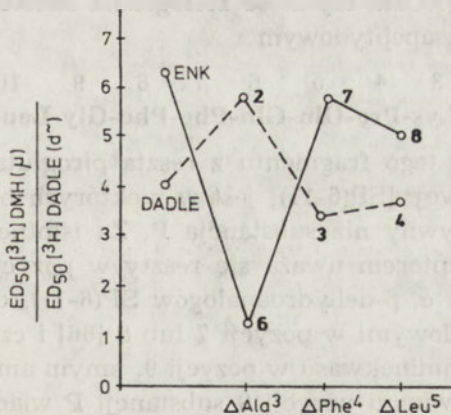
Tabela 2

Powinowactwo [Gly²]Leu-dehydroenkefalin do receptorów δ i μ (według [51]) zmodyfikowane

Analog enkefalin	δ([³ H]DADLE)		μ([³ H]DHM)		Selektywność μ/δ
	ED ₅₀ % ENK	ED ₅₀ % ENK	ED ₅₀ % ENK	ED ₅₀ % ENK	
(6) Tyr-Gly-ΔAla-Phe-Leu	62	4	80	19	1.3
(7) Tyr-Gly-Gly-(Z)-ΔPhe-Leu	3.8	63	21	71	5.5
(8) Tyr-Gly-Gly-Phe-(Z)-ΔLeu	6.6	36	32	47	4.8
(ENK) Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	2.4	100	15	100	6.2

DADLE — Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu;

DHM — dihydromorfina.

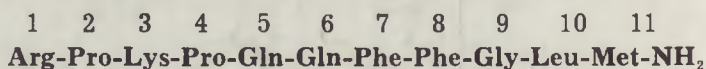


Ryc. 12. Selektywność receptorowa Leu-enkefalin serii Gly² (—) i serii D-Ala² (---) jako funkcja miejsca nienasyceń w łańcuchu peptydowym [51]. DHM — dihydromorfina, DADLE — Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu, ENK — enkefalina. Inne objaśnienia w tekście i w Tabelach 1 i 2.

runku receptorów μ (Ryc. 11), co zasługuje na szczególną uwagę. Analogi czy D-Ala², czy Gly² zawierające resztę (Z)- Δ Phe⁴ lub (Z)- Δ Leu⁵ wykazują preferencję wobec receptorów δ , tak jak związki nasycone (Ryc. 12). Zatem wzrost hydrofobowości w pozycji 4 lub 5 nie ułatwia selektywnego oddziaływania z receptorami. Tyr-D-Ala-Gly(E)- Δ Phe-Leu jest 150—260 razy mniej aktywna wobec receptorów δ i μ niż Tyr-D-Ala-Gly-(Z)- Δ Phe-Leu. Wynik ten zinterpretowano jako prawdopodobne oddziaływanie między resztą Tyr¹ a Phe⁴ w trakcie rozpoznawania receptora [63]. [Δ Ala³]enkefalin mają znacznie niższą aktywność w stosunku do związków odniesienia (Tabela 1 i 2). Wiążąc ten fakt z wynikami badania aktywności jeszcze innych analogów enkefalin wysnuto wniosek o istotności ścisłego związku reszt aminokwasowych w pozycji 2 i 3 dla selektywności oddziaływania receptorowego oraz o bardzo specyficznych oddziaływaniach reszty Gly³ z receptorami δ [60]. Stereochemia reszty 5 nie jest istotna dla czynności enkefalin, gdyż porównywalne analogi niezależnie od tego czy zawierają w pozycji 5 Leu, D-Leu, czy (Z) Δ Leu, mają aktywność podobną [51].

Badano też podatności α , β -dehydroenkefalin na działanie hydrolaz. Amid [D-Ala², (Z)- Δ Phe⁴]Met-enkefalin jest odporny na trawienie chymotrypsyną (30 godzin w temperaturze 37°C) [55, 56] i termolizyną [56]. [D-Ala², (Z)- Δ Leu⁵]Enkefalina jest odporna na działanie karboksypeptydazy Y (3 godziny w temperaturze 25°C), a [D-Ala², (Z)- Δ Phe⁴]Leu-enkefalina w tych warunkach ma odporność zredukowaną dziesięciokrotnie w stosunku do analogu nasyconego [61, 64].

Substancja P — to undekapeptyd, któremu przypisuje się funkcję neuromodulatora i neuromediatora. Szerokie spektrum jej efektów fizjologicznych i farmakologicznych obejmuje także i właściwość obniżania ciśnienia krwi [45, 65]. Cała czynność biologiczna substancji P zawarta jest w C-końcowym heksapeptydowym



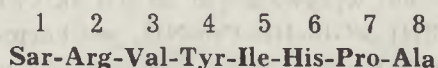
fragmencie. Analog tego fragmentu z resztą piroglutamyłową w miejsce reszty glutaminyłowej⁹ [SP(6-11)] jest w niektórych badaniach testowych nawet bardziej aktywny niż substancja P. Za istotne dla oddziaływania substancji P z receptorem uważa się reszty w pozycjach 7, 8 i 11 [45]. Zsyntezowano sześć α , β -dehydroanalogów SP(6-11), dwa z resztami (Z)-dehydrofenyloalanyłowymi w pozycji 7 lub 8 [66] i cztery z drugim jeszcze podstawieniem aminokwasu w pozycji 9, innym aminokwasem nasyconym [67]. O podstawieniu pozycji 9 substancji P wiadomo, że jako pojedyncze nie wpływa lub wpływa bardzo mało na właściwość obniżania ciśnienia krwi [67]. Analogi modyfikowane przez wprowadzenie tylko reszt dehydrofenyloalanyłowych zachowują całkowitą zdolność obniżania ciśnienia krwi [66]. Natomiast zmodyfikowanie cząsteczki także w pozycji 9

powoduje, że właściwość tę tracą [67]. W badaniach immunochemicznych okazało się, że podczas gdy SP(6-11) wykazuje identyczne właściwości antygenowe jak substancja P, to ekspresja determinanty antygenowej analogu [(Z)- Δ Phe⁸]SP(6-11) jest bardzo mała. Wskazuje to na istotną dla epitopu antygenowego substancji P rolę reszty Phe⁸ [68, 69].

III-2. α, β -dehydrohormony

Oprócz enkefalin i substancji P modyfikowano przez wbudowanie α, β -dehydroaminokwasów niektóre peptydowe hormony tkankowe lub ich analogi, a także liberyny i statyny.

Pierwsze α, β -dehydroanalogi hormonów — to nienasycone pochodne saralazyny, [Sar¹, Ala⁸]angiotensyny, antagonisty angiotensyny II [70, 71].



Oktapeptyd angiotensyna II jest hormonem podwyższającym ciśnienie krwi [49b, 70], a pewne jego antagonistyczne analogi są lekami przeciwcisnieniowymi [70]. Modyfikacja saralazyny w pozycji 8 za pomocą różnych α, β -dehydroaminokwasów dała między innymi analog [Sar¹, Ala⁸]angiotensynę 35 razy bardziej aktywną niż związek macierzysty i tak jak on pozbawioną właściwości agonistycznych [72, 73].

Bradykinina jest nonapeptydowym hormonem tkankowym powodującym skurcz mięśni gładkich jelit, oskrzeli i macicy oraz obniżającym ciśnienie tętnicze krwi [47, 49c]. Badanie działania biologicznego trzech jej α, β -dehydroanalogów z resztą (Z)- Δ Phe w pozycji 5, 8 oraz 5 i 8 dało wyniki zebrane w Tabeli 3 [74]. Związek pierwszy wykazuje wysoką aktywność, w tym szczególną zdolność obniżania ciśnienia krwi po podaniu dożylnym. Analog drugi jest mniej aktywny niż związek macierzysty, niezależnie od zastosowanego testu, a analog trzeci ma aktywność porówny-

Tabela 3

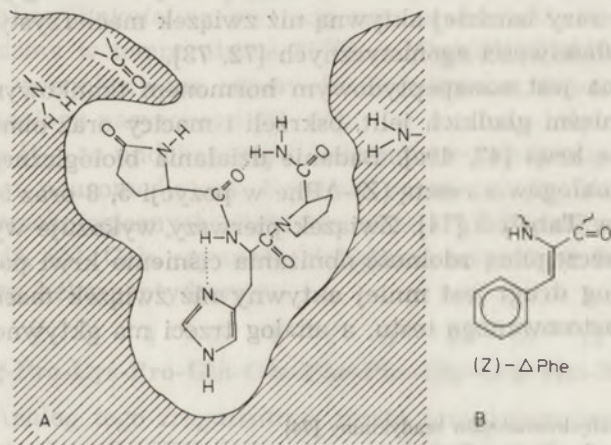
Aktywność dehydroanalogów bradykininy [74]

1 2 3 4 5 6 7 8 9
Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

Analog bradykininy	Skurcz tkanki		Ciśnienie krwi po podaniu	
	macica	jelita	dożylnym	doaortowym
%				
Bradykinina (BK)	100	100	100	100
[(Z)- Δ Phe ⁵]BK	133	250	2346	222
[(Z)- Δ Phe ⁸]BK	20	87	93	7
[(Z)- Δ Phe ^{5,8}]BK	56	108	416	17

walną z aktywnością bradykininy. Wyniki zinterpretowano następująco. Z badań zależności między strukturą a aktywnością peptydu wiadomo, że dla czynności biologicznej niezbędny jest pierścień aromatyczny reszty fenyloalanylowej w pozycji 5. Sądzi się, że pierścień ten wiąże się z receptorem oddziaływaniami typu π - π . Tak więc dodatkowe elektrony wiązania podwójnego reszty Δ Phe⁵ oddziaływanie to wzmacniają, co objawia się wysoką czynnością analogu [(Z)- Δ Phe⁵]. Obecność (Z)- Δ Phe w pozycji 8 ułatwia β -zgięcie struktury peptydu i zwiększa siłę wiązania wodorowego 4 \rightarrow 1. Utrudnia to jednak oddziaływanie z receptorem C-końcowej grupy karboksylowej istotnej dla czynności biologicznej naturalnego hormonu. Przypuszcza się, że jest to główna przyczyna obniżenia aktywności analogu [(Z)- Δ Phe⁸]. Wszystkie nienasycone pochodne bradykininy wykazywały zwiększoną odporność na hydrolizę enzymatyczną, co może być dodatkowym czynnikiem wpływającym na ich aktywność [75].

Tyreoliberyna (TRH) \square Glu-His-Pro-NH₂ jest hormonem, którego czynność biologiczna obniża się w wyniku jakiegokolwiek modyfikacji struktury z wyjątkiem podstawienia pozycji 2 przez 3'-Me-His. Między innymi na podstawie takiego zachowania zaproponowano hipotezę oddziaływania TRH z receptorem przedstawioną na (Ryc. 13) [49d]. Aby hipotezę tę zwe-



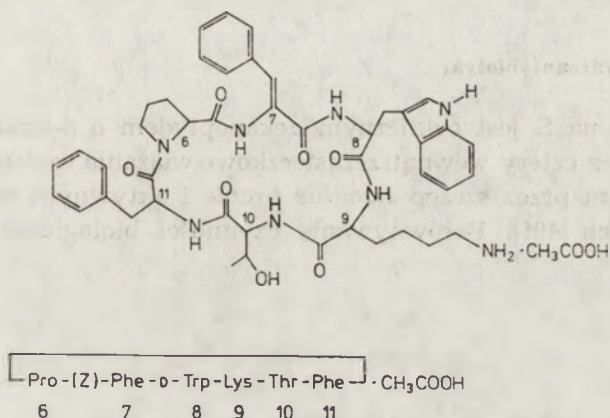
Ryc. 13. A — schemat ilustrujący oddziaływanie TRH z receptorem [49d]. B — podobieństwo budowy reszty (Z)- Δ Phe do konformacji reszty His² w proponowanym modelu A.

ryfikować, zsyntezowano [(Z)- Δ Phe²]TRH o ustalonej orientacji pierścienia aromatycznego reszty aminokwasowej², zgodnej z zakładaną w cząsteczce TRH, i o domniemanej pogłębionej w stosunku do związku macierzystego tendencji do występowania łańcucha peptydowego w formie zgiętej. Za punkt wyjścia koncepcji posłużył analog [Phe²]TRH o 10⁰% aktywności, inhibowanej przez trijodotyroninę (większość analogów TRH tej

cechy charakterystycznej natywnego hormonu nie wykazuje [76]. Jednakże wyniki badań biologicznych [(Z)- Δ Phe⁷]TRH nie znaleźliśmy.

Przedmiotem α, β -dehydromodyfikacji były też analogi gonadoliberyny (GnRH) [77] i melanostatyna (MIH) [78]. Wyników badań biologicznych otrzymanych α, β -dehydroanalogów również nie znaleźliśmy.

Ciekawe rezultaty uzyskano podstawiając w bardzo aktywnym cykloheksapeptydowym analogu somatostatyny resztę fenyloalanylową resztę (Z)-dehydrofenyloalanylową (Rys. 14). Hormon natywny, somatostatyna



Ryc. 14. [(Z)- Δ Phe⁷] cykloheksapeptydowy analog somatostatyny [80]. Numeracja reszł aminokwasowych odpowiada numeracji w cząsteczce somatostatyny.

jest heterodetycznym cyklicznym tetradekapeptydem hamującym uwalnianie między innymi z przysadki somatotropiny i z trzustki insuliny

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys

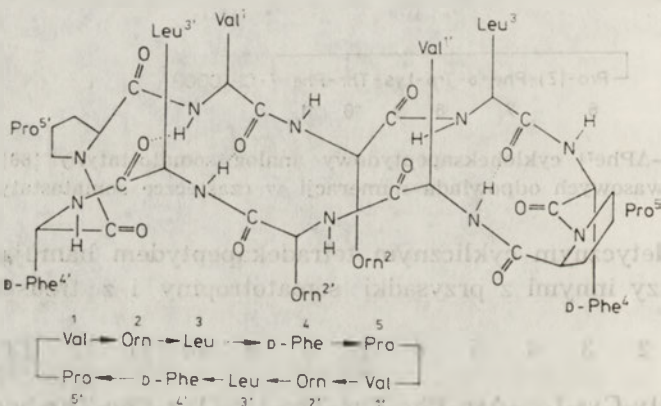
i glukagonu [47, 49e, 79]. Dominujący w roztworze konformer cyklicznego dehydroanalogu miał konformację zarówno szkieletu peptydowego, jak i pierścienia fenylowego w pozycji 7 podobną do konformacji nasyconego cykloheksapeptydu, lecz zdolność hamowania uwalniania somatotropiny dziesięciokrotnie od niego mniejszą. Stąd wniosek, że dla całkowitej aktywności peptydu, o którym mowa, konieczna jest swobodna rotacja bocznego łańcucha fenyloalaniny, który przyjmuje na powierzchni receptora konformację inną niż jego główna konformacja w roztworze. Dehydroanalog był dziesięciokrotnie bardziej odporny na trawienie trypsyną niż nasycony cykloheksapeptyd i w badaniu tym zachował się tak, jak analog z resztą alanylową w pozycji 7. Wskazuje to na ważność dla hydrolizy enzymatycznej omawianego peptydu odpowiednio ułożonego pierścienia fenylowego w tej pozycji [80].

III-3. Inhibitory enzymów

Oprócz α , β -dehydroanalogów angiotensyny II zsyntezowano także α , β -dehydroanalog Pro-Phe-His-Leu, substratu enzymu konwertującego angiotensynę I do angiotensyny II (EC 3.4.15.1). N-blokowana pochodna nienasyconego peptydu, mianowicie **benzyloksykarbonylo-Pro-(Z)- Δ Phe-His-Leu** okazała się kompetycyjnym inhibitorem enzymu [81]. Znane są inne przykłady wbudowania α , β -dyhydroaminokwasu do substratu enzymu, zmieniającego go w kompetycyjny inhibitor [5].

III-4. α , β -dehydroantybiotyki

Gramicydyna S jest cyklicznym dekapeptydem o β -strukturze utrzymywanej przez cztery wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe (Ryc. 15), produkowanym przez szczep *Bacillus brevis* i aktywnym wobec bakterii gram-dodatnich [49f]. Porównywanie czynności biologicznej [D-Dpr^{4,4'}]-

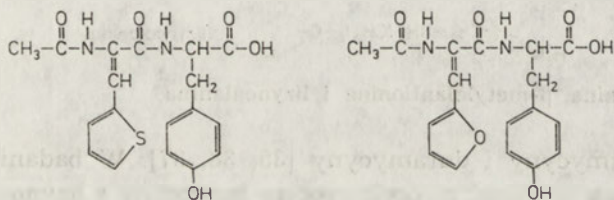


Ryc. 15. Gramicydyna [82].

[Δ Ala^{4,4'}]- i [D-Ala^{4,4'}]gramicydyny S do czynności związku macierzystego wykazuje istotność hydrofobowych właściwości reszt aminokwasowych w pozycjach 4 i 4'. Aktywność antybakteryjna [Δ Ala^{4,4'}]gramicydyny jest czterokrotnie wyższa niż prawdopodobnie mniej hydrofobowego, nasyconego analogu [D-Ala^{4,4'}] i wielokrotnie większa niż hydrofilowej [D-Dpr^{4,4'}]gramicydyny. Ponieważ jest ona znaczna, wnioskuje się, że reszty dehydroalanylowe w pozycjach 4 i 4' stabilizują w cząsteczce obydwa jej β -zgięcia, a w konsekwencji β -strukturę pierścienia peptydowego tego analogu gramicydyny, co najprawdopodobniej istotnie rzutuje na jego aktywność biologiczną [82].

IV. Syntetyczne α, β -dehydropeptydy aktywujące funkcję cytotoksyczną makrofagów

Udało się syntetycznie skonstruować α, β -dehydrooligopeptydy nie mające odpowiedników w przyrodzie, o cennych właściwościach biologicznych, stanowiących przedmiot patentów zachodniemieckiej firmy Troponwerke w Kolonii. Ze względu na nie zawsze łatwą dostępność literatury patentowej omówimy to szerzej. Mianowicie otrzymano szereg N-acetylowanych α, β -dehydroaminokwasów, di- dodekapeptydów oraz ich soli, estrów, amidów i alkiloamidów, potencjalnych leków przeciwnowotworowych, o działaniu przede wszystkim miejscowym, lecz i systemowym. Nie wykazują one ogólnej toksyczności, która to cecha pozbawia wiele związków praktycznej użyteczności leczniczej. Dawki letalne DL_{50} peptydów wynoszą dla szczurów około 300 mg/kg; 80 mg dziennie dawki/kg podawane królikom po 27 dniach nie wywołują objawów zatrucia zwierząt. Dawki terapeutyczne związków — to 1—100 mg/kg, najczęściej 2—40 mg/kg. Efekty przeciwnowotworowego działania takich leków są różne: od zaniku nowotworu bez naruszania tkanki prawidłowej, poprzez nekrozy w miejscu bezpośredniego działania, do nekroz w miejscach odległych. Związki te można również używać do bezbliznowej regeneracji po uszkodzeniu skóry, błon śluzowych i komórek nabłonkowych, wywołanym przez infekcje bakteryjne i grzybicowe, między innymi także przez infekcje charakterystyczne dla tropików [83—85]. Spośród związków, o których mowa, dwa N-acetylodehydrodipeptydy (Ryc. 16) badano bardziej szczegółowo. Nie działają



Ryc. 16. N-acetylo- α, β -dehydrodipeptydy aktywujące funkcję cytotoksyczną makrofagów [83—85].

one bezpośrednio na komórki nowotworowe, natomiast domniemywa się, że aktywują funkcję cytotoksyczną makrofagów [86]. Z powyższą hipotezą zgodne jest obserwowane uodparnianie organizmów na zakażenia po stosowaniu niektórych syntetycznych α, β -dehydropeptydów [83—85].

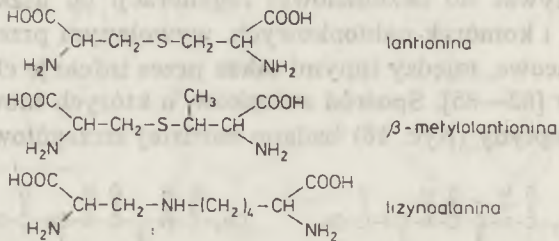
V. Właściwości α, β -dehydroaminokwasów wpływające na aktywność biologiczną związków

Jak z przeglądu dokonanego w rozdziałach II i III widać, hipotez na temat właściwości α, β -dehydroaminokwasów istotnych dla ich aktywno-

ści biologicznej jest kilka. Lecz stopień ich udokumentowania nie jest na ogół duży. Czasami obserwuje się także tendencję do zbyt spieszego uogólniania [51, 59, 60, 80], tj. wnioskowania o właściwościach całej grupy α , β -dehydroaminokwasów i mechanizmach działania różnych efektorów biologicznych na podstawie wyników badania tylko jednego α , β -dehydroaminokwasu lub tylko jednego rodzaju aktywności biologicznej.

Dość powszechnie wyraża się pogląd [25—30, 40, 51, 59, 60, 80], że reszty α , β -dehydroaminokwasowe mogą wiązać się kowalencyjnie z bioligandem, enzymem, receptorem, związkami ważnymi metabolicznie lub niektórymi strukturami komórkowymi. Tymczasem jakie są podstawy tego uogólnienia?

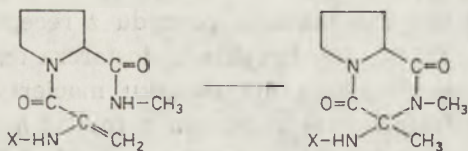
Dane doświadczalne na temat amoniako-liazy L-histydyny i L-fenylalaniny przemawiają za udziałem podwójnego wiązania dehydroalaniny w reakcji kowalentnej addycji substratu, z którego w wyniku końcowym eliminuje się cząsteczka amoniaku [25—27, 29]. Oprócz tych danych, wydaje się, że przytoczony pogląd wynika z faktu występowania lantioniny i β -metylolantioniny (Ryc. 17) w cząsteczkach antybiotyków: nizyny, subtyliny, cynamycyny i duramycyny, oraz lizynoalaniny (Ryc. 17) w czę-



Ryc. 17. Lantionina, β -metylolantionina i lizynoalanina.

teczkach cynamycyny i duramycyny [35, 38, 87]. W badaniach modelowych wykazano bowiem, że prekursorem lantioniny i lizynoalaniny może być dehydroalanina, do której w reakcji nukleofilowej addycji przyłącza się cysteina [88] lub lizyna [36, 87, 89]. Ponadto wymienione „podwójne” aminokwasy wyodrębniono jako artefakty z alkalicznych hydrolizatów niektórych białek [89]. (Przypuszcza się zatem, że to właśnie reakcja addycji do reszt α , β -dehydroaminokwasowych powoduje pewne zmiany właściwości fizykochemicznych, chemicznych i biologicznych białek podczas ich przechowywania [51]). Biorąc za podstawę bardzo łatwą chemiczną reaktywność nizyny z tiolami i kojarząc ją logicznie z aktywnością biologiczną nizyny wobec wrażliwych na brak koenzymu-A pasożytów *Plazmodium berhei*, wnioskuje się w sposób pośredni, że mechanizm działania biologicznego nizyny polega na addycji tioli do jej wiązań α , β -nienasyconych [28]. Także w doświadczeniach bionaśladowczych przeprowadzono wewnątrzcząsteczkową addycję grupy metyloamidowej do podwój-

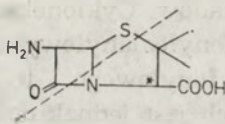
nego wiązania dehydroalaniny (Ryc. 18), sugerując tym samym drogę biosyntezy cyklicznych peptydów typu gliotoksyn, o aktywności przeciw-wirusowej [90—92]. Zatem, jeśli mowa o składowej chemicznej w bioreak-



Ryc. 18. Wewnątrzcząsteczkowa addycja grupy metyloamidowej do podwójnego wiązania reszty dehydroalaniny [90—92]. X — ochrona grupy aminowej.

tywności reszt α, β -dehydroaminokwasowych, należy sobie zdać sprawę, że do tej pory, w warunkach naturalnych i biomodelowych udało się wykazać reaktywność chemiczną tylko dehydroalaniny. Reszta ta i w warunkach chemicznej syntezy peptydów daje szereg produktów addycji [93].

Inne próby weryfikacji hipotez o prekursorowej roli α, β -dehydroaminokwasu w biosyntezie aminokwasu „podwójnego” nie dają tak jednoznacznych wyników. Np. w skład cząsteczek penicylin wchodzi jeszcze inny niż wymienione „podwójny” aminokwas — kwas penicylanowy (Ryc. 19). W ważnych biotechnologicznie badaniach biosyntezy penicyliny G nie



Ryc. 19. Kwas penicylanowy. Linia przerywaną oddzielono resztę cysteiny od reszty waliny. x oznacza jeden z optycznie czynnych atomów węgla kwasu penicylanowego.

stwierdzono postulowanej od lat addycji grupy SH cysteiny do podwójnego wiązania α, β -dehydrowaliny [94]. Dehydrowalinie być może przypada w tej biosyntezie odpowiedzialność za konfigurację-D atomu węgla, zaznaczonego we wzorze.

Pogląd, że reszty α, β -dehydroaminokwasowe wbudowane do hormonów lub ich analogów mogą reagować chemicznie z receptorem [30, 40, 51, 52, 59, 60, 80], nie znajduje poparcia eksperymentalnego. $[\Delta\text{Ala}^2]\text{Leu}$ -enkefalina i analogi enkefaliny z (Z)-dehydrofenyloalaniną w pozycji 4 lub (Z)- α, β -dehydroleucyną w pozycji 5, wykazują podobne powinowactwo do receptorów jak analogi nasycone [51, 52, 59, 60]. Ponieważ jednak znane są przypadki reaktywności receptorów opiatowych z podwójnym wiązaniem antagonisty [95], świadczy to o potrzebie bardzo ścisłego dopasowania strukturalnego podwójnego wiązania bioligandu do elementów receptora mogących ulec addycji. Także nie udało się udowodnić, że reszty α, β -dehydroaminokwasowe występujące w fitotoksynach reagują chemicznie

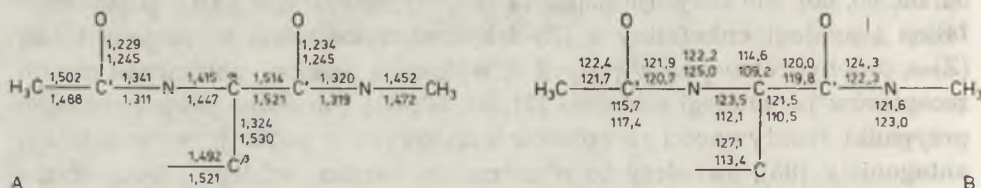
z receptorem. Np. [D-Ala⁴]AM-toksyna I ma nieznaczną, lecz mierzalną toksyczność [6].

Uważa się intuicyjnie, że reszty α , β -dehydroaminokwasowe są bardziej hydrofobowe niż odpowiadające im reszty aminokwasów nasyconych, a właściwość ta w miejscu wiązania peptydu z receptorem ma sprzyjać temu wiązaniu [51, 59, 60, 80]. Przykładu dostarcza chociażby aktywność [(Z)- Δ Phe⁶]brydykininy większa niż związku macierzystego, tłumaczona oddziaływaniem hydrofobowym receptora z resztą⁵ hormonu, wzmocnionym oddziaływaniem z podwójnym wiązaniem (Z)-dehydrofenyloalaniny [74].

Reszty α , β -dehydroaminokwasowe wpływają na konformację i wymiary zarówno łańcucha bocznego, jak i szkieletu peptydowego, a wynika to z nietypowej dla peptydów sp²-hybrydyzacji α -węgla i możliwości sprzężeń elektronowych między wszystkimi grupami funkcyjnymi α . Wpływ ten bada się zarówno w stanie stałym, jak i w roztworze na przykładach odpowiednich par aminokwasów i peptydów: związek nienasycony i nasycony. Wnioski są wspierane wynikami badań samych α , β -dehydroaminokwasów i α , β -dehydropeptydów.

Pierwszy, najbardziej oczywisty wpływ steryczny α , β -dehydroaminokwasu — to określona orientacja podstawnika w pozycji- β bocznego łańcucha reszty aminokwasowej. O jej istotności dla działania biologicznego mówią dwa z opisanych przykładów. Cykloheksapeptyd o czynności somatostatyny i jego (Z)-dehydrofenyloalanylowy analog mają w roztworze tę samą orientację pierścienia fenylowego i tę samą konformację szkieletu peptydowego. Pierwszy z nich jest jednak dziesięć razy bardziej aktywny. Oznacza to, że oddziaływanie z receptorem zmienia orientację pierścienia fenylowego cykloheksapeptydu, prowadząc do czynności biologicznej. Natomiast niemożność zmiany orientacji tegoż pierścienia w dehydropeptydzie wpływa ujemnie na funkcję biologiczną [80]. Jeszcze pełniejszego obrazu dostarczają dehydrofenyloalanylowe analogi Met- i Leu-enkefalin. Związki z resztą (Z)- Δ Phe⁴ mają działanie większe lub równe związkom z resztą Phe⁴, a zamiana w Leu-enkefalinie (Z)- Δ Phe⁴ na (E)- Δ Phe⁴ powoduje spadek aktywności o przeszło dwa rzędy [63].

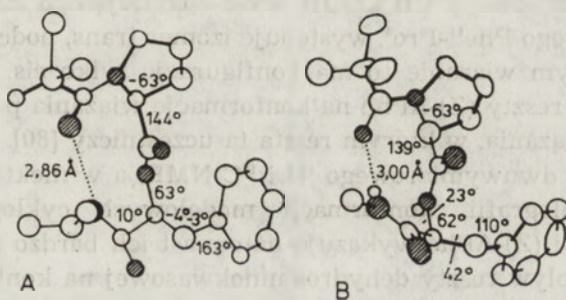
Geometryczne wymiary pochodnych aminokwasowych CH₃CO-(Z)- Δ Phe-NHCH₃ i CH₃CO-Phe-NHCH₃ zebrano na Ryc. 20. Oprócz oczywis-



Ryc. 20. Geometryczne dane cząsteczek CH₃CO-(Z)- Δ Phe-NHCH₃ (wartości górne) i CH₃CO-Phe-NHCH₃ (wartości dolne). A — długość wiązań (Å), B — kąty walencyjne (°) [8].

tych zmian długości wiązań i kątów wokół węgla α i β , jakie wprowadza do cząsteczki nienasycona grupa funkcyjna, są zmiany w wiązaniu acetylowym, świadczące o sprzężeniu elektronowym, co potwierdzają także widma IR. Wiązanie podwójne wykazuje niewielkie napięcie [8]. Rentgenografia dalszych pochodnych dehydrofenyloalaniny i jej peptydów ujawnia jeszcze inne sprzężenia, czasami o maksymalnie możliwej rozległości [7–11].

Z analizy widm ^1H NMR par peptydów: $(\text{CH}_3)_3\text{COCO-Gly-Phe-OCH}_3$ — $(\text{CH}_3)_3\text{COCO-Gly-(Z)-}\Delta\text{Phe-OCH}_3$, $(\text{CH}_3)_3\text{COCO-Pro-Phe-OCH}_3$ — $(\text{CH}_3)_3\text{COCO-Pro-(Z)-}\Delta\text{Phe-OCH}_3$ i $(\text{CH}_3)_3\text{COCO-Gly-Phe-Leu-OCH}_3$ — $(\text{CH}_3)_3\text{COCO-Gly-(Z)-}\Delta\text{Phe-Leu-OH}_3$, wynika, że dwie pierwsze pary przyjmują konformację γ -zgięcia z wiązaniem wodorowym między karbonyłem N-ochrony a NH reszty ΔPhe . Wielkości spektralne dehydropeptydu drugiej pary wskazują na mniejszą giętkość jego struktury. Peptydy trzeciej pary przybierają konformację β -zgięcia z wiązaniem wodorowym między karbonyłem N-ochrony a NH reszty Leu. I w tym przypadku struktura związku nienasyconego jest bardziej sztywna [96]. Także za pomocą ^1H NMR stwierdzono w następujących peptydach: $(\text{CH}_3)\text{COCO-Phe-(Z)-}\Delta\text{Phe-X-OCH}_3$, gdzie X = Leu, Val, Ala, przeważającą konformację II β -zgięcia z wiązaniem wodorowym między karbonyłem N-ochrony a NH reszty X [97]. Z rentgenografii $(\text{CH}_3)_3\text{COO-Pro-Phe-NHCH}_3$ i $(\text{CH}_3)_3\text{COO-Pro-(Z)-}\Delta\text{Phe-NHCH}(\text{CH}_3)_2$ (Ryc. 21) widać, że konformacje II β -zgięcia obu



Ryc. 21. Konformacja w kryształach cząsteczek $(\text{CH}_3)_3\text{COO-Pro-(Z)-}\Delta\text{Phe-NHCH}(\text{CH}_3)_2$ (A) i $(\text{CH}_3)_3\text{COO-Pro-Phe-NHCH}_3$ (B). Na rysunku podano długości wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych i kąty dwuścienne [8].

cząsteczek są bardzo podobne, z tym że w cząsteczce peptydu nasyconego wiązanie wodorowe 4→1 jest dłuższe (3.00 Å) niż w cząsteczce peptydu nienasyconego (2.86 Å). Zgięty kształt obu związków zostaje zachowany w roztworze, jak wskazują widma IR i ^1H NMR. Ponadto wykorzystując te ostatnie stwierdzono w populacji konformerów peptydu $(\text{CH}_3)_3\text{COCO-Pro-Phe-NHCH}(\text{CH}_3)_2$ 60% udział konformeru o cechach I β -zgięcia, a w populacji konformerów peptydu nienasyconego 87% udział konformeru o cechach II β -zgięcia [8].

Jak widać, w przytoczonych przykładach (Z)-dehydrofenyloalanina występowała w pozycji (i+2) β - lub γ -zgięcia. Udało się też udowodnić, że reszta ta w peptydach zarówno w stanie krystalicznym, jak i w roztworze zwiera i stabilizuje strukturę β -zgięcia. Ponadto są przesłanki, że (Z)-dehydrofenyloalanina może zajmować pozycję i+1 w II β -zgięciu [97]. Omówione właściwości (Z)-dehydrofenyloalaniny są cenne, gdyż β -zgięcie jest strukturą powszechną w białkach i cyklicznych peptydach oraz spotykaną także w polipeptydach liniowych, i istotną — jak się sądzi — dla aktywności biologicznej związków, o których mowa [98—101].

Badania porównawcze dłuższych peptydów liniowych i peptydów cyklicznych, nasyconych i nienasyconych, dostarczają dalszych danych na temat wpływu reszty dehydrofenyloalanylowej na konformację związków. Przesunięcia chemiczne α -CH reszt Tyr, Gly i Met amidu [D-Ala²]Met-enkefalin i amidu [D-Ala², (Z)- Δ Phe⁴]Met-enkefalin są różne. Sugeruje to konformacyjne konsekwencje wbudowania Δ Phe rozciągające się na dalsze fragmenty łańcucha peptydowego [96]. Zatem reszta ta może kontrolować sterycznie nie tylko swoje najbliższe, lecz także i odległe sekwencyjnie sąsiedztwo w peptydach liniowych. W tentoksynie, dehydrocyklotetrapeptydzie reszta (Z)-N-metylodehydrofenyloalaniny ma bardzo istotną rolę strukturotwórczą, pozwalając peptydowi przybrać konformację właściwą dla oddziaływania z receptorem, której nie przyjmuje, gdy reszta ta jest nasycona [39, 40]. W dehydrocykloheksapeptydzie cyklo-[Pro⁶-(Z)- Δ Phe⁷-D-Trp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰-Phe¹¹]. CH₃COOH obok dominującego izomeru cis wiązania peptydowego Phe¹¹-Pro⁶, występuje izomer trans, podczas gdy w peptydzie nasyconym wiązanie to ma konfigurację tylko cis. Obserwuje się tu więc wpływ reszty (Z)- Δ Phe na konformację wiązania peptydowego sąsiedniego do wiązania, w którym reszta ta uczestniczy [80]. Porównanie za pomocą jedno i dwuwymiarowego ¹H i ¹³C NMR, a w niektórych przypadkach i krystalografii, konformacji modelowych cyklopentapeptydów z resztą D-Phe i (Z)- Δ Phe wykazuje natomiast ich bardzo duże podobieństwo. Zatem wpływ reszty dehydroaminokwasowej na konformację pierścienia peptydowego piętnastoczłonowego można pominąć. Prowadzi to do wniosku o wymienialności w pięciopeptydowych układach cyklicznych aminokwasu nasyconego na nienasycony, o ile tylko orientacja bocznego łańcucha aminokwasu nienasyconego wbudowanego do peptydu cyklicznego odpowiada konformacji aktywnej biologicznie lub jest dla niej nieistotna [102, 103].

Różne wpływy steryczne reszt α , β -dehydroaminokwasowych na konformację i wymiary peptydów można podsumować następująco. W peptydach liniowych są to: określona orientacja łańcucha bocznego, różnorodne sprzężenia elektronowe, pogłębianie i stabilizacja β - i γ -zgięć łańcucha peptydowego i wpływ na jego konformację w miejscach odległych sekwencyjnie od wiązania podwójnego [7—11, 63, 96]. Wpływ reszty α ,

β -dehydroaminokwasowej na konformację peptydów cyklicznych zależy od wielkości pierścienia. Wpływ ten ujawnia się najsilniej w cyklotetrapeptydach, w których stwierdzono, że reszta N-metylo- α , β -dehydroaminokwasowa może odgrywać istotną biologicznie rolę strukturotwórczą [39—41]. W dehydrocykloheksapeptydzie wykazano zmianę konfiguracji jednego z wiązań peptydowych [80]. Natomiast w cyklopentapeptydach resztę tę uznano za zamiennik konformacyjny reszty D-aminokwasowej [102, 103]. Jednak dotychczasowe dane zarówno krystalograficzne, jak fizykochemiczne świadczące o różnorodnych efektach sterycznych reszt α , β -dehydroaminokwasowych ograniczają się z bardzo nielicznymi wyjątkami [104] do reszty Δ Phe i to właściwie tylko w konfiguracji Z (wyjątek [7]).

Badania trawienia enzymatycznego modelowych α , β -dehydropeptydów [105], analogów Len-enkefaliny [55, 56, 61, 64], bradykininy [75] i somatostatyny [80], zawierających resztę dehydrofenyloalaninową lub α , β -dehydroleucynową wykazały, że wiązania peptydowe zarówno z grupą aminową, jak i karboksylową reszty nienasyconej są odporne na hydrolizę enzymatyczną.

VI. Uwagi końcowe

Z dokonanego przeglądu widać, że obecność reszt α , β -dehydroaminokwasowych w niektórych związkach naturalnych może decydować o ich działaniu biologicznym. W centrum aktywnym dwóch enzymów z klasy liaz, amoniako-liazy L-histydyny (EC 4.3.1.3) i amoniako-liazy L-fenyloalaniny (EC 4.1.3.5), jak się sądzi, występuje dehydroalanina [25—27, 29]. Pewne rodzaje aktywności biologicznej niziny tłumaczy się reakcjami addycji tioli do jej wiązań α , β -nienasyconych [28]. W cząsteczkach cyklopeptydowych fitotoksyn, tentoksyny, HC-toksyny i AM-toksyny-I reszty, odpowiednio, (Z)-N-metylodehydrofenyloalaniny [39—41], (E)- α , β -dehydroizoleucyny [3] i dehydroalaniny [24, 30] są albo niezbędne dla ich czynności biologicznej [3, 39—41], albo bardzo istotne [24, 30].

Również wprowadzenie reszt α , β -dehydroaminokwasowych do naturalnych peptydów lub ich analogów w miejsce aminokwasów białkogenych na ogół nie pozostają bez wpływu na aktywność peptydów. α , β -Dehydromodyfikacje analogów amidu Met-enkefaliny [55—57] i angiotensyny [72, 73] oraz natywnej cząsteczki bradykininy [74] przyniosły związki o większej czynności. Udało się też, jak pokazuje przykład bradykininy [74] i analogów Leu-enkefaliny [51, 59—62], zmienić selektywność działania peptydu, a nawet odwrócić jego charakter, z substratu enzymu na inhibitor [5, 81].

Niektóre α , β -dehydropeptydy naturalne i syntetyczne nie mające analogii w naturze wykazują aktywność przeciwnowotworową, będącą przedmiotem badań [32, 83—86].

Reszty α , β -dehydroaminokwasowe mają właściwości, o których się sądzi, że są istotne dla czynności biologicznej peptydów. Najlepiej udokumentowana wydaje się zależność między cechami stereochemicznymi tych reszt a działaniem biologicznym związków, w których one występują (tentoksyna [39—41]) lub, w które je wbudowano (α , β -dehydroenkefalinę [63], α , β -dehydrocykloanalog somatostatyny [80]). Rozpoznane właściwości reszt α , β -dehydroaminokwasowych, sprawdzone w dotychczasowych badaniach aktywności α , β -dehydroanalogów peptydów biologicznie czynnych, pozwalają uważać, że dalsze stosowanie α , β -dehydroaminokwasów do modyfikacji peptydów może doprowadzić do uzyskania związków o cennych właściwościach farmakologicznych.

Niniejsze opracowanie powstało w związku z syntezą i badaniami struktury modelowych peptydów z resztą α , β -dehydroaminokwasową, finansowanymi z programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego RP.II-10. Autorzy pracy dziękują za fundusze na te badania.

Artykuł otrzymano 9 kwietnia 1987.
Zaakceptowano do druku 1 czerwca 1987.

PIŚMIENNICTWO

1. Vleggaar R., Wessels P. L., (1980), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 160—162.
2. Shin C., Ikeda M., Yonezawa Y., (1985), *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2243—2245.
3. Pringle R. B., (1971), *Plant Physiol.*, **48**, 756—759.
4. Schmidt U., Häusler J., Öhler E., Poisel H., (1979), *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **37**, 251—325.
5. Stammer C. H., (1982), w *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, red. Weinstein B., t. 6, str. 33—74, Marcel Dekker, Inc., New York-Basel.
6. Noda K., Shimonighasi Y., Izumiya N., (1983), w *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology*, red. Gross E., Meienhofer J., t. 5, str. 285—339, Academic Press Inc., New York-London.
7. Nitz J. T., Holt M. E., Rubin B., Stammer C. H., (1981), *J. Org. Chem.*, **46**, 2667—2671.
8. Aubry A., Allier F., Boussard G., Marraud M., (1985), w *Proc. 1st Int. Forum Peptides, Le Cap d'Age France 1984*, red. Castro B., Martinez J., str. 18—21, Pharmacologie-Endocrinologie, Montpellier, France.
9. Kubica Z., Rzeszotarska B., Makowski M., Główka M. L., Galdecki Z., (1987), *Pol. J. Chem.*, **61**, w druku.
10. Główka M., Gilli G., Bertolasi V., Makowski M., (1987), *Acta Crystallogr.*, **43**, 1403—1406.
11. Galdecki Z., (1988), *Biopolymers*, w druku.
12. Pawełczak K., Rzeszotarska B., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 559—584.
13. Szreniawski Z., (1985), w *Farmakologia*, red. Kubikowski P., Kostowski W., str. 833—852, PZWL Warszawa.

14. Konishi M., Saito K., Numata K., Tsuno T., Asama K., Tsukiura H., Naito T., Kawaguchi H., (1977), *J. Antibiot.*, 789—805.
15. Russel S., (1977), w *Antybiotyki*, 260, PWN Warszawa.
16. Umezawa H., (1972), *Postępy Hig. Med. Dośw.* 26, 431—443.
17. Garrod L. P., Lampert H. P., O'Grady F., (1983), w *Antybiotyko- i chemo-terapia*, a) 463—464, b) 118—141, PZWL Warszawa.
18. Wakamiya T., Shiba T., (1975), *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 48, 2502—2508.
19. Abraham P. E., Newton G. G. F., (1961), *Biochem. J.*, 79, 377—393.
20. Crowfoot Hodgkin D., Maslen E. N., (1961), *Biochem. J.*, 79, 393—402.
21. Nikonorow M., (1979), *Toksykologia żywności*, 258, PZWL Warszawa.
22. Kitagawa T., Miura T., (1972), *J. Antibiot.*, 25, 429—431.
23. Kitagawa T., Miura T., (1973), *J. Antibiot.*, 26, 528—531.
24. Shimohigashi Y., Lee S., Kato T., Izumiya N., (1978), *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 51, 584—588.
25. Givot I. L., Smith T. A., Abeles R. H., (1969), *J. Biol. Chem.*, 244, 6341—6353.
26. Wickner R. B., (1969), *J. Biol. Chem.*, 244, 6550—6552.
27. Hanson K. R., Havir E. A., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, 141, 1—17.
28. Gross E., Morell J. L., (1967), *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 2791—2792.
29. Givot I. L., Abeles R. H., (1970), *J. Biol. Chem.* 245, 3271—3273.
30. Mihara H., Aoyagi H., Ueno T., Kato T., Izumiya N., (1986), *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 59, 2041—2043.
31. Gross E., Morell J. L., (1970), *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 2919—2920.
32. Pallai P., Wakamiya T., Gross E., (1977) w *Peptides. Proc. 5th Am. Pept. Symp. San Diego, 1977*, red. Goodman M., Meienhofer J., str. 205—208, John Wiley and Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto.
33. Nomoto S., Teshima T., Wakamiya T., Shiba T., (1977), *J. Antibiot.*, 30, 955—959.
34. Nomoto S., Teshima T., Wakamiya T., Shiba T., (1978), *Tetrahedron*, 34, 921—927.
35. Gross E., Morell J. L., (1971), *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 4634—4635.
36. Gross E., (1972), w *Chemistry and Biology of Peptides*, red. Meienhofer J., str. 671—678, Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Michigan.
37. Gross E., Morell J. L., Graig L. C., (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 62, 952—956.
38. Gross E., Kiltz H. H., Nebelin E., (1973), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 354, 810—812.
39. Rich D. H., Bhatnagar P. K., (1978), *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 2212—2218.
40. Rich D. H., Bhatnagar P. K., (1978), *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 2218—2224.
41. Rich D. H., Bhatnagar P. K., Jasensky R. D., Stelle J. A., Uchytıl T. F., Durbin R. D., (1978), *Bioorganic Chem.*, 7, 207—214.
42. Mihara H., Aoyagi H., Lee S., Waki M., Kato T., Izumiya N., (1984), *Int. J. Peptide Protein Res.*, 23, 447—453.
43. Mihara H., Ikesue K., Lee S., Aoyagi H., Kato T., Ueno T., Izumiya N., *Int. J. Peptide Protein Res.*, w druku.
44. Grzonka Z., (1984) w *Chemia i biologia peptydów*, red. Rzeszotarska B., str. 47—77, Wydawnictwa Naukowe WSP-Opole, Opole.
45. Lipkowski A. W., (1984) w *Chemia i biologia peptydów*, red. Rzeszotarska B., str. 79—97, Wydawnictwa Naukowe WSP-Opole, Opole.
46. Clement-Yones V., Besser G. M., (1984), *Peptides. Analysis-Synthesis-Biology*, red. Udenfriend S., Meienhofer J., t. 6, str. 323—389, Academic Press Inc., Orlando-San Diego-New York-London-Toronto-Montreal-Sydney-Tokyo.
47. Kupryszewski G., (1985), *Post. Biochem.*, 31, 421—441.

48. Przewłocki R., (1985), *Post. Biochem.*, **31**, 463—486.
49. Jakubke H. O., Jeschkeit H., (1982), *Aminosäuren, Peptide, Proteine*, a) 327—328, b) 314—315, c) 317, d) 288—289, e) 292—296, f) 340—347, Academic Verlag, Berlin.
50. Hansen P. E., Morgan B. A., (1984) w *Peptides. Analysis-Synthesis-Biology*, red. Udenfriend S., Meienhofer J., t. 6, str. 269—321, Academic Press Inc., Orlando-San Diego-New York-London-Toronto-Montreal-Sydney-Tokyo.
51. Shimohigashi Y., Stammer C. H., (1981), w *Peptides. Synthesis-Structure-Function*, Proc. 7th Am. Pept. Symp., red. Rich D. H., Gross E., str. 645—648, Pierce Chemical Company Rockford, Illinois.
52. Shimohigashi Y., Costa T., Stammer C. H., (1981), *FEBS Lett.*, **133**, 269—271.
53. Schiller P. W., (1984), w *Peptides. Analysis-Synthesis-Biology*, red. Udenfriend S., Meienhofer J., t. 6, str. 219—267, Academic Press Inc., Orlando-San Diego-New York-London-Toronto-Montreal-Sydney-Tokyo.
54. Cardinaux F., Pless J., (1984) w *Peptides 1984*. Proc. 18th Eur. Pept. Symp., red. Ragnarsson U., str. 321—324, Djurönäset, Sweden 1984.
55. English M. L., Stammer C. H., (1978) w *Peptides 1978*. Proc. 15th Eur. Pept. Symp. Gdańsk 1978, red. Siemion I. Z., Kupryszewski G., str. 557—558, Wydawnictwa Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław.
56. English M. L., Stammer C. H., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 780—782.
57. Chipkin R. E., Stewart J. M., Stammer C. H., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 890—895.
58. Shimohigashi Y., Dunnig J. W., Kolar A. J. Jr., Stammer C. H., (1983), *Int. J. Peptide Protein Res.*, **21**, 202—208.
59. Shimohigashi Y., Stammer C. H., (1982), *Int. J. Peptide Protein Res.*, **19**, 54—62.
60. Shimohigashi Y., Stammer C. H., (1982), *Int. J. Peptide Protein Res.*, **20**, 199—206.
61. Shimohigashi Y., Stammer C. H., (1983), *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 803—808.
62. Shimohigashi Y., Stammer C. H., Costa T., Vonvoigtlander P. F., (1983), *Int. J. Peptide Protein Res.*, **22**, 489—494.
63. Nitz T. J., Shimohigashi Y., Costa T., Chen H.-C., Stammer C. H., (1986), *Int. J. Peptide Protein Res.*, **27**, 522—529.
64. Shimohigashi Y., Chen H.-C., Stammer C. H., (1982), *Peptides* **3**, 985—987.
65. Herman Z. S., (1985), *Post. Biochem.*, **31**, 487—508.
66. Wasiak T., Koziolkiewicz W., (1983), *Polish J. Chem.*, **57**, 861—865.
67. Wasiak T., Janecka A., Koziolkiewicz W., (1986), *Polish J. Chem.*, **60**, 477—483.
68. Cierniewski Cz. S., Babińska A., Koziolkiewicz W., Wasiak T., (1984), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **365**, 499—502.
69. Babińska A., Cierniewski Cz. S., Koziolkiewicz W., Janecka A., (1984), *Mol. Immunology*, **21**, 727—730.
70. Jakimowska-Dudzińska K., (1980), *Biuletyn Informacyjny Instytutu Leków*, **27**, 189—211.
71. Kisfaludy L., (1983) w *Peptides*. Proc. 17th Eur. Pept. Symp. Prague 1982, red. Bláha K., Maloň P., 543—549, Walter de Gruyter, Berlin-New York.
72. Hallinan E. A., Mazur R. H., (1980), *Ger. Patent* 2846 200.
73. Hallinan E. A., Mazur R. H., (1979), *Peptides. Structure and Biological*

- Function. Proc. 6th Am. Pept. Symp., Washington 1979, red. Gross E., Meienhofer J., str. 475—477, Pierce Chemical Company Rockford, Illinois.
74. Fisher G. H., Berryer P., Ryan J. W., Chauhan V., Stammer C. H., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **211**, 269—275.
75. Fisher G. H., Ryan J. W., Berryer P., (1983), *Adv. Exp. Med. Biol.*, **156 A**, 607—612.
76. Grim D. M., Chauhan V., Shimohigashi Y., Kolar A. J., Stammer C. H., (1981), *J. Org. Chem.*, **46**, 2671—2673.
77. Chauhan V. S., Sharma A. K., (1985), Abstract Book 9th Am. Pept. Symp., Canada, P-WTK-65.
78. Sharma A. K., Saha A. K., Chauhan V. S., (1985), *Indian J. Chem. Soc. B*, **24 B**, 7—9.
79. Jakimowska-Dudzińska K., (1979), *Biuletyn Informacyjny Instytutu Leków*, **26**, 3—27.
80. Brady S. F., Cochran D. W., Nutt R. F., Holly F. W., Benett C. D., Paleveda W. J., Curley P. E., Arison B. H., Saperstein R., Veber D. F., (1984), *Int. J. Peptide Protein Res.*, **23**, 212—222.
81. Konno S., Stammer C. H., (1978), *Int. J. Peptide Protein Res.*, **12**, 222—231.
82. Ando S., Kato T., Izumiya N., (1985), *Int. J. Peptide Protein Res.*, **25**, 15—21.
83. Etschenberg E., Opitz W., Raddatz S., (1978), *Ger. Patent* 2659 154.
84. Etschenberg E., Opitz W., Raddatz S., (1979), *Ger. Patent* 2745 584.
85. Etschenberg E., Jacobi H., Opitz W., (1980), *Ger. Patent* 2904 512.
86. Schorlemmer H-U., Opitz W., Etschenberg E., Bitter-Suermann D., Haddig U., (1979), *Cancer Res.*, **39**, 1847—1853.
87. Gross E., Brown J. H., (1977) w *Peptides 1976*. Proc. 14th Eur. Pept. Symp., Wepion 1976, red. Loffet A., str. 183—190, Editions de l'Université de Bruxelles.
88. Zervas L., Ferderigos N., (1974), *Israel J. Chem.*, **12**, 139—152.
89. Bohak Z., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 2878—2887.
90. Öhler E., Schmidt U., (1977), *Chem. Ber.* **110**, 921—941.
91. Schmidt U., Perco A., Öhler E., (1974), *Chem. Ber.* **107**, 2816—2821.
92. Schmidt U., (1977), *Pure Appl. Chem.*, **49**, 163—168.
93. Makowski M., Rzeszotarska B., Kubica Z., Pietrzyński G., Hetper J., (1986), *Liebigs Ann. Chem.*, 980—991.
94. Kurzątkowski W., Kuryłowicz W., Paszkiewicz A., (1982), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **15**, 211.
95. Portoghese P. S., Rein M. D., Takemori A. E., (1986), *J. Med. Chem.*, **29**, 1861—1864.
96. Bach A. C., II, Dunn B. S., Gierasch L. M., Shimohigashi Y., Stammer C. H., (1983) w *Peptides. Structure and Function*. Proc. 8th Am. Pept. Symp. Tuscon 1983, red. Hruby V. J., Rich D. H., str. 299—302, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois.
97. Chauhan V. S., Sharma A. K., Uma K., Paul P. K. C., Balaram P., (1987), *Int. J. Peptide Protein Res.*, **29**, 126—133.
98. Siemion I. Z., (1983) w *Chemia i biologia peptydów*, red. Rzeszotarska B., str. 99—119, Wydawnictwa Naukowe WSP-Opole, Opole.
99. Siemion I. Z., (1985), w *Biostereochemia*, str. 144, PWN Warszawa.
100. Rose G. D., Gierasch L. M., Smith J. A., (1985), *Adv. Prot. Chem.*, **37**, 1—109.
101. Rzeszotarska B., Kozłowska I., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 411—442.
102. Bach A. C., II, Gierash L. M., (1985), *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3349—3350.
103. Bach A. C., II, Gierash L. M., Rheingold A. L., (1985), *Peptides. Struc-*

- ture and Function. Proc. 9th Am. Pept. Symp., Toronto 1985, ed. Deber M., Hruby V. J., Kopple K. D., str. 181—184, Pierce Chemical Company, Rockford Illinois.
104. Chauhan V. S., Stammer C. H., Norskov-Lauritzen L., Newton M. G., (1979), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 412—413.
105. English M. L., Stammer C. H., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83, 1464—1467

ANNA MARIA KONECKA*

Peptydy opioidowe nadnerczy

Adrenal opioid peptides

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Rozmieszczenie w komórkach
- III. Peptydy opioidowe nadnerczy i ich biosynteza
- IV. Sekrecja opioidowych peptydów z nadnerczy
- V. Rola fizjologiczna opioidowych peptydów nadnerczy

Contents

- I. Introduction
- II. Cellular distribution
- III. Adrenal opioid peptides and their biosynthesis
- IV. Secretion of opioid peptides from the adrenals
- V. Physiological role of the adrenal opioid peptides

Wykaz stosowanych skrótów: Met-enkefalina — metioninowa enkefalina, Leu-enkefalina — leucynowa enkefalina, BAM-22P, BAM-20P, BAM-12P — peptydy krwi nadnerczy, PCMB — kwas p-chlorortęciobenzoesowy, EDTA — kwas etylenodiaminotetraoctowy.

I. Wstęp

Prowadzone od wielu lat badania nad peptydami opioidowymi pozwoliły ustalić: ich budowę chemiczną, rozmieszczenie w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, a także poza nim, oraz częściowo ich rolę biochemiczną, fizjologiczną i działanie farmakologiczne. Szereg zagadnień omówiono już poprzednio na łamach Postępów Biochemii [1, 2].

W piśmiennictwie sporo uwagi poświęcono peptydom opioidowym występującym w nadnerczach — gruczole niezwykle ważnym w reakcji na zaburzenia homeostazy organizmu. Niniejszy artykuł stanowi przegląd wyników tych badań. Ponadto, przedstawiono w nim także niektóre dane

*Dr, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt, PAN, 05-551 Jastrzębiec.

dotyczące peptydów opioidowych występujących w zakończeniach nerwu trzewnego dochodzących do nadnerczy.

II. Rozmieszczenie w komórkach

Po raz pierwszy Schultzberg i wsp. [3, 4] stosując metodę immunofluorescencji wykazali w rdzeniu nadnerczy szczura, świnki morskiej i kota obecność peptydów opioidowych dających dodatnią, opioidopodobną reakcję immunologiczną z przeciwciałami wobec Met- i Leu-enkefalin. Prowadzone niezależnie badania histochemiczne, radioimmunologiczne i radioreceptorowe potwierdziły występowanie tych związków w nadnerczach zwierząt wielu innych gatunków [5—12].

W rdzeniu nadnerczy zawartość peptydów opioidowych waha się w zależności od gatunku zwierzęcia w szerokich granicach (Tab. 1), [5, 13]. Pojedyncze prace donoszą ponadto o ich występowaniu w części korowej nadnerczy, jednak w ilościach 30-160-krotnie mniejszych niż w rdzeniu [14, 15]. Peptydy opioidowe stwierdzono także w zakończeniach nerwu trzewnego (n. splanchnicus) dochodzących do komórek rdzenia nadnerczy [16—18], gdzie znajdują się prawdopodobnie w pęcherzykach synaptycznych zawierających noradrenalinę [3, 4, 19—21].

Tabela 1

Stężenie peptydów opioidowych w rdzeniu nadnerczy u różnych gatunków zwierząt [5].
(Oznaczone jako ekwiwalenty Met-enkefalin)

Gatunek	Peptydy opioidowe nmole/g świeżej tkanki
Szczur	0,29 ± 0,03
Chomik	0,50
Królik	0,85 ± 0,15
Kot	3,20 ± 0,66
Pies	21,20 ± 1,24
Krowa	20,00 ± 5,00
Człowiek	6,50

Peptydy opioidowe wykryto w komórkach chromochłonnych rdzenia nadnerczy, a dokładnie w ziarnistościach chromochłonnych tych komórek [4, 5, 7, 22—28]. Jak wiadomo w rdzeniu nadnerczy zachodzi synteza adrenaliny i noradrenaliny, ich magazynowanie w ziarnistościach chromochłonnych, a następnie sekrecja poza komórkę. Wiele badań, w których stosowano zarówno metody immunohistochemiczne jak i biochemiczne wskazuje, iż peptydy opioidowe występują w ziarnistościach chromochłon-

nych razem z adrenaliną [6, 24, 29—34]. Stosując wirowanie homogenatów rdzenia nadnerczy w gradiencie Percoll-sacharoza uzyskano dwie subfrakcje: cięższą, w której noradrenalina stanowiła około 90% całkowitej ilości katecholamin oraz lżejszą o przewodze adrenaliny (około 72%). Stosunek Met-enkefaliny do całkowitej ilości katecholamin wynoszący 0,07 w przypadku frakcji cięższej i 7,38 w przypadku lżejszej świadczy o ścisłym powiązaniu peptydów opioidowych z ziarnistościami chromochłonnymi zawierającymi adrenalinę [32, 33].

III. Peptydy opioidowe nadnerczy i ich biosynteza

Met- i Leu-enkefalina nie są jedynymi peptydami opioidowymi występującymi w nadnerczach. W prowadzonych niezależnie badaniach stwierdzono w rdzeniu nadnerczy kilka białek i peptydów różniących się znacznie masą cząsteczkową i wykazujących różne powinowactwo wobec receptorów opioidowych. Z ziarnistości chromochłonnych rdzenia nadnerczy wołu otrzymano białko o masie cząsteczkowej — jak wstępnie oznaczono — około 50 000 daltonów, nie mające zdolności interakcji z receptorem opioidowym. W wyniku trawienia białka trypsyną i karboksypeptydazą B otrzymano Met- i Leu-enkefalinę w stosunku 7 : 1, co wskazywało, iż jest ono prawdopodobnie wspólnym prekursorem obu enkefalin i innych peptydów opioidowych nadnerczy [35, 36]. Prekursor nazwano preproenkefaliną A [37, 38]. Zastosowanie metody klonowania DNA pozwoliło na wydedukowanie sekwencji aminokwasów preproenkefaliny A z nadnerczy wołu, szczura i człowieka [39—44].

Preproenkefalina A — prekursorowe białko z nadnerczy wołu składa się z 263 aminokwasów. Obliczona na tej podstawie, potwierdzona następnie doświadczalnie, masa cząsteczkowa wynosi 29 786 daltonów [45]. Białko zawiera 1 sekwencję Leu-enkefaliny i 6 sekwencji Met-enkefaliny. Sekwencja Leu-enkefaliny i cztery sekwencje Met-enkefaliny są poprzedzone i zakończone parą zasadowych aminokwasów: -Lys-Lys-, -Lys-Arg- lub -Arg-Arg-. Jedna z sekwencji Met-enkefaliny zawiera na swym C-końcu dodatkowo trójpeptyd: arginylo-glicylo-leucynę poprzedzający -Lys-Arg-. Natomiast żadna z par zasadowych aminokwasów nie występuje po Met-enkefalinie znajdującej się na C-końcu preproenkefaliny A [Ryc. 1a].

Prawdopodobnie preproenkefalina A zawiera również przyłączoną do cząsteczki resztę cukrową. Elektroforeza produktów proteolizy preproenkefaliny na żelu poliakrylamidowym wykazała pojawianie się dwóch frakcji o tym samym składzie aminokwasowym, a różniących się masą cząsteczkową [46]. Niewykluczone, iż frakcja wolniej migrująca stanowi formę glikozylowaną prekursora. Wymaga to jednak dalszego wyjaśnie-

H-Met-Ala-Arg-Phe-Leu-Gly-Leu-Cys-Thr-Trp-Leu-Leu-Ala-Leu-Gly -
 - Pro-Gly-Leu-Leu-Ala-Thr-Val-Arg-Ala-Glu-Cys-Ser-Gln-Asp-Cys-
 - Ala-Thr-Cys-Ser-Tyr-Arg-Leu-Ala-Arg-Pro-Thr-Asp-Leu-Asn-Pro-
 - Leu-Ala-Cys-Thr-Leu-Glu-Cys-Glu-Gly-Lys-Leu-Pro-Ser-Leu-Lys -
 - Trp-Trp-Glu-Thr-Cys-Lys-Glu-Leu-Leu-Gln-Leu-Thr-Lys-Leu-Glu -
 - Leu-Pro-Pro-Asp-Ala-Thr-Ser-Ala-Leu-Ser-Lys-Gln-Glu-Glu-Ser-
 - His-Leu-Leu-Ala-Lys-Lys-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Lys-Arg-Tyr-Gly -
 - Gly-Phe-Met-Lys-Lys-Met-Asp-Glu-Leu-Tyr-Pro-Leu-Glu-Val-Glu -
 - Glu-Glu-Ala-Asn-Gly-Gly-Glu-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Gly-Gly -
 - Phe-Met-Lys-Lys-Asp-Ala-Glu-Glu-Asp-Asp-Gly-Leu-Gly-Asn-Ser-
 - Ser-Asn-Leu-Leu-Lys-Glu-Leu-Leu-Gly-Ala-Gly-Asp-Gln-Arg-Glu -
 - Gly-Ser-Leu-His-Gln-Glu-Gly-Ser-Asp-Ala-Glu-Asp-Val-Ser-Lys -
 - Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Gly-Leu-Lys-Arg-Ser-Pro-His-Leu -
 - Glu-Asp-Glu-Thr-Lys-Glu-Leu-Gln-Lys-Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met -
 - Arg-Arg-Val-Gly-Arg-Pro-Glu-Trp-Trp-Met-Asp-Tyr-Gln-Lys-Arg -
 - Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-Arg-Phe-Ala-Glu-Pro-Leu-Pro-Ser-Glu -
 - Glu-Glu-Gly-Glu-Ser-Tyr-Ser-Lys-Glu-Val-Pro-Glu-Met-Glu-Lys -
 - Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe-OH

Ryc. 1a. Sekwencja aminokwasów w preproenkefalinie A z nadnerczy wołu [39]

H-Ser-Pro-Thr-Leu-Glu-Asp-Glu-His-Lys-Glu-Leu-Gln-Lys-Arg-Tyr -
 - Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Arg-Val-Gly-Arg-Pro-Glu-Trp-Trp-Met-Asp -
 - Tyr-Gly-Lys-Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH

Ryc. 1b. Sekwencja aminokwasów w peptydzie I [60]

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Arg-Val-Gly-Arg-Pro-Glu-Trp-Trp-Met -
 - Asp-Tyr-Gln-Lys-Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH

Ryc. 1c. Sekwencja aminokwasów w peptydzie E [63]

H-Asp-Ala-Glu-Glu-Asp-Asp-Gly-Leu-Gly-Asn-Ser-Ser-Asn-Leu-Leu -
 - Lys-Glu-Leu-Leu-Gly-Ala-Gly-Asp-Gln-Arg-Glu-Gly-Ser-Leu-His -
 - Gln-Glu-Gly-Ser-Asp-Ala-Glu-Asp-Val-Ser-Lys-Arg-Tyr-Gly-Gly -
 - Phe-Met-Arg-Gly-Leu-OH

Ryc. 1d. Sekwencja aminokwasów w peptydzie o masie cząsteczkowej 5300 dalt-
 nów [67]

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Lys-Lys-Met-Asp-Glu-Leu-Tyr-Pro-Leu-Glu -
 - Val-Glu-Glu-Glu-Ala-Asn-Gly-Gly-Glu-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr -
 - Gly-Gly-Phe-Met-OH

Ryc. 1e. Sekwencja aminokwasów w peptydzie F [64]

BAM-22P

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Arg-Val-Gly-Arg-Pro-Glu-Trp-Trp-Met-
 -Asp-Tyr-Gln-Lys-Arg-Tyr-Gly-OH

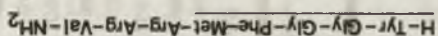
BAM-20P

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Arg-Val-Gly-Arg-Pro-Glu-Trp-Trp-Met-
 -Asp-Tyr-Gln-Lys-Arg-OH

BAM-12P

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Arg-Val-Gly-Arg-Pro-Glu-OH

Ryc. 1f. Sekwencja aminokwasów w BAM-22P, BAM-20P, BAM-12P [74, 75]



Ryc. 1g. Sekwencja aminokwasów w adrenorfinie [81].

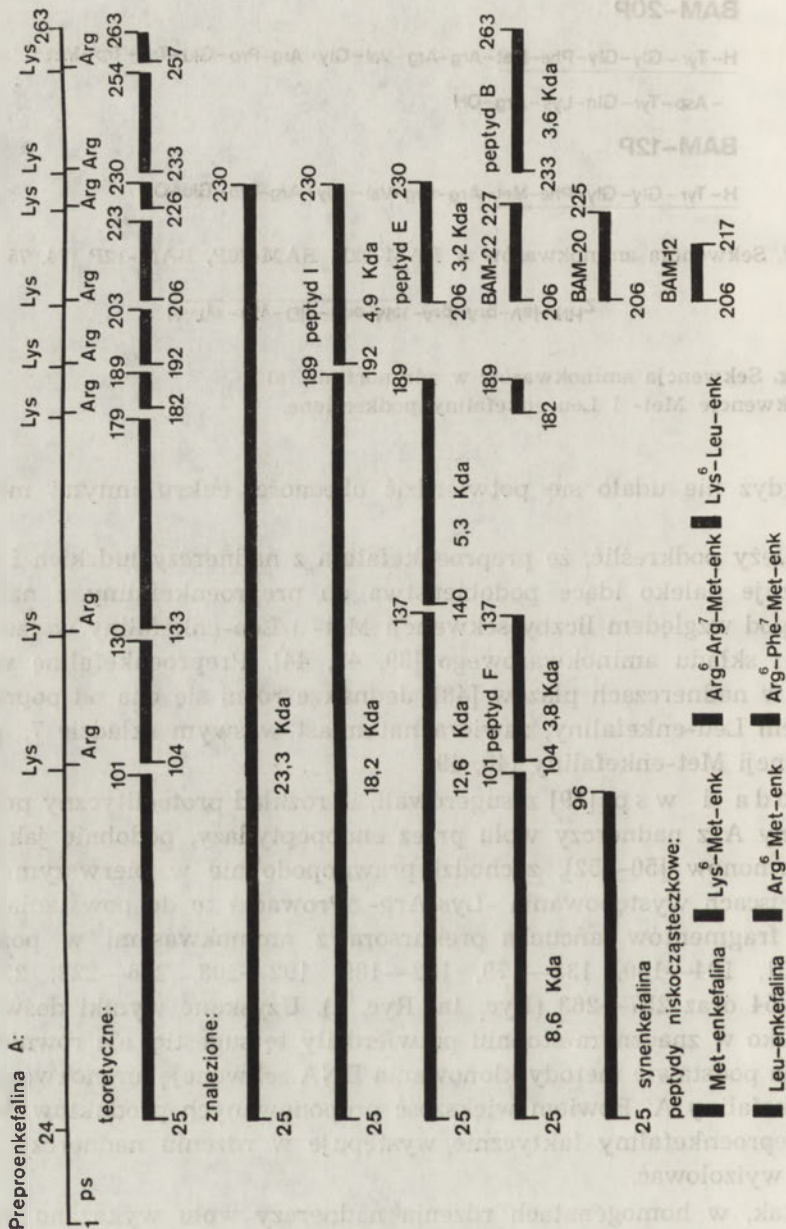
Sekwencje Met- i Leu-enkefally podkreślone.

nia, gdyż nie udało się potwierdzić obecności cukru innymi metodami [47].

Należy podkreślić, że preproenkefalina z nadnerczy ludzkich i szczura wykazuje daleko idące podobieństwa do preproenkefally z nadnerczy wołu pod względem liczby sekwencji Met- i Leu-enkefally w cząsteczce, masy i składu aminokwasowego [39, 42, 44]. Preproenkefalinę wykryto także w nadnerczach płazów [48]. Jednakże różni się ona od poprzednich brakiem Leu-enkefally, zawiera natomiast w swym składzie 7, a nie 6, sekwencji Met-enkefally [48, 49].

Noda i w s.p. [39] zasugerowali, iż rozkład proteolityczny preproenkefally A z nadnerczy wołu przez endopeptydazy, podobnie jak innych prohormonów [50—52], zachodzi prawdopodobnie w pierwszym rzędzie w miejscach występowania -Lys-Arg-. Prowadzi to do powstania mniejszych fragmentów łańcucha prekursora z aminokwasami w pozycjach: 25—101, 104—130, 133—179, 182—189, 192—203, 206—223, 226—230, 233—254 oraz 257—263 (Ryc. 1a, Ryc. 2). Uzyskane wyniki doświadczeń nie tylko w znacznym stopniu potwierdziły tę sugestię, ale również ustaloną na podstawie metody klonowania DNA sekwencję aminokwasów preproenkefally A. Bowiem większość proponowanych produktów degradacji preproenkefally faktycznie występuje w rdzeniu nadnerczy i udało się je wyizolować.

I tak, w homogenatach rdzenia nadnerczy wołu wykazano obecność białka o masie cząsteczkowej 23 300 daltonów [46, 53—57], zawierającego w swoim składzie 5 sekwencji Met-enkefally i Leu-enkefalinę na C-końcu. Sugeruje to, że cząsteczka białka stanowi fragment 25—230 łańcucha peptydowego preproenkefally (Ryc. 1a, Ryc. 2).



Ryc. 2. Schemat enzymatycznego rozkładu preproenkefaliny ps --- peptyd sygnałowy

Inne białko wyodrębnione z nadnerczy wołu w czystej postaci, o masie cząsteczkowej 18 200 daltonów, zawiera 3 sekwencje Met-enkefalin oraz oktapeptyd: [Arg⁶, Gly⁷, Leu⁸] -Met-enkefalinę na C-końcu [46, 56, 58, 59]. Dotychczas poznano skład aminokwasowy białka, natomiast nie udało się ustalić pełnej sekwencji. Jednak na podstawie masy i obecności oktapeptydu na C-końcu przypuszcza się, iż stanowi ono fragment łańcucha prekursora z aminokwasami w pozycjach 25—189 (Ryc. 1a, Ryc. 2).

Prawdopodobnie oba białka są związkami pośrednimi w procesie powstawania innych krótszych peptydów, wyodrębnionych z ziarnistości chromochłonnych rdzenia nadnerczy, takich jak: peptyd I [36, 59—61], peptyd E [36, 38, 61—63] peptyd F [36, 59, 61, 62, 64—66] oraz peptydów o masach 12 600 [46, 59, 65], 5300 [59, 67] i 8600 daltonów [46, 59, 65, 68], (Ryc. 2).

Ustalono sekwencję aminokwasów peptydu o masie 5300 daltonów oraz peptydów I, F, E (60, 63, 64, 67), (Ryc. 1b—e). Ten ostatni, w przeciwieństwie do pozostałych, charakteryzujących się małym powinowactwem wobec receptorów opioidowych, wykazuje wysoką, około 40-krotnie wyższą niż Met-enkefalina, aktywność opioidową [39, 63]. Wydaje się więc prawdopodobne, że nie tylko sama obecność sekwencji Met-enkefalin na N-końcu decyduje o aktywności opioidowej (porównać Ryc. 1b—e), lecz także odpowiednia konformacja łańcucha peptydowego.

Nie ustalono pełnej sekwencji aminokwasów w peptydach o masach 12 600 i 8600 daltonów. Pierwszy zawiera trzy Met-enkefalin i prawdopodobnie odpowiada fragmentowi 25—137 łańcucha preproenkefalin [65], (Ryc. 1a, Ryc. 2). Peptyd o masie 8600 daltonów jest fragmentem prekursora z aminokwasami w pozycjach 25—101 [65, 68], (Ryc. 1a, Ryc. 2).

Sugeruje się, iż także synenkefalina jest produktem enzymatycznego rozkładu białek o masach 23 300 i 18 200 daltonów. Synenkefalina składa się z 72 aminokwasów (fragment 25—96 łańcucha preproenkefalin) i nie zawiera Met- lub Leu-enkefalin [68, 69], (Ryc. 1a, Ryc. 2). Występuje również w mózgu [69]. Jednak jej rola zarówno w mózgu jak i nadnerczach nie jest poznana.

Z ziarnistości chromochłonnych rdzenia nadnerczy wyodrębniono także peptyd B [60]. Skład aminokwasowy, masa cząsteczkowa (3600 daltonów) oraz zidentyfikowanie na jego C-końcu heptapeptydu: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe sugerują, iż jest to prawdopodobnie fragment 233—263 łańcucha preproenkefalin. Wyizolowanie z rdzenia nadnerczy heptapeptydu w pełni potwierdza ten wniosek [70—72].

Grupa badaczy japońskich wyodrębniła z nadnerczy wołu trzy zbliżone do siebie budową i masą cząsteczkową peptydy, tzw. peptydy krowich nadnerczy, a mianowicie BAM-22P, BAM-20P i BAM-12P [73—75]. Sekwencję aminokwasów przedstawia (Ryc. 1f). Związki te powstają praw-

dopodobnie w wyniku proteolizy dłuższych prekursorów takich jak peptyd I oraz E.

Oprócz Met- i Leu-enkefally wyizolowano z rdzenia nadnerczy cały szereg niskocząsteczkowych peptydów: [Arg⁶]-Met-enkefallynę, [Arg⁶, Arg⁷]-Met-enkefallynę, [Lys⁶]-Met-enkefallynę i [Lys⁶]-Leu-enkefallynę [38, 70, 76—78]. Prawdopodobnie niektóre z nich pod wpływem karboksypeptydaz ulegają przemianie do Met- i Leu-enkefally. Trawienie trypsyną *in vitro* peptydu o masie 5300 daltonów powodowało tworzenie się oktapeptydu [Arg⁶, Phe⁷, Leu⁸]-Met-enkefallyny [67]. Również ten peptyd wykryto w stanie wolnym i wyizolowano z homogenatów nadnerczy wołu oraz człowieka [79, 80]. Z tkanki nowotworowej nadnerczy ludzkich, a także z nadnerczy zdrowych ludzi i wołu wyodrębniono amid oktapeptydu tzw. adrenorfinę, zawierający jedną sekwencję Met-enkefallyny [81]. Związek, charakteryzujący się około 15-krotnie wyższą aktywnością biologiczną niż Met-enkefallyna, stanowi fragment 210—217 łańcucha preproenkefallyny. Sekwencję aminokwasów adrenorfiny przedstawia (Ryc. 1g).

Prowadzone niezależnie w wielu ośrodkach badania nad wyjaśnieniem mechanizmu rozkładu preproenkefallyny skupiły się głównie na poszukiwaniu proteaz odpowiedzialnych za ten proces i występujących w rdzeniu nadnerczy.

Z ziarnistości chromochłonnej wyodrębniono i oczyszczono około 1000-krotnie endopeptydazę o masie cząsteczkowej 20 000—30 000 daltonów i optimum pH równym 8,0 (82—85). Enzym, niewrażliwy na inhibitory grup -SH, różnił się od lizosomalnej katepsyny D, gdyż ditiotreitól nie wpływał na jego aktywność. Natomiast hamowanie w znacznym stopniu aktywności przez inhibitory trypsyny takie jak: aprotynina i diizopropylodifluorofosforan było przesłanką do zaliczenia tej endopeptydazy do grupy trypsyno-podobnych z seryną w centrum aktywnym. Jako produkty hydrolizy przez enzym *in vitro* peptydu F, użytego jako substrat, zidentyfikowano Met-enkefallynę, [Lys⁶]-Met-enkefallynę i arginylo-Met-enkefallynę. Nie wiadomo jednak czy ten ostatni peptyd powstaje także *in vivo*, gdyż nie stwierdzono jego występowania w rdzeniu nadnerczy. Jednocześnie w tych samych badaniach wykazano, że β-lipotropina zawierająca jedną sekwencję Met-enkefallyny poprzedzoną przez -Lys-Arg- nie ulega żadnym zmianom, co świadczy o specyficzności enzymu wobec peptydów opioidowych nadnerczy [82, 85].

Inne badania potwierdziły obecność trypsyno-podobnych peptydaz w ziarnistościach chromochłonnej nadnerczy [86, 87]. Hydrolizują one *in vitro* BAM-12P i peptyd E odpowiednio do [Arg⁶]-Met-enkefallyny i Leu-enkefallyny. Jednakże w przeciwieństwie do poprzedniego enzymu, są niewrażliwe na inhibitory serynowych proteaz i różnią się optimum pH (około 5,0). Na podkreślenie zasługuje fakt ich występowania w formie roz-

puszczalnej jak i związanej z błonami ziarnistości chromochłonnych [87]. Nie wiadomo jednak jaką rolę odgrywa podwójne miejsce występowania.

Mizumo i wsp. [88] wyodrębnili z ziarnistości chromochłonnych nadnerczy wołu endopeptydazę charakteryzującą się odmiennym od poprzednich trypsyno-podobnych enzymów, sposobem rozkładu preproenkefalityny. Enzym ten, o masie 222 000 daltonów, optimum pH 5,5 i wrażliwy na kwas jodooctowy i PCMB, hydrolizował preproenkefalitynę do Met- i Leu-enkefalityny jako jedynych produktów reakcji. Także wśród produktów rozkładu BAM-12P stwierdzono tylko Met-enkefalitynę. Heksapeptydy: [Arg⁶]-Met-enkefalityna, [Lys⁶]-Met-enkefalityna, [Arg⁶]-Leu-enkefalityna i [Lys⁶]-Leu-enkefalityna nie ulegały proteolizie pod wpływem enzymu. Autorzy sugerują mechanizm działania enzymu polegający na jednoetapowym i jednoczesnym rozkładzie wiązań peptydowych utworzonych przez grupy aminowe i karboksylowe par zasadowych aminokwasów. Inne trypsyno-podobne proteazy hydrolizują tylko wiązania utworzone przez grupy karboksylowe lizyny lub argininy. Ci sami badacze wyizolowali również endopeptydazę wykazującą działanie katalityczne w zasadowych wartościach pH (7,5—9,5). Stosując jako substrat syntetyczny peptyd zawierający sekwencję Leu-enkefalityny: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Lys-Arg-Phe-Ala-NH₂ stwierdzili, że enzym rozkładał tylko wewnętrzne wiązanie peptydowe utworzone między lizyną a arginina, a jako jedyne produkty reakcji zidentyfikowano [Lys⁶]-Leu-enkefalitynę i Arg-Phe-Ala-NH₂. Diizopropylodifluorofosforan hamował aktywność enzymu, co wskazuje na obecność seryny w centrum aktywnym [89].

Na podstawie dotychczas opublikowanych danych trudno jest rozstrzygnąć, która z endopeptydaz odgrywa istotną rolę w rozkładzie preproenkefalityny. Niewykluczone, że właśnie różnorodność enzymów, działających w odmiennych wartościach pH i wrażliwych na różne inhibitory, jest przyczyną powstawania z prekursora peptydów o różnej długości łańcucha, a w żywym organizmie każda z endopeptydaz jest odpowiedzialna za rozkład jednego specyficznego dla siebie substratu. Co więcej, wydaje się, że rozkład preproenkefalityny lub związków pośrednich może zachodzić nie tylko w miejscach występowania -Lys-Arg-. Rozpad łańcucha peptydowego prowadzący do utworzenia BAM-22P i BAM-12P z prekursorów następuje między dwoma glicynami (aminokwasy w pozycjach 227—228 łańcucha preproenkefalityny) w przypadku pierwszego oraz między kwasem glutaminowym a tryptofanem (pozycje 217—218) w przypadku drugiego związku (Ryc. 1a—1c, 1f). Przypuszcza się, iż w procesie tym biorą udział inne niż trypsyno-podobne enzymy proteolityczne [73, 74]. Wymaga to jednak potwierdzenia doświadczalnego.

Istotnym zagadnieniem w tworzeniu Met- i Leu-enkefalityny jako końcowych produktów rozkładu prekursora i związków pośrednich jest udział karboksypeptydaz. Zidentyfikowanie wśród produktów rozpadu preproenkefalityny heksa- i heptapeptydów zawierających argininę lub lizynę jako

C-końcowy aminokwas wskazuje, że ich rozkład do pentapeptydów katalizuje karboksypeptydaza typu B. Niektórzy badacze stwierdzili występowanie karboksypeptydazy głównie w lizosomach komórek chromochłonnych i tylko w nieznacznych ilościach w ziarnistościach chromochłonnych [90]. Większość jednak wykazała występowanie enzymu w formie nierozpuszczalnej, związanej z błonami ziarnistości chromochłonnych, jak też wewnątrz nich w postaci rozpuszczalnej [87, 91—99]. Karboksypeptydazę udało się nie tylko wyodrębnić w czystej postaci z ziarnistości chromochłonnych, ale również określić jej właściwości fizyko-chemiczne [91—97]. Różni się ona od innych znanych karboksypeptydaz optimum pH (5,0—6,0), wrażliwością na inhibitory i masą cząsteczkową. W przeciwieństwie do karboksypeptydazy z lizosomów o-fenantrolina, EDTA i jony kadmu były silnymi inhibitorami. Z kolei jej aktywatory — jony kobaltu i niklu — nie miały wpływu na aktywność enzymu lizosomalnego. Natomiast enzymy z obu źródeł były wrażliwe na działanie odczynników blokujących grupy -SH. Stwierdzono również znaczne różnice w masach cząsteczkowych karboksypeptydazy B z trzustki, N z osocza krwi i lizosomalnej, wynoszących odpowiednio 34 000, 280 000 i 40 000—60 000, a enzymu otrzymanego z ziarnistości chromochłonnych — 50 000 daltonów. Poza nadnerczami karboksypeptydazy o takich samych właściwościach wykryto w mózgu i przysadce [95, 96], co świadczyłoby o podobieństwach rozpadu prekursorów enkefalin w tych trzech narządach. Nie mniej jednak, Rossier i wsp. [100] wykazali, że rozpad preproenkefaliny jest specyficzny dla danej tkanki i inne produkty gromadzą się w mózgu, zaś inne w nadnerczach.

Podczas przetrzymywania izolowanych ziarnistości chromochłonnych z nadnerczy wołu w temperaturze 37°C zaobserwowano zależny od czasu ilościowy wzrost okta- i heptapeptydów, Met- i Leu-enkefaliny z równoczesnym spadkiem poziomu białek i peptydów o masach cząsteczkowych 18 200 i 12 600 daltonów, co potwierdza ich rolę jako związków pośrednich w procesie rozpadu preproenkefaliny [101]. Heksapeptydy: [Lys⁶]-Met-enkefalina, [Arg⁶]-Met-enkefalina i [Lys⁶]-Leu-enkefalina, stanowiące etap pośredni biosyntezy enkefalin, również zanikały wraz z przedłużającym się czasem inkubacji. Ponadto, ilość peptydów B, E, I i F nie tylko nie ulegała obniżeniu, lecz następowało ich gromadzenie w ziarnistościach chromochłonnych. Jest to też zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, iż w nadnerczach przeważają peptydy o pośrednich masach cząsteczkowych [102].

Synteza prekursorów enkefalin i utrzymywanie ich określonego poziomu w komórce podlega prawdopodobnie regulacji transsynaptycznej przez zakończenia nerwu trzewnego. W nadnerczach szczura, gdzie w porównaniu z innymi gatunkami zwierząt występują znacznie mniejsze ilości enkefalino-podobnych peptydów, głównie nisko- i wielkocząsteczkowych,

przecięcie nerwu trzewnego powoduje początkowo gwałtowny, około 10—15-krotny wzrost stężenia białka o masie około 22 000 daltonów, a następnie jego rozkład do enkefalin i peptydów o pośrednich masach [103—106]. Podobny efekt powodowało zablokowanie receptorów nikotynowych antagonistami acetylocholin: pentametylenopiperazyną i chlorosondaminą [104, 107]. Zjawisku temu towarzyszyło zwiększenie się poziomu mRNA specyficznego dla preproenkefalin [108, 109]. Wzrost ilości enkefalinopodobnych peptydów obserwowano także po dodaniu do hodowli komórek chromochłonnych nadnerczy wołu rezerpiny uwalniającej katecholaminy z komórek [110].

W nadnerczach wołu radioaktywność pochodząca z wbudowania podanej uprzednio ^{35}S -metioniny pojawiała się początkowo w białku o masie cząsteczkowej 22 300 daltonów, a następnie w mniejszych peptydach i Met-enkefalinie [111, 112]. Podobne zjawisko zaobserwowano w ludzkich komórkach chromochłonnych hodowanych *in vitro* [113]. Niewykluczone jednak, że w komórkach chromochłonnych *in vitro* i *in vivo* zachodzi *de novo* synteza Met-, Leu-enkefalin oraz $[\text{Arg}^6]$ -Met-enkefalin z wolnych aminokwasów [114—116].

IV. Sekrecja opioidowych peptydów z nadnerczy

Wykazano, że pod wpływem acetylocholin lub związków agonistycznych następuje wzmożone wydzielanie peptydów opioidowych z hodowanych *in vitro* komórek chromochłonnych rdzenia nadnerczy wołu [5, 22, 23, 117—121]. W doświadczeniach *in vivo* podobne zwiększone wydzielanie peptydów opioidowych z nadnerczy powodowała nie tylko ich perfuzja roztworami zawierającymi acetylocholinę, nikotynę lub inne substancje agonistyczne, lecz również drażnienie elektryczne nerwu trzewnego [15, 122—125]. Sekrecja następuje prawdopodobnie w wyniku aktywacji receptorów nikotynowych komórek rdzenia nadnerczy, a nie muskarynowych. Heksametonium — antagonist acetylocholin, specyficznie blokujący receptory nikotynowe, hamuje bowiem wydzielanie peptydów opioidowych [15, 23, 25, 117, 123, 126].

Brak jest jeszcze obecnie danych wskazujących czy acetylocholina powoduje wybiórczą sekrecję z nadnerczy peptydów opioidowych o ściśle określonych masach cząsteczkowych. W doświadczeniach przeprowadzonych na izolowanych nadnerczach, jak i badaniach *in vivo* wykazano wydzielanie jedynie niskocząsteczkowych peptydów [5, 15, 122, 123, 125]. Jednak inne badania, prowadzone na izolowanych nadnerczach wołu, perfundowanych nikotyną, wskazują na obecność nie tylko enkefalin, heksa- i heptapeptydów, ale również białek i peptydów opioidowych o dużych masach cząsteczkowych: 22 300, 8000, 2000—5000 daltonów [119]. Perfuzja *in situ* nadnerczy kota acetylocholiną oraz drażnienie elektryczne nerwu

trzewnego psa i kota powodowało wydzielanie do krwi również nisko- i wysokocząsteczkowych peptydów opioidowych [124, 126]. Dalsze badania powinny przynieść wyjaśnienie tego problemu.

V. Rola fizjologiczna opioidowych peptydów nadnerczy

Peptydy opioidowe występują w ziarnistościach chromochłonnych rdzenia nadnerczy zawierających jednocześnie adrenalinę i wydzielane są *in vivo* razem z tą katecholaminą, co potwierdzono doświadczalnie [5, 15, 23, 29, 32, 33, 124, 125, 127]. Stwierdzono, że wydzielone z nadnerczy do krwioobiegu peptydy obniżają ciśnienie krwi, w przeciwieństwie do adrenaliny [128]. Wniosek poparto obserwacjami, iż u szczurów z wrodzonym nadciśnieniem tętniczym nie wykryto w nadnerczach peptydów opioidowych [129]. Ponadto u psów, którym podano rezerpinę obniżającą stężenie katecholamin w nadnerczach, drażnienie nerwu trzewnego zwiększało wydzielanie peptydów opioidowych i powodowało spadek ciśnienia tętniczego krwi [126]. Ten ostatni efekt odwracany był przez nalokson. Wykrycie receptorów opioidowych w naczyniach krwionośnych przemawia za przedstawioną hipotezą [130—132]. Prawdopodobnie Met- i Leu-enkefalina przejawiają działanie hypotensyjne [133—137]. Są jednak dane wskazujące, że wprowadzone dożylnie Leu-, Met-enkefalina oraz [Arg⁶, Phe⁷]-Met-enkefalina powodują u psa efekt odwrotny, a mianowicie wzrost ciśnienia tętniczego krwi, odwracany przez nalokson [138].

Peptydy opioidowe i adrenalina występują w tych samych strukturach komórek nadnerczy. Przypuszcza się, iż regulują one wzajemnie swoją biosyntezę w komórkach chromochłonnych rdzenia nadnerczy [139, 140].

Biologiczna rola nadnerczowych peptydów opioidowych nie jest w pełni poznana. Coraz częściej sugeruje się jednak udział niektórych z nich w reakcjach przeciwbólowych organizmu. Efekt analgetyczny [Arg⁶, Phe⁷]-Met-enkefaliny, związku o powinowactwie wobec receptorów opioidowych wynoszącym około 40% powinowactwa Met-enkefaliny, jest około 8-krotnie silniejszy niż pentapeptydu [141, 142]. Heptapeptyd działa również hamująco na neurony rdzenia kręgowego szczura [143]. Bardzo silnym działaniem przeciwbólowym charakteryzuje się także BAM-22P [144]. O udziale peptydów opioidowych w reakcjach przeciwbólowych świadczy ponadto fakt, że zarówno adrenalectomia, jak i przecięcie nerwu trzewnego powodują znaczną redukcję analgezji postresowej u szczurów [145]. Co więcej, analgezji postresowej, wywołanej u szczurów szokami elektrycznymi, towarzyszy spadek stężenia peptydu F w nadnerczach [146]. Przypuszcza się również udział peptydów pochodzących z nadnerczy w reakcjach stresowych organizmu. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że Met- i Leu-enkefalina hamują biosyntezę kortykosterydów w korze nadnerczy szczura [147]. Autorzy sugerują, iż również *in vivo* efekt ten powo-

dują peptydy opioidowe uwolnione z rdzenia i za pośrednictwem krwi dostające się do kory nadnerczy [147].

W przeciwieństwie do rdzenia nadnerczy, w zakończeniach nerwu trzewnego występują głównie niskocząsteczkowe peptydy opioidowe, lecz u człowieka i psa stwierdzono tam także obecność wysokocząsteczkowych peptydów [16—18, 21, 100]. Prawdopodobnie są one uwalniane z zakończeń nerwu wraz z acetylocholiną [3, 17, 125]. Działanie acetylocholiny uwalnianej z zakończeń nerwu trzewnego jest znane od dawna. Interakcja z receptorami cholinergicznymi komórek chromochłonnych rdzenia nadnerczy powoduje uwolnienie z nich katecholamin. Jednocześnie wiele danych wskazuje na obecność receptorów opioidowych w błonach komórek chromochłonnych [17, 125, 148—156]. Peptydy opioidowe takie jak: Met-enkefalina i [Arg⁶, Phe⁷]-Met-enkefalina, dodane do komórek chromochłonnych hodowanych *in vitro*, hamowały, wywołaną przez acetylocholinę lub nikotynę, sekrecję katecholamin [17, 148, 149, 151, 155]. Nalokson i naltrekson odwracał efekt hamowania, co sugerowało bezpośredni udział receptorów opioidowych. Co więcej, nalokson dodany do hodowli komórek chromochłonnych człowieka nie tylko odwracał hamowanie, ale powodował zwiększenie wydzielania katecholamin [149]. Również w badaniach *in vivo* wykazano, że zablokowanie receptorów opioidowych powoduje zwiększenie wydzielania adrenaliny i noradrenaliny z nadnerczy, wywołanego drażnieniem elektrycznym nerwu trzewnego psa [156, 157]. Nie wiadomo, czy wiąże się to z jednoczesnym wzrostem stężenia katecholamin w komórce. Badania, w których zaobserwowano wzrost stężenia adrenaliny i noradrenaliny w nadnerczach szczura po dootrzewnowym podaniu naloksonu, zdają się jednak na to wskazywać [158]. Wysłunięto hipotezę, że peptydy opioidowe, wydzielane razem z acetylocholiną z zakończeń nerwu trzewnego, przez interakcję z receptorami opioidowymi komórek chromochłonnych rdzenia nadnerczy powodują prawdopodobnie allosteryczną modyfikację receptorów cholinergicznymi [17, 148]. Prowadzi to do hamowania sekrecji katecholamin z komórki. Przedstawiona hipoteza wymaga jednak dalszego potwierdzenia. Nie wiadomo bowiem, jakie receptory opioidowe: μ , κ , δ czy też σ występują w komórkach chromochłonnych i uczestniczą w reakcji hamowania sekrecji katecholamin. Ponadto hepta-peptyd: [Arg⁶, Phe⁷]-Met-enkefalina, występujący w zakończeniach nerwu trzewnego i jednocześnie hamujący sekrecję katecholamin z rdzenia nadnerczy, ma bardzo małe powinowactwo wobec tych receptorów [155, 156]. Uzyskano też wyniki raczej nie wskazujące na udział receptorów opioidowych [159, 160]. Najbliższe lata winny przynieść wyjaśnienie większości spornych zagadnień.

Praca finansowana przez PAN w ramach tematu CPBP 05.05./5.1.

Artykuł otrzymano 21 stycznia 1987 r.
Zaakceptowano do druku 4 czerwca 1987 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Konecka A. M., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 443—476.
2. Przewłocki R., (1985), *Post. Biochem.*, **31**, 463—486.
3. Schultzberg M., Lundberg J. M., Hokfelt T., Terenius L., Brandt J., Elde R. P., Goldstein M., (1978), *Neuroscience*, **3**, 1169—1186.
4. Schultzberg M., Hokfelt T., Lundberg J. M., Terenius T., Elfvin L. G., Elde R., (1978), *Acta Physiol. Scand.*, **103**, 475—477.
5. Viveros O. H., Diliberto E. J., Hazum Jr. E., Chang K. J., (1979), *Mol. Pharmacol.*, **16**, 1101—1108.
6. Pelto-Huikko P., Salminen T., Hervonen A., (1982), *Histochemistry*, **73**, 493—497.
7. Lundberg J. M., Hamberger B., Schultzberg M., Hokfelt T., Granberg P. O., Efendic S., Terenius L., Goldstein M., Luft R., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4079—4093.
8. Costa E., di Giulio A. M., Kumakura K., Yang H. Y. T., (1979), *Fed. Proc.*, **38**, 1129.
9. Lundberg J. M., Schultzberg M., Hokfelt T., Johansson L., Sindhupak R., Terenius L., Hamberger B., (1979), *Acta Physiol. Scand.*, **104**, 228—230.
10. Linoilla R. I., Diaugustine R. P., Hervonen A., Miller R. J., (1980), *Neuroscience*, **5**, 2247—2259.
11. Leboulenger F., Cupo A., Castanas E., Benyamina M., Pelletier G., Vaudry H., (1986), *Neurochem. Int.*, **8**, 303—309.
12. Leboulenger F., Leroux P., Delarue C., Tonon M. C., Charnay Y., Dubois P. M., Coy D. H., Vaudry H., (1983), *Life Sci.*, **32**, 375—383.
13. Hexum T. D., Yang H. Y. T., Costa E., (1980), *Life Sci.*, **27**, 1211—1216.
14. Yang H. Y. T., Di Giulio A. M., Fratta W., Hong J. S., Majane E. A., Costa E., (1980), *Neuropharmacology*, **19**, 209—215.
15. Corder R., Mason D. F. J., Perret D., Lowry P. J., Clement-Jones V., Liston E. A., Besser G. M., Rees L. H., (1982), *Neuropeptides*, **3**, 9—17.
16. Livett B. G., Dean D. M., (1980), *Neuropeptides*, **1**, 3—13.
17. Kumakura K., Guidotti A., Yang H. Y. T., Saiani L., Costa E., (1980), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **22**, 571—580.
18. Kondo H., Kuramoto H., Iwanaga T., (1984), *Brain Res.*, **310**, 371—375.
19. Wilson S. P., Klein R. L., Chang K. J., Gasparis M. S., Viveros O. H., Yang W. H., (1980), *Nature*, **288**, 707—709.
20. Klein R. L., Gasparis M. S., Yang W. H., Viveros O. H., Wilson S. P., (1980), *Trans. Am. Soc. Neurochem.*, **11**, 326.
21. Klein R. L., Wilson S. P., Dzielak D. J., Yang W. H., Viveros O. H., (1982), *Neuroscience*, **7**, 2255—2261.
22. Rossier J., Dean D. M., Livett B. G., Udenfriend S., (1981), *Life Sci.*, **28**, 781—789.
23. Viveros O. H., Diliberto E. J., Hazum Jr. E., Chang K. J., (1980), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **22**, 191—204.
24. Hervonen A., Pelto-Huikko M., Linnoila I., (1980), *Am. J. Anat.*, **157**, 445—448.
25. Stine S. M., Yang H. Y. T., Costa E., (1980), *Neuropharmacology*, **19**, 683—685.
26. Stern A. S., Lewis R. V., Kimura S., Rossier J., Gerber L. D., Brink L., Stein S., Udenfriend D., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6680—6683.

27. Holz R. W., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7751—7755.
28. Leboulenger F., Leroux P., Tonon M. C., Coy D. H., Vaudry H., Pelletier G., (1983), *Neurosci. Lett.*, **37**, 221—225.
29. Livett B. G., Day R., Elde R. P., Howe P. R. C., (1982), *Neuroscience*, **7**, 1323—1332.
30. Pelto-Huikko M., Salminen T., Hervonen A., (1985), *Histochemistry*, **82**, 377—383.
31. Kondo H., Yui R., (1984), *Histochemistry*, **80**, 243—246.
32. Roisin M. P., Artola A., Henry J. P., Rossier J., (1983), *Neuroscience*, **10**, 83—88.
33. Rossier J., Liston D., Patey G., Chaminade M., Foutz A. S., Cupo A., Giraud P., Roisin M. P., Henry J. P., Verbanck P., Vanderhaeghen J. J., (1983), *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **48**, 393—404.
34. Lang R. E., Tauger G., Gaida W., Ganten D., Kraft K., Unger Th., Wunderlich I., (1983), *Eur. J. Pharmacol.*, **86**, 117—120.
35. Lewis R. V., Stern A. S., Kimura S., Rossier J., Stein S., Udenfriend S., (1980), *Science*, **208**, 1459—1461.
36. Rossier J., (1981), *Trends Neurosci.*, **4**, 94—97.
37. Hollt V., (1983), *Trends Neurosci.*, **6**, 24—26.
38. Udenfriend S., Kilpatrick D. L., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **221**, 309—323.
39. Noda M., Furutani Y., Takahashi H., Toyosato M., Hirose T., Inayama S., Nakanishi S., Numa S., (1982), *Nature*, **295**, 202—206.
40. Gubler U., Kilpatrick D. L., Seeburg P. H., Gage L. P., Udenfriend S., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5484—5487.
41. Gubler U., Seeburg P., Hoffman B. J., Gage L. P., Udenfriend S., (1982), *Nature*, **295**, 206—208.
42. Comb M., Seeburg P. H., Adelman J., Eiden L., Herbert E., (1982), *Nature*, **295**, 663—666.
43. Noda M., Teranishi Y., Takahashi H., Toyosato M., Notake M., Nakanishi S., Numa S., (1982), *Nature*, **297**, 431—434.
44. Howells R. D., Kilpatrick D. L., Bhatt R., Monahan J. J., Poonian M., Udenfriend S., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7651—7655.
45. Sabol S. L., Liang C. M., Dandekar S., Kranzler L. S., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 2697—2704.
46. Patey G., Liston D., Rossier J., (1984), *FEBS Lett.*, **172**, 303—308.
47. Kilpatrick D. L., Gibson K. D., Jones B. N., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **224**, 402—404.
48. Leboulenger F., Charnay Y., Dubois P. M., Rossier J., Vaudry H., (1984), *Neurochem. Int.*, **6**, 773—777.
49. Martens G. M. J., Herbert E., (1984), *Nature*, **310**, 251—254.
50. Nakanishi S., Inoue A., Kita T., Nakamura M., Chang A. C. Y., Cohen S., Numa S., (1979), *Nature*, **278**, 423—427.
51. Lund P. K., Goodman R. H., Habener J. F., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 6515—6518.
52. Steiner D. F., Quinn P. S., Chan S. J., Marsh J., Tager H., (1980), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **243**, 1—16.
53. Patey G., Liston D., Rossier J., (1985), *Neuropeptides*, **5**, 513—516.
54. Fischer-Colbrie R., Diez-Guerra J., Emson P. C., Winkler H., (1986), *Neuroscience*, **18**, 167—174.
55. Lewis R. V., Stern A. S., Rossier J., Stein S., Udenfriend S., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **89**, 822—829.

56. Lewis R. V., Stern A. S., Kimura S., Rossier J., Brink L., Gerber L. D., Stein S., Udenfriend S., (1980), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **22**, 167—179.
57. Fischer-Colbrie R., Frischenschlanger I., (1985), *J. Neurochem.*, **44**, 1854—1861.
58. Kilpatrick D. L., Jones B. N., Lewis R. V., Stern A. S., Kijima K., Shively J. E., Udenfriend S., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3057—3061.
59. Kojima K., Kilpatrick D. L., Stern A. S., Jones B. N., Udenfriend S., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **215**, 638—643.
60. Stern A. S., Jones B. N., Shively J. E., Stein S., Udenfriend S., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1962—1966.
61. Artola A., Liston D., Rossier J., (1982), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **33**, 193—201.
62. Lewis R. V., (1982), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **33**, 167—174.
63. Kilpatrick D. L., Taniguchi T., Jones B. N., Stern A. S., Shively J. E., Hullihan J., Kimura S., Stein S., Udenfriend S., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3265—3268.
64. Kimura S., Lewis R. V., Stern A. S., Rossier J., Stein S., Udenfriend S., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1681—1685.
65. Jones B. N., Shively J. E., Kilpatrick D. L., Stern A. S., Lewis R. V., Kojima K., Udenfriend S., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2096—2100.
66. Jones B. N., Stern A. S., Lewis R. V., Kimura S., Stein S., Udenfriend S., Shively J. E., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **204**, 392—395.
67. Jones B. N., Shively J. E., Kilpatrick D. L., Kojima K., Udenfriend S., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1313—1315.
68. Liston D., Bohlen P., Chabrier P. E., Rossier J., (1983), *Life Sci.*, **33**, Suppl., **1**, 45—47.
69. Liston D. R., Vanderhaeghen J. J., Rossier J., (1983), *Nature*, **302**, 62—65.
70. Stern A. S., Lewis R. V., Kimura S., Rossier J., Stein S., Udenfriend S., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **205**, 606—613.
71. Yoshimasa T., Nakao K., Ikeda Y., Sakamoto M., Suda M., Imura H., (1983), *Life Sci.*, **33**, Suppl., **1**, 85—88.
72. Stern A. S., Lewis R. V., Kimura S., Rossier J., Gerber L. D., Brink L., Stein S., Udenfriend S., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6680—6683.
73. Mizumo K., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **95**, 1482—1488.
74. Mizumo K., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **97**, 1283—1290.
75. Baird A., Ling N., Bohlen P., Benoit R., Klepper R., Guillemin R., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2023—2025.
76. Yang H. Y. T., Hexum T. D., Majane E., Costa E., (1980), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **22**, 181—190.
77. Yang H. Y. T., Costa E., Di Giulio A. M., Fratta W., Hong J. S., (1979), *Fed. Proc.*, **38**, 364.
78. Clement-Jones V., Corder R., Lowry P. J., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **95**, 665—673.
79. Kilpatrick D. L., Jones B. N., Kojima K., Udenfriend S., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **103**, 698—705.

80. Yoshimasa T., Nakao K., Ikeda Y., Sakamoto M., Suda, M., Imura H., (1983), *Life Sci.*, **33**, *Suppl.*, 1, 85—88.
81. Matsuo H., Miyata A., Mizuno K., (1983), *Nature*, **305**, 721—723.
82. Lindberg I., Yang H. Y. T., Costa E., (1982), *Adv. Biochem., Psychopharmacol.*, **33**, 183—191.
83. Lindberg I., Yang H. Y. T., Costa E., (1982), *Life Sci.*, **31**, 1713—1716.
84. Linberg I., Yang H. Y. T., Costa E., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **106**, 183—193.
85. Lindberg I., Yang H. Y. T., Costa E., (1984), *J. Neurochem.*, **42**, 1411—1419.
86. Evangelista R., Ray P., Lewis R. V., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **106**, 895—902.
87. Troy C. M., Musacchio J. M., (1982), *Life Sci.*, **31**, 1717—1720.
88. Mizuno K., Miyata A., Kangawa K., Matsuo H., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **108**, 1235—1242.
89. Mizuno K., Matsuo H., (1985), *Neuropeptides*, **5**, 489—492.
90. Wallace E. F., Ewans C. J., Jurik S. M., Mefford I. N., Barchas J. D., (1982), *Life Sci.*, **31**, 1793—1796.
91. Hook V. Y. H., Eiden L. E., Brownstein M. J., (1982), *Nature*, **295**, 341—342.
92. Hook V. Y. H., Eiden L. E., (1984), *FEBS Lett.*, **172**, 212—218.
93. Hook V. Y. H., Eiden L. E., Pruss R. M., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 5991—5997.
94. Fricker L. D., Snyder S. H., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3886—3890.
95. Fricker L. D., Snyder S. H., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 10950—10955.
96. Fricker L. D., Supattapone S., Snyder S. H., (1982), *Life Sci.*, **31**, 1841—1844.
97. Fricker L. D., Plummer T. H., Snyder S. H., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **111**, 994—1000.
98. Supattapone S., Fricker L. D., Snyder S. H., (1984), *J. Neurochem.*, **42**, 1017—1023.
99. Hook V. Y. H., (1984), *Neuropeptides*, **4**, 117—126.
100. Liston D., Patey G., Rossier J., Verbanck P., Vanderhaeghen J. J., (1984), *Science*, **225**, 734—737.
101. Fleminger G., Ezra E., Kilpatrick D. L., Udenfriend S., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6418—6421.
102. Yang H. Y. T., Hexum T., Costa E., (1980), *Life Sci.*, **27**, 1119—1125.
103. Lewis R. V., Stern A., Kilpatrick D. L., Gerber L. D., Rossier J., Stein S., Udenfriend S., (1981), *J. Neurosci.*, **1**, 80—82.
104. La Gamma E. F., Adler J. E., Black I. B., (1984), *Science*, **22**, 1102—1104.
105. Fleminger G., Lahm H. W., Udenfriend S., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3587—3590.
106. Fleminger G., Howells R. D., Kilpatrick D. L., Udenfriend S., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7985—7988.
107. Bohn M. C., Kessler J. A., Golightly L., Black I. B., (1983), *Cell Tissue Res.*, **231**, 469—479.
108. Kilpatrick D. L., Howells R. D., Fleminger G., Udenfriend S., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7221—7223.
109. Bloch B., Milner R. J., Baird A., Gubler U., Reymond Ch., Bohlen P., le Guellec D., Bloom F. E., (1984), *Regulatory Peptides*, **8**, 345—354.
110. Wilson S. P., Abou-Donia M. M., Chang K. J., Viveros O. H., (1981), *Neuroscience*, **6**, 71—79.

111. Rossier J., Trifaro J. M., Lewis R. V., Lee R. W. H., Stern A. Kimura S., Stein S., Udenfriend S., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6889—6891.
112. Sabol S. L., Dandekar S., Kranzler L. S., (1982), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **33**, 175—181.
113. Giraud P., Eiden L. E., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **99**, 969—975.
114. Tan L., Yu P. H., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **95**, 1901—1908.
115. Wilson S. P., Chang K. J., Viveros O. H., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4364—4368.
116. Eiden L. E., Giraud P., Afflter H. U., Herbert E., Hotchkiss A. J., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3949—3953.
117. Hexum T. D., Barron B. A., (1984), w Dynamics of Neurotransmitter Function (ed. Hanin I), Raven Press, New York, str. 137—142.
118. Eiden L. E., Giraud P., Dave J. R., Hotchkiss A. J., Uffolter H. U., (1984), *Nature*, **312**, 661—663.
119. Kilpatrick D. L., Lewis R. V., Stein S., Udenfriend S., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7473—7475.
120. Livett B. G., Dean D. M., Whelan L. G., Udenfriend S., Rossier J., (1981), *Nature*, **289**, 317—319.
121. Stine S., Yang H. Y. T., Costa E., (1980), *Fed. Proc.*, **39**, 386.
122. Hexum T. D., Hanbauer I., Govoni S., Yang H. Y. T., (1980), *Neuropeptides*, **1**, 137—142.
123. Govoni S., Hanbauer I., Hexum T. D., Yang H. Y. T., Kelly G. D., Costa E., (1981), *Neuropharmacology*, **20**, 639—645.
124. Chaminade M., Foutz A. S., Rossier J., (1984), *J. Physiol.*, **353**, 157—169.
125. Costa E., Guidotti A., Hanbauer I., Kageyama H., Kataoka Y., Panula P., Quach T. T., Schwartz J. P., (1984), w Catecholamines: Basic and Peripheral Mechanism, (ed. Liss A. R.), Inc, New York, str. 153—161.
126. Hanbauer I., Govoni S., Majane E. A., Yang H. Y. T., Costa E., (1982), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **33**, 209—215.
127. Uvnas B., Aborg C. H., (1985), *Acta Physiol. Scand.*, **124**, 629—630.
128. Fuji T., Izumi M., Tomori M., (1985), *Proc. Japan Acad.*, **61**, Ser. B, 403—406.
129. Di Giulio A. M., Yang H. Y. T., Fratta W., Costa E., (1979), *Nature*, **278**, 646—647.
130. Illes P., Pfeiffer N., Limberger N., Starke K., (1983), *Life Sci.*, **33**, Suppl., **1**, 307—310.
131. Ronai A. Z., Harsing L. G., Berzetei I. P., Bajusz S., Vizi S., (1982), *Eur. J. Pharmacol.*, **79**, 337—338.
132. Ronai A. Z., Berzetei I., (1978), w Endorphins 78 (eds. Graf L., Palkovits M., Ronai A. Z.), Akademiai Kiado, Budapest, Excerpta Medica, Amsterdam, str. 237—262.
133. Koyama S., Terada N., Shiojima Y., Takeuchi T., (1985), *Experientia*, **41**, 1394—1396.
134. Eulie P., Rhee H. M., (1985), *An. N.Y. Acad. Sci.*, **435**, 408—411.
135. Rhee H. M., Tyler L., (1984), *Clin. Exp. Theory Practise*, **A6**, 2063—2067.
136. Ruth J. A., Eiden E., (1984), *Neuropeptides*, **4**, 101—108.
137. Ronai A. Z., Serfozo P., Harsing L. G. Jr., Vizi S. E., (1983), *Life Sci.*, **33**, Suppl., **1**, 101—104.
138. Sander G. E., Giles T. D., (1985), *Life Sci.*, **36**, 2201—2207.
139. Casselin F., Pique L., Bertagna X., Benlot C., Antressian J., Proesche M. F., Girard F., Zogbi F., Legrand J. C., Luton J. P., Dauchy J., Thibault J., (1984), *Neuropeptides*, **4**, 175—182.

140. Wilson S. P., Chang K. J., Viveros O. H., (1981), *Peptides*, 2, Suppl., 1, 83—88.
141. Inturrisi C. E., Umans J. G., Wolf D., Stern A. S., Lewis R. V., Stein S., Udenfriend S., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5512—5514.
142. Rossier J., Audiger Y., Ling N., Gros J., Udenfriend S., (1980), *Nature*, 288, 88—90.
143. Gayton R. J., (1982), *Nature*, 298, 275—276.
144. Hollt V., Haarmann I., Grimm C., Herz A., Tulunay F. C., Loh H. H., (1982), *Life Sci.*, 31, 1883—1886.
145. Lewis J. W., Tordoff M. G., Sherman J. E., Liebeskind J. C., (1982), *Science*, 217, 557—559.
146. Alessi N., Taylor L., Akil H., (1982), *Life Sci.*, 31, 1875—1878.
147. Racz K., Glaz E., Kiss R., Lada G., Varga I., Vida S., Di Gleria K., Medzihradzsky K., Lichtwald K., Vecsei P., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 97, 1346—1353.
148. Kumakura K., Karoum F., Guidotti A., Costa E., (1980), *Nature*, 283, 489—492.
149. Castanas E., Giraud P., Audiger Y., Drissi R., Boudoresque F., Conte-Devolx B., Oliver C., (1983), *Life Sci.*, 33, Suppl., 1, 295—298.
150. Quirion R., Finkel M. S., Mendelson F. A. O., Zamir N., (1983), *Life Sci.*, 33, Suppl., 1, 299—302.
151. Lemaire S., Lemaire I., Dean D. M., Livett B. G., (1980), *Nature*, 288, 303—304.
152. Costa E., Guidotti A., Saiani L., (1980), *Nature*, 288, 304.
153. Chavkin C., Cox B. M., Goldstein A., (1979), *Mol. Pharmacol.*, 15, 751—753.
154. Leslie F. M., Chavkin C., Cox B. M., (1980), *J. Pharmacol., Exp. Ther.*, 214, 395—402.
155. Saiani L., Guidotti A., (1982), *J. Neurochem.*, 39, 1669—1676.
156. Costa E., Guidotti A., Hanbauer I., Saiani L., (1983), *Fed. Proc.*, 42, 2946—2952.
157. Costa E., Guidotti A., Hanbauer I., Hexum T. D., Saiani L., Stine S., Yang H. Y. T., (1981), *Fed. Proc.*, 40, 160—165.
158. Konecka A. M., (1982), *Gen. Pharmacol.*, 13, 249—250.
159. Dean D. M., Lemaire S., Livett B. G., (1982), *J. Neurochem.*, 38, 606—614.
160. Lemaire S., Livett B., Tseng R., Mercier P., Lemaire I., (1981), *J. Neurochem.*, 36, 866—892.

- 140. [Faint text]
- 141. [Faint text]
- 142. [Faint text]
- 143. [Faint text]
- 144. [Faint text]
- 145. [Faint text]
- 146. [Faint text]
- 147. [Faint text]
- 148. [Faint text]
- 149. [Faint text]
- 150. [Faint text]
- 151. [Faint text]
- 152. [Faint text]
- 153. [Faint text]
- 154. [Faint text]
- 155. [Faint text]
- 156. [Faint text]
- 157. [Faint text]
- 158. [Faint text]
- 159. [Faint text]
- 160. [Faint text]
- 161. [Faint text]
- 162. [Faint text]
- 163. [Faint text]
- 164. [Faint text]
- 165. [Faint text]
- 166. [Faint text]
- 167. [Faint text]
- 168. [Faint text]
- 169. [Faint text]
- 170. [Faint text]
- 171. [Faint text]
- 172. [Faint text]
- 173. [Faint text]
- 174. [Faint text]
- 175. [Faint text]
- 176. [Faint text]
- 177. [Faint text]
- 178. [Faint text]
- 179. [Faint text]
- 180. [Faint text]
- 181. [Faint text]
- 182. [Faint text]
- 183. [Faint text]
- 184. [Faint text]
- 185. [Faint text]
- 186. [Faint text]
- 187. [Faint text]
- 188. [Faint text]
- 189. [Faint text]
- 190. [Faint text]
- 191. [Faint text]
- 192. [Faint text]
- 193. [Faint text]
- 194. [Faint text]
- 195. [Faint text]
- 196. [Faint text]
- 197. [Faint text]
- 198. [Faint text]
- 199. [Faint text]
- 200. [Faint text]

MAŁGORZATA WILK*

Enzymy rozkładające enkefaliny i ich rola w metabolizmie enkefalin

Enkephalins hydrolysing enzymes and their role in metabolism of enkephalins.

Spis treści

- I. Wstęp**
- II. Aminopeptydazy**
 - II-1. Aminopeptydazy frakcji rozpuszczalnej komórki**
 - II-2. Aminopeptydazy błonowe**
 - II-3. Inhibitory aminopeptydaz hydrolizujących enkefaliny**
- III. Hydrolaza peptydylowo-dipeptydowa (ACE)**
- IV. Enkefalinaza A**
 - IV-1. Właściwości fizykochemiczne**
 - IV-2. Oznaczenie aktywności i występowanie**
 - IV-3. Mechanizm działania**
 - IV-4. Inhibitory enkefalinazy**
- V. Enkefalinaza B**
- VI. Metabolizm endogennych enkefalin**
- VII. Uwagi końcowe**

Contents

- I. Introduction**
- II. Aminopeptidases**
 - II-1. Aminopeptidases of cellular fraction**
 - II-2. Membrane aminopeptidases**
 - II-3. Inhibitors of aminopeptidases hydrolysing enkephalins**
- III. Angiotensin — converting enzyme (ACE)**
- IV. Enkephalinase A**
 - IV-1. Physical and chemical properties**
 - IV-2. Determination of activity and localization**

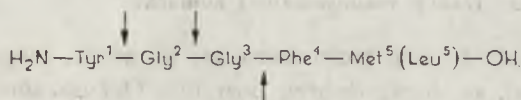
*Dr, Zakład Leków Hormonalnych, Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

IV-3. Mechanism of reaction**IV-4. Inhibitors of enkephalinase****V. Enkephalinase B****VI. Metabolism of endogenous enkephalins****VII. Concluding remarks****I. Wstęp**

Enkefaliny — endogenne ligandy receptorów opiatowych występujące w wielu strukturach ośrodkowego układu nerwowego, zostały odkryte w 1975 r. przez Hughesa i wsp. [1]. Związki te mają właściwości farmakologiczne podobne do morfiny i innych narkotycznych lektów przeciwbólowych. Enkefaliny tkanki mózgowej są mieszaniną dwóch penta-peptydów o jednakowej sekwencji w pozycjach 1-4 (Tyr¹-Gly²-Gly³-Phe⁴), a różniących się tylko C-końcowym aminokwasem. Zależnie od rodzaju tego aminokwasu wyróżniane są: metionilo-enkefalina (Met⁵-enkefalina) i leucyloenkefalina (Leu⁵-enkefalina). Po odkryciu enkefalin wysunięto przypuszczenie, że mogą one odgrywać rolę neurotransmiterów w ośrodkowym układzie nerwowym. Ich rola w procesie przekazywania bodźców pomiędzy dwoma neuronami, w obrębie synapsy, nie została jednak w pełni wyjaśniona. Trwa dyskusja, czy i w jakim stopniu spełniają one rolę neuromodulatorów lub neuroprzekaźników. Za ich udziałem w procesie przekazywania bodźca między dwoma neuronami przemawiają następujące fakty: 1) enkefaliny syntetyzowane są w specyficznych neuronach tj. neuronach enkefalinergicznym [2, 3]; 2) w tkance nerwowej występują enzymy degradujące enkefaliny [4, 5, 6]; 3) depolaryzacja błon neuronalnych wysokimi stężeniami K⁺ powoduje uwolnienie enkefalin [7, 8]; 4) enkefaliny wiążą się z receptorami opiatowymi [9, 10].

Enkefaliny są związkami o krótkotrwałym działaniu biologicznym. Po ich podaniu systemowym (i.v., s.c., i.m.) nie obserwuje się żadnych efektów farmakologicznych. Wstrzyknięte bezpośrednio do struktur mózgowych lub komór mózgowych działają silnie analgetycznie (przeciwbólowo), lecz zaledwie przez kilka minut. Już w pierwszych pracach związanych z izolowaniem i identyfikacją enkefalin sugerowano, że szybki spadek ich aktywności biologicznej jest związany z rozkładem cząsteczki przez enzymy proteolityczne [1, 3, 6]. Dlatego też w wielu laboratoriach zajęto się poszukiwaniem specyficznych enzymów powodujących utratę biologicznej aktywności enkefalin. W początkowym okresie badań stwierdzono, że w kilkadziesiąt sekund po podaniu dokomorowo myszy 3H-(Leu⁵)-enkefaliny, ponad 80—90% oznaczonej radioaktywności pochodzi z tyrozyny, będącej produktem rozpadu enkefalin [6]. Dawało to podstawę do stwierdzenia, że za degradację enkefalin odpowiedzialne są głównie aminopeptydazy, rozszczepiające wiązanie Tyr¹-Gly². W toku dalszych badań potwierdzono

udział aminopeptydaz w hydrolizie enkefalin, które nie są jednak jedynymi enzymami biorącymi udział w tym procesie. W roku 1978 *Malfroy* i w s.p. [10] znaleźli we frakcji nierozpuszczalnych fragmentów komórki w mózgu myszy enzym, hydrolizujący wiązanie Gly³-Phe⁴ enkefalin. Aktywność enzymu rosła po podaniu morfiny. Dla enzymu tego zaproponowano nazwę enkefalinaza. Wkrótce potem, również w 1978 r. *Erdős* i w s.p. [11] wykazali, że oczyszczona hydrolaza peptydylo-dipeptydowa (ACE), przekształcająca angiotensynę I w angiotensynę II, może również hydrolizować enkefaliny, przy czym rozszczepieniu ulega, podobnie jak przy działaniu enkefalinazy, wiązanie Gly³-Phe⁴. W następnym roku w homogenatach mózgu szczura, znaleziono enzym hydrolizujący wiązanie Gly²-Gly³ enkefalin i nazwano go enkefalinazą B [12]. Cztery lata po odkryciu enkefalin wiedziano już więc, że spośród czterech wiązań peptydowych występujących w cząsteczce enkefaliny, trzy z nich są szczególnie podatne na hydrolizę enzymatyczną.



Podsumowując, wiązanie Tyr¹-Gly² enkefalin jest rozszczepiane przez aminopeptydazy. Wiązanie Gly³-Phe⁴ hydrolizuje zarówno karboksypeptydaza dipeptydyłowa (enkefalinaza, enkefalinaza A), jak i hydrolaza peptydylo-dipeptydowa (ACE). Za hydrolizę wiązania Gly²-Gly³ odpowiedzialna jest enkefalinaza B. Zależnie od frakcji komórkowej i występujących w niej enzymów, rozkład enkefalin może przebiegać różnymi drogami. W homogenatach lub frakcji rozpuszczalnej komórek rozszczepieniu ulega przede wszystkim wiązanie Tyr¹-Gly², a we frakcji wysokooczyszczonych błon komórkowych wiązanie Gly³-Phe⁴.

Zidentyfikowanie czterech enzymów rozkładających enkefaliny pozwoliło w następnych latach na oczyszczenie, zcharakteryzowanie oraz podjęcie prób nad ustaleniem ich roli w metabolizmie enkefalin.

II. Aminopeptydazy

Aminopeptydazy są enzymami należącymi do grupy hydrolaz α -aminoacylopeptydów (E.C.3.4.1). Dla swojej aktywności grupa tych enzymów (określanych też jako N-końcowe peptydazy) wymaga wolnej grupy α -aminowej lub α -iminowej substratu i hydrolizuje wiązanie peptydowe przy, lub blisko N-końca łańcucha peptydowego. α -aminoacylopeptydazy są szeroko rozpowszechnione w tkankach zwierzęcych, w których występują w postaci mieszaniny hydrolaz aminoacylopeptydów. Znajdują się one zarówno we frakcji rozpuszczalnej komórki jak i w błonach komórkowych.

Enzymy te hydrolizują wiele L-peptydów, odszczepiając N-końcową resztę z wolną grupą aminową, a także hydrolizują dwu- i trójpeptydy [13]. Ze względu na powszechność występowania i małą specyficzność trudno było ustalić, które z aminopeptydaz biorą udział w rozkładzie enkefalin. Bezpośrednie dane dotyczące roli aminopeptydaz w degradacji enkefalin pochodzą z doświadczeń, w których po inkubacji enkefalin z homogenatami mózgu stwierdzono obecność wolnej tyrozyny [14, 15, 16]. Aktywność aminopeptydaz w homogenatach tkankowych rozszczepiających wiązanie Tyr¹-Gly² enkefalin może być mierzona różnymi metodami. Najczęściej stosuje się metodę, w której używa się (3H-Tyr¹)-enkefalin jako substratu, a następnie izoluje i mierzy ilość uwolnionej 3H-Tyr [6, 10, 14, 15, 17, 18]. W innych metodach stosuje się jako substrat nieradioaktywną enkefalinę. Uwolnione w wyniku reakcji hydrolizy aminokwasy izoluje się i oznacza w analizatorze aminokwasów [19].

II-1. Aminopeptydazy frakcji rozpuszczalnej komórki

Aminopeptydazy frakcji rozpuszczalnej komórki, biorące udział w degradacji enkefalin, są dosyć dobrze poznane. Oczyszczono enzymy otrzymane z mózgu szczura [20], mózgu małpy [21], mózgu wołu [22] i mózgu ludzkiego [23]. Najważniejsze własności aminopeptydaz rozkładających enkefalinę przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Charakterystyka mózgowych aminopeptydaz rozkładających enkefalinę

Źródło enzymu	Mózg [wg 20] szczura	Mózg [wg 21] małpy	Mózg [wg 22] wołu	Mózg [wg 23] człowieka
Masa cząsteczkowa	100.000	92.000	98.000	61.500
Optimum pH	7	7	brak danych	7,4
K _m substratu (μM)				
(Met ⁵)-enkefalina	3	167	22	64
(Leu ⁵)-enkefalina	60	161	22	
Inaktywacja przez:				
związki tiolowe	+	+	+	+
związki chelatujące	+	+	+	+

Aminopeptydazy są najbardziej aktywne przy pH 7. Masa cząsteczkowa oczyszczonych enzymów waha się przeważnie w granicach 92 000—100 000 [20, 22], jedynie masa cząsteczkowa enzymu z mózgu ludzkiego wynosi 62 000 [23]. Enzym wołowy, małpi i ludzki są pojedynczymi łań-

cuchami polipeptydowymi [21, 22, 23], natomiast enzym z mózgu szczura jest dimerem [20]. Stała Michaelisa aminopeptydaz wobec enkefalin jest w większości przypadków w granicach 3—60 μM [20, 22], a tylko enzym z mózgu małpy charakteryzuje się znacznie wyższą wartością ($K_m = 160 \mu\text{M}$) [21]. Aminopeptydazy są metaloenzymami zawierającymi jon cynku w centrum aktywnym enzymu. Związanie grupy prostetycznej enzymu przez dodatek np. EDTA daje nieaktywny apoenzym [20, 22, 23]. Aktywność enzymu można przywrócić przez dodanie jonów metali dwuwartościowych takich jak Zn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} [20, 22]. Aminopeptydazy degradujące enkefaliny hamuje p-chlorortęciobenzoesan [5, 15] i p-chlorortęciofenylosulfonian [6, 10] co sugeruje, że są to enzymy należące do grupy proteaz tiolowych. Stosunkowo niewiele wiadomo na temat substratowej specyficzności tych enzymów. Podstawienie Gly^2 w enkefalinie przez D-aminokwas (D-Ala lub D-Met), powoduje około 20-krotne zmniejszenie powinowactwa enzymu wobec substratu [10], czego wynikiem jest znaczne zahamowanie uwalniania Tyr^1 [16]. Podobnie modyfikacja C końcowej części pentapeptydu obniża znacznie ilość uwolnionej Tyr^1 [16]. Wzrost długości łańcucha peptydowego substratu zmniejsza aktywność enzymatyczną. Przykładowo, enzym z mózgu wołu rozszczepia wiązania $\text{Tyr}^1\text{-Gly}^2 \alpha$ i γ endorfiny przy 1/3 szybkości rozszczepiania tego wiązania w enkefalinach [24], podczas gdy β endorfina jest hydrolizowana przy szybkości ok. 5% szybkości hydrolizy enkefalin [16, 24]. Aminopeptydazy mają również zdolność degradacji dwupeptydów typu L-Tyr-aminokwas, L-Ala-aminokwas, L-Phe-aminokwas i L-Leu-aminokwas oraz trójpeptydu L-Leu-Gly-Gly [21, 22]. Najwyższe aktywności aminopeptydaz degradujących enkefaliny znajdowano we frakcji rozpuszczalnej homogenatów mózgu [20—23], w jelicie świnki morskiej [25, 26, 27, 28] i w osoczu krwi [14, 15].

II-2. Aminopeptydazy błonowe

Aminopeptydazy znajdujące się we frakcji rozpuszczalnej komórki nie są jedynymi aminopeptydazami rozszczepiającymi wiązanie $\text{Tyr}^1\text{-Gly}^2$ w enkefalinach. W kilku laboratoriach stwierdzono, że aktywność aminopeptydazowa występowała także w wysoko oczyszczonej frakcji błon komórkowych, otrzymanych po wirowaniu przy 100 000—120 000 $\times g$. Aktywność ta nie wynikała z zanieczyszczenia frakcji błonowej przez frakcję cytosolową komórki [10, 15, 18]. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy występowaniem aktywności a poziomem enkefalin, jak również z rozmieszczeniem receptorów opiatowych [6, 12]. Aktywność enzymu oznaczyć można było dopiero po uwolnieniu go z błon komórkowych pod wpływem Tritonu X—100 i po chromatografii tak otrzymanego preparatu enzymatycznego na DEAE celulozie [18]. Uzyskano dwie frakcje o aktywności aminopeptydazowej, które oznaczono jako MI (aminopeptydaza MI) i MII

(aminopeptydaza MII) [29]. Aminopeptydaza MII ma największą aktywność przy pH 6,7. Hydrolizuje ona aminokwasowe β -naftyłamidy a także, lecz ze znacznie mniejszą szybkością (20% szybkości rozkładu enkefalin), γ endorfiny. Czynniki chelatujące jak np. EDTA wpływają na utratę aktywności tego enzymu, natomiast jony dwuwartościowe przywracają ją. Wartość K_m dla enkefalin wynosi ok. 20 μM . Aminopeptydaza oznaczana jako MI charakteryzuje się stosunkowo wysoką wartością K_m , rzędu 500—2500 μM i nie hydrolizuje α i γ endorfin. Aminopeptydazy MI i MII hamowane są przez bacytracynę [18], EDTA [29], kwas p-chlorortęciofenylosulfonowy oraz bardzo silnie przez bestatynę [5, 30].

II-3. Inhibitory aminopeptydaz hydrolizujących enkefalinę

Poznano już szereg związków hamujących aminopeptydazy związane z degradacją enkefalin. Do najczęściej stosowanych należą następujące cztery inhibitory: puromycyna, bestatyna, amastatyna i bacytracyna.

Antybiotyk puromycyna jest inhibitorem różnych aminopeptydaz i aryłamidaz [23, 27, 31, 32]. Hamuje w sposób kompetytywny uwolnienie Tyr z enkefalin przez aminopeptydazę cytosolową z wartością $IC_{50} = 0,2 \mu\text{M}$ [18, 27], a praktycznie nie hamuje aminopeptydazy związanej z błonami [29, 30, 33]. Puromycyna hamuje więc rozkład enkefalin przez aminopeptydazy w homogenatach, w supernatancie pomitochondrialnych lub po odwirowaniu mikrosomów czyli wówczas, gdy jest możliwy „kontakt” inhibitora z aminopeptydazami frakcji rozpuszczalnej. Nie wpływa natomiast na degradację enkefalin w skrawkach tkanek, gdzie dostęp do enzymów wewnątrzkomórkowych jest utrudniony [28]. Bestatyna jest to związek pochodzenia bakteryjnego [34, 35], którego wartość IC_{50} wynosi ok. 200 μM . Związek ten wiąże się z powierzchnią komórki [36], hamuje więc aminopeptydazy związane z błonami komórkowymi. Nazywane są one często aminopeptydazami wrażliwymi na bestatynę [28, 30, 33, 36]. Amastatyna jest związkiem również pochodzenia bakteryjnego o działaniu zbliżonym do bestatyny [36, 37]. Zarówno amastatyna jak i bestatyna są inhibitorami kompetytywnymi [36]. Bacytracyna jest mało selektywnym inhibitorem wielu peptydaz [33] w tym również enkefalinazy [25]. Mózgowe aminopeptydazy hydrolizujące enkefalinę są hamowane przez nią z $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$ w sposób niekompetytywny [15, 25, 38].

III. Hydrolaza peptydylowo-dipeptydowa (ACE)

Hydrolaza peptydylowo-dipeptydowa (ACE—angiotensin converting enzyme) (EC, 3.4.4.16) katalizuje tworzenie oktapeptydu angiotensyny II z de-

kapeptydu angiotensyny I, uwalniając C końcowy dwupeptyd His-Leu. Erdős i wsp. [11] w 1978 r. wykazali, że oczyszczony enzym katalizuje również rozpad wiązania Gly³-Phe⁴ w enkefalinach. Stwierdzenie to było niezwykle interesujące, ze względu na możliwość łączenia działania ACE z fizjologiczną inaktywacją enkefalin. Enzym ten występuje w postaci związanej z błonami w wielu tkankach m.in. w mózgu [39]. Nie wykazano jednak zbieżności występowania aktywności ACE w mózgu z rozmieszczeniem receptorów opiatowych i enkefalin [5]. Stwierdzono również małe powinowactwo enzymu wobec enkefalin np. dla (Met⁵) enkefaliny $K_m = 0,1 \text{ mM}$ [5, 10]. Udziału ACE w rozkładzie enkefalin nie można jednak bagatelizować w warunkach *in vitro*. Przy planowaniu doświadczeń *in vitro* i przy ich interpretacji, ze względu na używane stosunkowo wysokie stężenie substratu, należy liczyć się z możliwością rozkładu wiązania Gly³-Phe⁴ enkefalin zarówno przez enkefalinazę jak i przez ACE.

IV. Enkefalinaza A

Enkefalinaza, karboksypeptydaza dipeptydylowa, EC. 3.4.24.11. [40]. Dopóki rozkład enkefalin badano w homogenatach mózgu lub frakcji rozpuszczalnej komórek, nie można było, ze względu na wysoką aktywność specyficzną aminopeptydaz rozpuszczalnych, wykryć produktów rozszczepienia wiązania Gly³-Phe⁴ enkefalin. Dopiero badając wiązanie ³H- (Leu⁵)-enkefaliny we frakcji błon plazmatycznych prądkowia myszy udało się stwierdzić, że z receptorem opiatowym wiąże się cała cząsteczka enkefaliny [5, 10]. Fragmenty ³H peptydowe enkefaliny związane są natomiast z innymi fragmentami błon. Na podstawie analizy powstałych ³H-metabolitów drogą chromatografii cienkowarstwowej i wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej stwierdzono, że głównym produktem rozpadu był trójpeptyd ³H-Tyr-Gly-Gly. Szybkość tworzenia tego trójpeptydu wynosiła ok. 30% tworzenia ³H-Tyr i była hamowana przez niskie stężenia (5 μM) (Leu⁵)-enkefaliny. Utworzenie Tyr-Gly-Gly w wyniku rozszczepienia wiązania Gly³Phe⁴ potwierdzono również identyfikując C-końcowe dwupeptydy Phe-Met [41] i Phe-Leu [5] jako produkty powstałe odpowiednio z ³H-(Met⁵)- i ³H(Leu⁵)-enkefaliny. Enzym katalizujący proces powstawania trójpeptydu Tyr-Gly-Gly z enkefalin został nazwany enkefalinazą A (enkefalinaza). Systematyczna nazwa tego enzymu, karboksypeptydaza dipeptydylowa, określała sposób jego działania [5, 10]. Kolejnym problemem wymagającym rozwiązania było wyjaśnienie, czy enzymy rozszczepiające wiązanie Gly³-Phe⁴ w enkefalinach — enkefalinaza i ACE, różnią się między sobą, czy też jest to jeden i ten sam enzym. Przekonywające dane wskazujące, że są to różne enzymy przedstawił Swerts [42].

— stwierdzono w mózgu zróżnicowanie w występowaniu enkefalinazy

i ACE. Enkefalinaza — prążkowie > kora mózgowa > mózdzek a ACE — prążowie > mózdzek > kora mózgowa [42, 43];

— długotrwałe podawanie morfiny powodowało wzrost aktywności tylko enkefalinazy [42];

— wykazano zasadnicze różnice w powinowactwie obu enzymów wobec substratu (K_m) oraz w stałych hamowania. Enkefalinaza hamowana była przez mikromolowe stężenia enkefalin, podczas gdy ACE hamowane było dopiero w stężeniach milimolowych [5, 42];

— dwa inhibitory ACE—SQ 14 225 (Kaptopril) i SQ 20 881 hamowały ten enzym w stężeniach nanomolowych, podczas gdy enkefalinazę w stężeniach mikromolowych [5, 42];

— jony chlorkowe, znany aktywator ACE, nie miały znaczącego wpływu na aktywność enkefalinazy.

Jednoznacznym rozstrzygnięciem problemu było rozdzielenie obu enzymów na kolumnach jonowymiennych [12] i na kolumnach zawierających przeciwciała skierowane przeciwko ACE [44].

IV-1. Właściwości fizykochemiczne

Oczyszczoną enkefalinazę otrzymano z nerek [45], przysadki [46] i mózgu [12, 47, 48]. Nazwy nadawane enkefalinazom otrzymywanym z różnych źródeł sugerowały, że są to inne enzymy. Okazało się jednak później, że enkefalinaza z mózgu, endopeptydaza z przysadki wołu, neutralna endopeptydaza z nerki królika i metaloendopeptydaza z nerki ludzkiej są enzymami mającymi bardzo podobne właściwości (Tabela 2).

Enzymy te są metaloenzymami, zawierającymi w centrum aktywnym atom cynku, a ich masa cząsteczkowa waha się w granicach 90 000—100 000. Optimum działania enzymów występuje w zakresie pH 6,5—7,0. W zależności od pochodzenia enzymu i stosowanego substratu uzyskano wartości K_m od 1 μ M do 75 μ M. Pewne różnice występują ponadto w aktywności molekularnej enzymów pochodzących z różnych źródeł, podobnie jak i w aktywności enzymów. Enkefalinaza nie ma dużej specyficzności substratowej — hydrolizuje też łańcuch B insuliny [49], angiotensynę I i II, bradykininę i LHRH [33].

Ulepszenie metody oczyszczania enkefalinazy, przez wprowadzenie do dalszych etapów, ogniskowania izoelektrycznego i chromatografii powinowactwa na specjalnych kolumnach z inaktywowanej lektyny pozwoliło na stwierdzenie, że enkefalinaza występuje w dwóch postaciach molekularnych A_1 i A_2 [12]. Po zastosowaniu kolumn z lektyny z kielków pszenicy, rozdzielono następnie frakcję A_1 i A_2 na podfrakcje i otrzymano w ten sposób cztery formy enkefalinazy oznaczone jako $A_{1,1}$; $A_{1,2}$; $A_{2,1}$; $A_{2,2}$ [47]. Krótką charakterystykę tych czterech form enkefalinazy przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 2

Charakterystyka fizykochemiczna enkefalinazy

Źródło enzymu	Nerka [wg 48] ludzka	Nerka [wg 45, 49] szczura	Mózg [wg 46] wołu	Mózg [wg 51] myszy
Masa cząsteczkowa	90.000	100.000 [wg 49] 90000-95000 [wg 45]	90.000	brak danych
Optimum pH	6,5	7,0 [wg 49]	brak danych	6,7
K_m substratu (μM) (Met ⁵)-enkefalina		8,0 [wg 49] 1,2 [wg 45]	40,0	
(Leu ⁵)-enkefalina	74			9,4
V max (pmole/min/mg)	52	brak danych	brak danych	170
Aktywność molekularna kcat/min ⁻¹	4680	1268 [wg 49] 138 [wg 45]	21	brak danych
Wydajność enzymu kcat/km (min ⁻¹ · μM^{-1})	63	160 (wg 49) 120 (wg 45)	530	brak danych

Tabela 3

Charakterystyka form molekularnych enkefalinazy (Z danych 47)

Formy enkefalinazy	A _{1,1}	A _{1,2}	A _{2,1}	A _{2,2}
K_m substratu (μM) Leu-enkefalina	78	79	124	63
Optimum pH	6,5	6,5	6,5	6,5
Aktywność specyficzna (pmole/min/mg)	60 000	211 000	100 000	139 000
Inhibitory: (% hamowania)				
Fenobarbital 0,2 mM	52	48	36	33
EDTA 1,0 mM	85	88	84	89
Ditiotreitol 2,0 mM	95	95	95	95
Tyr-Ala 0,25 mM	86	84	77	81

Wszystkie cztery postacie molekularne enzymu mają podobne wartości K_m wobec Leu-enkefalin, identyczne wartości optimum pH i są znacznie hamowane przez dwupeptyd Tyr-Ala, EDTA i ditiotreitol. Badając wiązanie z lektyną ustalono, że enkefalinaza jest glikoproteina, a heterogenność postaci enzymu wynika z różnic w jego części węglowodanowej. Wydaje się, że zmiany w zawartości kwasu sjałowego lub w liczbie rozgałęzień części węglowodanowej enzymu mogą być odpowiedzialne za różnice we właściwościach enkefalinaz $A_{1,2}$ i $A_{2,2}$ oraz enkefalinaz $A_{1,1}$ i $A_{2,1}$. Struktura rdzenia węglowodanowego jest prawdopodobnie we wszystkich enkefalinazach taka sama i składa się z (1-6) fukozy związanej z rdzeniem (1-4)-N-acetyloglukozaminy.

IV-2. Oznaczanie aktywności i występowanie

Oznaczanie aktywności enkefalinazy przeprowadza się przy użyciu $^3\text{H}(\text{Met}^5)$ — lub $^3\text{H}(\text{Leu}^5)$ -enkefalin jako substratu. Zastosowanie tej metodyki wymaga dobrego rozdzielania utworzonego trójpeptydu $^3\text{H-Tyr-Gly-Gly}$ od nierozłożonej enkefalin i pozostałych metabolitów. W tym celu stosuje się chromatografię cienkowarstwową w różnych układach rozwijających [10, 12], a także wysokociśnieniową chromatografię cieczową [50, 51]. Ilość utworzonego znakowanego trójpeptydu mierzy się następnie w liczniku scyntylicyjnym. Tak długo, jak oznaczenie aktywności enzymatycznej nie dotyczy czystego enzymu, lecz tylko frakcji komórkowych, wynik oznaczeń obarczony jest dużym błędem. Błąd ten wynika z obecności w homogenatach innych enzymów związanych z degradacją enkefalin; aminopeptydaz i ACE. Rozwiązaniem tych trudności, może być oznaczanie aktywności enkefalinazy tylko w wysoko oczyszczonej frakcji błon plazmatycznych, przy jednoczesnym stosowaniu specyficznych inhibitorów aminopeptydazy błonowej (bestatyna) i ACE (kaptopril).

Najwyższą aktywność enkefalinazy wykazano w mózgu i nerkach [49, 50], ale stwierdzono ją również w płucach, jądrach, jelicie, tarczycy i nadnerczach [5, 33]. W komórkach najwyższa aktywność enzymu występuje we frakcjach mitochondrialnej i mikrosomalnej [5]. Rozmieszczenie enkefalinazy w mózgu odpowiada rozmieszczeniu receptorów opiatowych, a najwyższą aktywność enkefalinazy znaleziono we frakcji błon synaptycznych [5, 8, 52, 53]. Fakt występowania enkefalinazy w zakończeniach nerwowych sugeruje jej rolę jako neuropeptydazy, tzn. enzymu odpowiadającego za inaktywację synaptycznie uwalnianego neuropeptydu (enkefalin [2, 5]).

IV-3. Mechanizm działania

Do niedawna podzielone były zdania na temat sposobu funkcjonowania enkefalinazy. Nie było jasne, czy enzym działa jako endopeptydaza, czy

jako karboksypeptydaza dipeptydyłowa. Z jednej strony bowiem enkefalinaza może hydrolizować peptydy, w których grupa karboksylowa ostatniego aminokwasu jest zablokowana grupą amidową lub nawet włączona w wiązanie peptydowe, jak w przypadku łańcucha B insuliny lub innych biologicznie czynnych peptydów [46]. Z drugiej strony jednak najlepszymi substratami enzymu są enkefaliny z wolną grupą karboksylową. W pierwszym przypadku enkefalinaza zachowuje się jako endopeptydaza, w drugim, jako karboksypeptydaza dipeptydyłowa. Wydajność enzymu hydrolizującego enkefaliny z wolną grupą karboksylową jest 10—100 razy wyższa, niż w przypadku zastosowania jako substratu peptydów z zablokowaną końcową grupą karboksylową. Po powstaniu kwasowego amidu, powinowactwo enzymu wobec substratu spada 30—40 krotnie [49]. Ulegają również obniżeniu, w stosunku do enkefalinazy, właściwości hamujące peptydów, które zawierają grupę karboksylową zestryfikowaną, zablokowaną grupą amidową lub zastąpioną grupą hydroksylową [5]. Wydaje się więc, że enkefalinaza w zależności od warunków, może działać zarówno jako endopeptydaza jak i karboksypeptydaza dipeptydyłowa. Wolna grupa karboksylowa substratu (lub inhibitora) ma duże znaczenie w procesie katalizy, ponieważ ułatwia rozpoznanie substratu przez enkefalinazę. Ważnym czynnikiem wpływającym na wiązanie substratu (inhibitora) z enkefalinazą jest również reszta argininy (Arg), występująca w cząsteczce enzymu [54]. Potraktowanie enkefalinazy butendionem, który wiąże się nieodwracalnie z resztami guanidynowymi, powoduje około 80% spadek aktywności enzymatycznej [5, 7, 49, 55]. Na podstawie: 1. analogii z aktywnym centrum karboksypeptydazy A, której mechanizm działania został dosyć dobrze poznany; 2. zasadniczych właściwości enkefalinazy i danych związanych z badaniami dotyczącymi aktywności i struktury tego enzymu, możliwe stało się opracowanie struktury centrum aktywnego enkefalinazy [5, 55].

Zasadniczymi elementami tej hipotetycznej struktury centrum aktywnego enkefalinazy są:

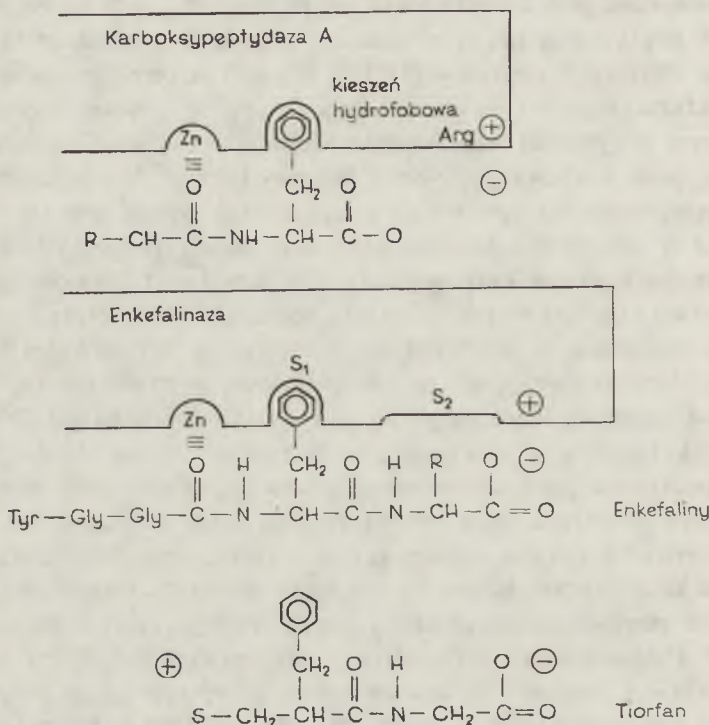
1. obecność dodatniego ładunku Arg współdziałającego z C końcową grupą karboksylową substratów peptydowych. To hipotetyczne wiązanie grupy karboksylowej substratu z grupą guanidynową Arg enzymu jest bardzo ważne w katalizie enzymatycznej wówczas gdy enkefalinaza działa nie jak endopeptydaza, ale jak karboksypeptydaza dipeptydyłowa.

2. obecność atomu cynku w centrum aktywnym, który powoduje polaryzację grupy karbonylowej wiązania amidowego substratu, umożliwiając w tym miejscu hydrolytyczny rozpad cząsteczki;

3. hydrofobowa kieszeń (S_1) mogąca pomieścić aromatyczny lub hydrofobowy boczny łańcuch przedostatniego aminokwasu substratu;

4. dodatkowa kieszeń (S_2) współdziałająca z bocznym łańcuchem C końcowego aminokwasu. Uważa się, że obecność tej kieszeni jest odpowie-

działna za różny stopień powinowactwa Met- i Leu-enkefalinę wobec enzymu i w związku z tym za inny stopień ich hydrolizy.



Ryc. 1. Hipotetyczna struktura centrum aktywnego enkefalinazy

Schemat przedstawia aktywne miejsce karboksypeptydazy A i enkefalinazy oraz sposób wiązania substratów i inhibitorów do obu enzymów. Zarówno substraty jak inhibitory muszą w swojej strukturze zawierać grupę współdziałającą z atomem cynku oraz hydrofobowe grupy współdziałające z kieszonią hydrofobową (S₁), miejsca aktywnego enzymu. Na siłę wiązania substratu lub inhibitora wpływa grupa karboksylowa w łańcuchu, oddziałująca z dodatnim ładunkiem miejsca aktywnego, a w enkefalinazie ponadto boczny łańcuch C końcowego aminokwasu współdziałający z dodatkową kieszonią (S₂) miejsca aktywnego enzymu.

Opierając się na przedstawionej strukturze centrum aktywnego enkefalinazy, zsyntetyzowano inhibitor enkefalinazy, tiorfan (DL-3 merkapto-2-benzylpropanoilo-glicynę) [56, 57].

IV-4. Inhibitory enkefalinazy

Aktywność enkefalinazy hamuje wiele różnych związków. Najsilniejszymi inhibitorami tego enzymu okazały się jednak fosforylo-Leu-Phe (IC₅₀ = 0,3 nM), fosforamidon (IC₅₀ = 1,1 nM) oraz tiorfan (K_i = 4,7 nM). Inhibitory te mają charakter kompetytywny [7, 51, 58]. Słabszymi inhibitorami enkefalinazy są związki chelatujące jak wg EDTA i o-fenantrolina,

których efekt może być odwrócony przez dodatek jonów metali (Zn^{2+} , Co^{2+}). Jako inhibitory enkefalinazy działają też związki zawierające grupy sulfhydrylowe [59]. β -merkaptoetanol mający w swojej cząsteczce jedną grupę SH, hamuje w stężeniu 800 μ M aktywność enkefalinazy o połowę. Ditiotreitrol, mający dwie grupy SH w cząsteczce, a więc silniej wiążący się przez to z enzymem, obniża aktywność enzymu o połowę, już w stężeniu 8 μ M [7]. Właściwości hamujące aktywność enzymu wykazują też barbiturany (inhibicja niekompetytywna) oraz pochodne aminokwasowe kwasu hydroksamowego) [60, 61]. Aktywność enkefalinazy hamują też różne di- i trójpeptydy. Najbardziej efektywne inhibitory tego typu mają na N-końcu aminokwasy aromatyczne lub L-leucynę [12, 33].

V. Enkefalinaza B

W wyniku rozdziału błon komórkowych mózgu szczura na kolumnach jonowymiennych otrzymano aminopeptydazę dipeptydylową, która rozszczepia wiązania Gly²-Gly³ enkefalin [12]. Enzym ten nazwano enkefalinazą B. Ustalono następnie, że tylko około 10% aktywności enkefalinazy B znajduje się we frakcji błon, natomiast aż 90% tej aktywności występuje we frakcji rozpuszczalnej komórki. Inhibitory innych enzymów rozkładających enkefalinę nie hamują enkefalinazy B [30]. Udział tego enzymu w procesie degradacji enkefalin jest niewielki i wynosi kilka procent [30, 33].

VI. Metabolizm endogennych enkefalin

Enkefalinę w tkankach zwierzęcych powstają z proenkefalin [62]. Proenkefalinę są poplipeptydami o masie cząsteczkowej 5—40 kdaltonów, zawierającymi w swojej strukturze więcej niż jedną sekwencję Met- lub Leu-enkefalinę. Przykładowo, proenkefalina A wyodrębniona z nadnerczy wołu, zawiera sześć sekwencji Met-enkefalinę i jedną Leu-enkefalinę [62, 63]. Uważa się, że proenkefalinę rozkładane są przez specyficzne peptydazy do hepta- i heksapeptydów. Przekształcenie heksapeptydów z Arg lub Liz na C końcu, katalizuje specyficzna karboksypeptydaza nazwana konwertazą enkefalinową [64]. Działanie biologiczne powstałej cząsteczki Met lub Leu-enkefalinę jest krótkotrwałe, ze względu na niezwykle szybki rozkład enzymatyczny jakiemu ulega ona w organizmie. Określenie jakie enzymy są głównie odpowiedzialne *in vivo* za hydrolizę enkefalinę i próby stosowania specyficznych inhibitorów tych enzymów, mają duże znaczenie w aspekcie przedłużenia przeciwbólowego działania enkefalinę.

Po zidentyfikowaniu enzymów rozkładających enkefalinę powstało pytanie, czy zasadniczo za rozkład enkefalin *in vivo* jest odpowiedzialna enkefalinaza, aminopeptydaza błonowa (wrażliwa na bestatynę), czy aminopeptydaza rozpuszczalna. W badaniach stwierdzono, że już w 2 minuty po dokomorowym podaniu myszy znakowanej enkefaliną, 80% pentapeptydu uległo rozkładowi, a efekt przeciwbólowy był bardzo słaby. Podanie z enkefaliną jednocześnie tiorfanu i bestatyny zapobiegało hydrolizie enkefalin w 90% a właściwości przeciwbólowe tego związku wzrastały. Podawana równocześnie z enkefaliną puromycyna (inhibitor aminopeptydazy rozpuszczalnej) nie zmniejszała w tym układzie hydrolizy enkefalin [30, 65]). Można więc przypuszczać, że w proces degradacji egzogennych enkefalin włączane są enkefalinaza i aminopeptydaza wrażliwa na bestatynę. Badano również wpływ inhibitora peptydaz na odzyskanie endogennych enkefalin, uwalnianych ze skrawków mózgu do środowiska inkubacyjnego (po depolaryzacji błony przez K^+). W nieobecności inhibitorów odzyskano tylko małą ilość (16%) znakowanej (Met^5) enkefalin uwalnianej z tkanki do środowiska inkubacyjnego, reszta ulegała hydrolizie. W obecności tiorfanu lub bestatyny ilość niezhydrolizowanej enkefalin wzrastała do około 30%. Dodatek równocześnie obu tych inhibitorów, hamował rozkład enkefalin prawie w 100%. Inne inhibitory, jak puromycyna czy kaptopril (inhibitor ACE) nie zmieniały stopnia hydrolizy enkefalin [2, 65]. Wyniki testów farmakologicznych związanych z reakcjami myszy na bodźce bólowe, w obecności różnych inhibitorów peptydaz, potwierdziły wyniki badań biochemicznych [30, 65]. Wykazały one, że tylko tiorfan i bestatyna powodują znaczne zahamowanie hydrolizy enkefalin, co zgodnie z przypuszczeniem objawiało się spadkiem wrażliwości zwierząt na ból.

Otrzymane wyniki wskazują na to, że w procesie degradacji enkefalin *in vivo* zasadniczą rolę odgrywają enkefalinaza i aminopeptydaza błonowa (wrażliwa na bestatynę).

Przedłużenie działania przeciwbólowego enkefalin, przez zastosowanie tiorfanu i bestatyny było jak dotąd ograniczone tylko do badań laboratoryjnych na zwierzętach. Pewne nadzieje związane są z niedawno zsyntetyzowanym w Laboratorium profesora R a q u e s ' a, specyficznym inhibitorem enkefalinazy — kelatorfanem [66]. Być może inhibitor ten, nie będzie tylko narzędziem do badania efektów i mechanizmu działania enkefalin, ale pozwoli na krok w kierunku zastosowania w terapii specyficznych inhibitorów enzymów degradujących enkefalinę, jako środków przedłużających czas życia cząsteczki enkefalin.

VII. Uwagi końcowe

Przyjmuje się obecnie, że enkefalinaza i aminopeptydaza wrażliwa na bestatynę działają jako neuropeptydazy [30, 40, 67]. Nie jest jeszcze wy-

jaśnione, czy enkefalinaza i aminopeptydaza biorą udział *in vivo* w fizjologicznej inaktywacji także innych neuropeptydów, które mogą być dla nich substratami *in vitro*. Przykładem może być cholecystokinina (CCK-8), która jest bardzo dobrym substratem enkefalinazy *in vitro*, a zahamowanie enkefalinazy w doświadczeniach prowadzonych na skrawkach mózgu nie zapobiega intensywnej hydrolizie CCK-8 [40]. Szczegółowego wyjaśnienia wymaga rola enkefalinazy. Fakt, że enzym może działać jako endopeptydaza, niezbyt duża specyficzność substratowa, wysoka aktywność enkefalinazy poza ośrodkowym układem nerwowym, zwłaszcza w nerce sugeruje, że może być ona fizjologicznie związana również z metabolizmem peptydów innych niż enkefaliny [45, 49, 47]. Interesujące wydają się doniesienia wiążące endorfiny i enkefaliny z układem immunologicznym. Znaleziono bowiem na powierzchni limfocytów receptory endorfin i enkefalin, modulujące częściowo aktywność układu immunologicznego, (synteza przeciwciał, proliferacja limfocytów) [68]. Powstała w związku z tym hipoteza, że endorfiny i enkefaliny są fizjologicznymi regulatorami odpowiedzi immunologicznej (immunomodulatorami). Są one swoistymi mediatorami między ośrodkowym układem nerwowym a układem immunologicznym [69]. Koncepcja ta, wskazująca na możliwość „połączenia” tych tak ważnych dla organizmu układów przez cząsteczki endorfin i enkefalin, będzie powodowała niewątpliwie dalszy wzrost zainteresowania badaniami enzymów „wyznaczających czas działania” peptydów opiatowych. Wydaje się, że w niedalekiej przyszłości, wyjaśnienie wielu niewiadomych związanych jeszcze z rolą enkefalin w organizmie jak i z działaniem enzymów rozkładających enkefaliny może rzucić nowe światło na związek między czynnikami emocjonalnymi i stresem a odpornością organizmu.

Artykuł otrzymano 3 stycznia 1986 r.

Zaakceptowano do druku 29 maja 1987 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R., (1975) *Nature*, **258**, 577—579.
2. Bloom F. E., (1981), *Sci. American*, **245**, 114—125.
3. Pasternak G., Goodman R., Snyder S. H., (1975), *Life Sci.* **16**, 1765—1769.
4. Konecka A. M., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 443—476.
5. Schwartz J. Ch., Malfroy B., De la Baume S., (1981), *Life Sci.*, **29**, 1715—1740.
6. Meek J. L., Yang H. Y. T., Costa E., (1977), *Neuropharmacol.*, **16**, 151.
7. Altstein M., Bachr E., Vogel Z., Blumberg S., (1983), *Eur. J. Pharm.* **91**, 353—361.
8. Patey G., De la Baume S., Schwartz J. Ch., Roques B., Fournie-Zaluski M. C., Soroca-Lucas R., (1981), *Science* **212**, 1153—1155.
9. Herman Z. S., (1983), *Post. Hig. Med. Dośw.* **37**, 233—270.

10. Malfroy B., Swartz J. P., Guyon A., Rogues B. P., Schwartz J. S., (1978), *Nature*, **276**, 523—526.
11. Erdős E. G., Johnson A. L., Bayden N. T., (1978), *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 843—848.
12. Gorenstein C., Snyder S. H., (1979), *Life Sci.* **25**, 2065—2070.
13. Delange R. J., Smith E. L., (1971) w *The enzymes*, red. Boyer P. D., t. 3, str. 81—118, Academic Press, New York, London.
14. Hambrook J. M., Morgan B. A., Rance M. J., Smith C. F. L., (1976), *Nature*, **262**, 782.
15. Lane A. C., Rance M. J., Walter D. S., (1977), *Nature* **269**, 75—76.
16. Marks N., Grynbaum A., Neidle A., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 1552—1559.
17. Dupont A., Cusan L., Garon M., Alvarado-Urbine G., Labrie F., (1977), *Life Sci.*, **21**, 907—914.
18. Knight M., Klee W. A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3843—3847.
19. Austen M. B., Evans C. J., Smyth D. G., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 1211—1217.
20. Schnebli H. P., Philips M. A., Barclay R. K., (1979), *Biochem. Biophys. Acta*, **569**, 89—98.
21. Hayashi M., (1978), *J. Biochem.*, **84**, 1363—1372.
22. Hersh L. B., McKelvy J. F., (1981), *J. Neurochem.*, **36**, 171—178.
23. Traficante L. J., Rotrosen J., Siekierski J., Tracer H., Gershon S., (1980), *Life Sci.*, **26**, 1697—1706.
24. Hersh L. B., Smith T. E., McKelvy J. F., (1980), *Nature*, **286**, 160—162.
25. Geary L. E., Wiley K. S., Scott W. L., Cohen M. L., (1982), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **221**, 104—111.
26. Craviso G. L., Musacchio J. M., (1978), *Life Sci.*, **23**, 2019—2030.
27. Vogel Z., Alstein M., (1979), *FEBS Lett.*, **98**, 44—48.
28. Cohen L. M., Geary L. E., Wiley K. S., (1982), *J. Pharm. Exp. Ther.*, **224**, 379—385.
29. Hersh L. B., (1981), *Biochemistry*, **20**, 2345—2350.
30. Schwartz J. C., De la Baume S., Yi C. C., Chaillet P., Marcais-Collado H., Costentin J., (1983), *J. Natural Transmission*, **18**, 235—245.
31. Traficante L. J., Siekierski J., Rotrosen J., Garshon S., (1980), *Pharmacol. Res. Commun.*, **12**, 575—580.
32. Vogel Z., Altstein M., (1980), *Prog. Biochem. Pharmacol.*, **16**, 49—59.
33. Hersh L. B., (1982), *Moll. Cell. Biochem.*, **47**, 35—43.
34. Suda H., Aoyagi T., Takeuchi T., Umezawa H., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 196—200.
35. Umezawa H., Aoyagi T., Suda H., Mamada M., Takeuchi T., (1976), *J. Antibiotics*, **29**, 97—99.
36. Rich D. H., Moon B. J., Harbeson S., (1984), *J. Med. Chem.*, **27**, 417—422.
37. Barclay R. K., Philips M. A., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**, 1732—1738.
38. Pest C. B., Pest A., Chang J. K., Fong B. T. W., (1976), *Science*, **194**, 330—332.
39. Erdős E. G., (1977), *Fed. Proc.*, **38**, 1760—1765.
40. Schwartz J. C., Giros B., Llorens C., Malfroy B., Rose C., Zuzel K., Chaillet P., Costentin J., (1984), *IUPHAR, 9 th Int. Congres, Abstracts*, **S28-3**, London.
41. Guyon A., Roques B. P., Guyon F., Foucault A., Perdrisot R., Swerts J. P., Schwartz J. C., (1979), *Life Sci.*, **25**, 1605—1612.

42. Swerts J. P., Perdrisot R., Patey G., De la Baume S., Schwartz J. C., (1979), *Eur. J. Pharmacol.*, **57**, 279—282.
43. Benúck M., Marks N., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 215—221.
44. Benuck M., Marks N., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 822—828.
45. Malfroy B., Schwartz J. C., (1982), *Life Sci.*, **31**, 1745—1748.
46. Almenoff D., Wilk S., Orłowski M., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 206—214.
47. Rush R. S., Hersh L. B., (1982), *Life Sci.*, **31**, 445—451.
48. Gafford J. T., Skidgel R. A., Erdős E. G., Hersh L. B., (1983), *Biochemistry*, **22**, 3265—3271.
49. Malfroy B., Schwartz J. C., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 276—285.
50. Benuck M., Berg M. J., Marks N., (1981), *Life Sci.*, **28**, 2643—2650.
51. Hudgin R. L., Charleson S. E., Zimmerman M., Mumford R., Wood P., (1981), *Life Sci.*, **29**, 2593—2601.
52. De la Baume S., Petey G., Schwartz J. C., (1981), *Neuroscience*, **6/3**, 315—321.
53. Demner W., Brand K., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 804—811.
54. Bunning P., Holmquist B., Riordan J. F., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 1442—1449.
55. Roques B. P., Fournie-Zaluski M. C., Soroca L., Lecomte J. M., Malfroy B., Llorens C., Schwartz J. C., (1980), *Nature*, **288**, 286—288.
56. Roques B. P., Fournie-Zaluski M. C., Florentin D., Waksman G., Sassi A., Chaillet P., Collado H., Costentin J., (1982), *Life Sci.*, **31**, 1749—1752.
57. Llorens C., Gacel G., Swerts J. P., Perdrisot R., Fournie-Zaluski M. C., Schwartz J. C., Roques B. P., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 1710—1716.
58. Altstein M., Blumberg S., Vogel Z., (1981), *Eur. J. Pharmacol.*, **76**, 299.
59. Holmquist B., Vallee B. L., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **76**, 6216.
60. Altstein M., Mittman S., Vogel Z., (1981), *Life Sci.*, **28**, 185.
61. Blumberg S., Vogel Z., Altstein M., (1981), *Life Sci.*, **28**, 301.
62. Hughes J., Causa PhDDHon., (1983), *Brit. Med. Bull.*, **39**, 17—24.
63. Kojima K., Kilpatrick D. L., Stern A. S., Jones B. N., Udenfriend S., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **215**, 638—643.
64. Fricker L. D., Snyder S. H., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**, 3886—3890.
65. De la Baume., Gros C., Y. C. C., Chaillet P., Marcais-Collado H., Costentin J., Schwartz J. C., (1982), *Life Sci.*, **31**, 1753—1756.
66. Cambier J. C., (1985), *La Presse Medicale* **14**, 758.
67. Hughes J., Causa P. H. D., (1983), *Brit. Med. Bull.*, **39**, 17—24.
68. Miller G. C., Murgó A. J., Plotnikoff N. P., (1983), *Clin. Immunopathol.* **26**, 446—451.
69. Wybran J., (1985), *Fed. Proc.*, **44**, 92—94.

- 42 Swett, J. W. ...
- 43 ...
- 44 ...
- 45 ...
- 46 ...
- 47 ...
- 48 ...
- 49 ...
- 50 ...
- 51 ...
- 52 ...
- 53 ...
- 54 ...
- 55 ...
- 56 ...
- 57 ...
- 58 ...
- 59 ...
- 60 ...
- 61 ...
- 62 ...
- 63 ...
- 64 ...
- 65 ...
- 66 ...
- 67 ...
- 68 ...
- 69 ...
- 70 ...
- 71 ...
- 72 ...
- 73 ...
- 74 ...
- 75 ...
- 76 ...
- 77 ...
- 78 ...
- 79 ...
- 80 ...
- 81 ...
- 82 ...
- 83 ...
- 84 ...
- 85 ...
- 86 ...
- 87 ...
- 88 ...
- 89 ...
- 90 ...
- 91 ...
- 92 ...
- 93 ...
- 94 ...
- 95 ...
- 96 ...
- 97 ...
- 98 ...
- 99 ...
- 100 ...

JOLANTA KORDOWSKA*
ANNA JAKUBIEC-PUKA**

Wielkocząsteczkowe proteazy tkanek zwierzęcych

A high-molecular-weight proteases of animal tissues

Wykaz stosowanych skrótów: ATP, adenozyntrifosforan; ATPaza, adenozyntri-fosfataza; DFP, di-isopropilo-fluorofosforan; DTT, ditiotreitol; E-64, transepoksy-sukcynylo-L-leucylamido/4-guanidino/butan; Ep-475, L-transepoksy-sukcynylo-leucylamido/3-metylo/butan; SDS, sól sodowa siarczanu dodecylo; NEM, N-etylomaleimid; PMSF, fluorek fenylometylosulfonowy.

Nazwy enzymów proteolitycznych zastosowano zgodnie z zasadami przyjętymi w ostatnich latach w piśmiennictwie międzynarodowym [1, 2, 3].

Jak wiadomo degradacja białek w żywej komórce zachodzi w lizosomach oraz poza lizosomami [2, 3, 4, 5]. Pierwsza z tych dróg, dość dobrze poznana, prowadzi do pełnej hydrolizy białek do aminokwasów. Druga, mało jeszcze znana, prowadzi do hydrolizy białek krótko żyjących, białek atypowych, a także białek, których degradacja jest wybiórczo regulowana. Prócz pełnej degradacji niektórych białek, na drodze pozalizosomalnej następuje tzw. ograniczona proteoliza białek w komórce, będąca jednym z mechanizmów selektywnej, potranslacyjnej modyfikacji białek. Ograniczona proteoliza prowadzi więc przede wszystkim do przetwarzania niektórych enzymów, hormonów peptydowych, czy innych peptydów biologicznie czynnych w ich formy aktywne; prowadzi też do inaktywacji wielu czynnych białek. Ograniczona proteoliza służyć więc może utrzymaniu odpowiedniego dla potrzeb metabolizmu poziomu enzymów i innych substancji białkowych biologicznie czynnych. Ograniczona proteoliza jest też jedną z dróg modyfikacji białek w czasie procesu translacji. Towarzyszy ona ponadto przebudowie cytoszkieletu i, jak się zdaje, jest jej warunkiem, może więc wywierać wpływ na kształt i czynność komórki. Ograniczona proteoliza jest także, jak się wydaje, jednym z elementów mechanizmu warunkującego transport białek przez błony. Szersze omówienie tych i innych jeszcze funkcji ograniczonej proteolizy znajdzie Czytelnik w artykułach przeglądowych [5, 6].

Jakkolwiek w obecnej chwili doceniamy rolę proteolizy pozalizosomal-

* Mgr biol., ** Dr n.med., Pracownia Metabolizmu Białek, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa, ul. Pasteura 3

Zróznicowana odpowiedź wielokatalitycznej proteazy na stosowane inhibitory i aktywatory.

Źródło enzymu	Masa cząsteczkowa enzymu		Aktywność proteazy (substraty białkowe)						Aktywatory
			Inhibitory						Związki redukujące
	Całe białko kDa	Podjednostki kDa	DFP	PMSF	Leupeptyna	Chymostatyna	NEM	Jodoacetamid	
erytrocyty	600								
retikulocyty	700—1000	35							
przysadka	700								
mięśnie prążkowane	550								
	500				—	—	+	—	+
	750								
	650—800	25—32			—	—		—	—
	1000								
mięśnie gładkie	1300	28							
wątroba	650			—	—	—	+		—
	700	25—120							
	650	22—34	—	+	+	+	+		+
	720—760								
łożysko	700—1000	25—70		+					

+ i — oznacza, odpowiednio, wrażliwość lub brak wrażliwości na stosowany związek

nej w przebiegu i regulacji wielu procesów w komórce, to bardzo mało wiemy o enzymach proteolitycznych za nie odpowiedzialnych [5]. Jedyną dobrze poznaną proteazą (klasą proteaz) pozalizosomalną komórek zwierzęcych jest CANP (kalpaina, EC 3.4.22.17), cysteinowa proteaza aktywowana przez jony Ca^{2+} [7—9].

W ostatnich latach odkryty został następny enzym, czy też raczej pozalizosomalny system proteolityczny. Enzym ten odróżniają od znanych dotychczas proteaz [1—3]: bardzo wysoka, bo co najmniej 500 kDa masa cząsteczkowa, obecność kilku centrów aktywnych w jednej wielkiej cząsteczce, oraz występowanie w komórce w formie nieczynnej. Enzym nazwany został wielkocząsteczkową, wielokatalityczną proteazą, w skrócie HMP [10]. Jego obecność stwierdzono w wielu różnych tkankach ssaków i człowieka. Występuje więc on, jak się zdaje, powszechnie w komórkach zwierzęcych.

HMP dotychczas wyizolowano z tkanek ssaków: erytrocytów [11], mięśnia szkieletowego [12—17], mięśnia gładkiego [17, 18], przysadki mózgowej [19], wątroby [17—23], soczewki oka [24], kory nadnerczy [25, 26], łożyska [27], retikulocytów [28], śledziony, płuc, jelita, nerki, skóry, mózgu [17]. Najwięcej enzymu, bo aż powyżej 300 $\mu\text{g/g}$ zawierają tkanki o wysokiej

Tabela 1

Aktywność peptydazy trypsynopodobnej (substraty niskocząsteczkowe)							Aktywność peptydazy chymotrypsynopodobnej (substraty niskocząsteczkowe)							Pismienictwo
Inhibitory						Aktywatory	Inhibitory						Aktywatory	
DFP	PMSF	Leupeptyna	Chymostatyna	NEM	Jodoacetamid	Związki redukujące	DFP	PMSF	Leupeptyna	Chymostatyna	NEM	Jodoacetamid	Związki redukujące	
-	+						+	-						11
+	+	+	+			-	+	+					-	28
		+			+	+			+	+			-	19
-		+	+			+	+	-		+				12
														13
	+	+	+		+	+								14
-		+	+		-	-	+		+	+		-	-	15
+		+	+			-								16
														18
						+	+		+	+			+	25, 26
														20, 21
														23
+	+	+	+	++			++	+	-	+	++			17
							+							27

aktywności metabolicznej, jak wątroba czy śledziona [17]. Stosunkowo mało jest go w tkankach o mniejszej aktywności metabolicznej, jak np. mięsień prażkowany (30—70 $\mu\text{g/g}$ tkanki) lub skóra (5 $\mu\text{g/g}$ tkanki) [17]. Enzym znajduje się głównie w cytosolu, ale, stwierdzano jego obecność również w błonach komórki [17, 20, 27, 28] i w mitochondriach [25, 26].

Masę cząsteczkową enzymu określano przy pomocy różnych metod, jak elektroforeza w warunkach niedenaturujących, filtracja na żelu, metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), metoda rozpraszania światła laserowego, a także wyliczono z wymiarów cząsteczek enzymu w obrazach z mikroskopu elektronowego [22, 29]. Na ogół w tej samej pracowni, przy użyciu różnych metod uzyskiwano zbliżone wartości masy cząsteczkowej enzymu. Natomiast wyniki otrzymywane w różnych pracowniach były różne. Wydaje się, że różnice te są zależne od pochodzenia enzymu, od metody otrzymywania, a także wynikają ze stosowania nieodpowiednich standardów. Z drugiej strony przy pomocy metod immunologicznych stwierdzono identyczność enzymu pochodzącego z różnych tkanek [17, 21]. Trudno więc w tej chwili orzec, czy mamy do czynienia z formami tej samej proteazy, czy też raczej z klasą proteaz o analogicznym mechanizmie działania.

W czasie elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących enzym migruje jako pojedynczy prążek. Natomiast w warunkach denaturujących migruje jako wiele, zwykle 8—9 peptydów o masie cząsteczkowej w granicach 25—35 kDa. Enzym niektórych tkanek zawiera dodatkowo większe podjednostki, 70 bądź 120 kDa [18, 19, 23]. Nie można wykluczyć, że peptydy te są produktami autolitycznej degradacji jednego wielkiego białka a nie podjednostkami enzymu [17, 19]. Dotychczas nikt nie opisał aktywności proteolitycznej podjednostek enzymu, ani też ich właściwości immunologicznych.

Badanie w mikroskopie elektronowym wykazało, że enzym ma kształt cylindra o średnicy 9,6—11 nm [29] lub nawet 20 nm [22] i długości około 14 nm [29]. Analogiczne wyniki uzyskano w przypadku enzymu przygotowanego do badań w mikroskopie elektronowym różnymi technikami, a także w wyniku zastosowania metod fizycznych [22, 29]. Cylindryczna cząsteczka złożona jest z 4 pierścieni ułożonych równolegle względem siebie. W każdym z pierścieni jest przypuszczalnie 6 globularnych podjednostek, tak, że w sumie w skład wielkiej cząsteczki wchodzi 24 małe podjednostki o różnej masie cząsteczkowej. Przypuszczalnie cząsteczka ma kształt cylindra wypełnionego cytozolem [29].

Enzym wykazuje cechy proteazy zarówno serynowej, jak i cysteinowej i zawiera co najmniej dwa [15, 17, 28], a jak niektórzy autorzy uważają [17] co najmniej trzy centra aktywne. Wnioski te wynikają z różnic aktywności i różnego optimum pH enzymu w stosunku do różnych substratów, a także z wrażliwości na inhibitory (Tabela 1). Enzym hydrolizuje *in vitro* białka takie jak kazeina, insulina, neurotensyna, glukagon i inne [4] oraz wiązania peptydowe syntetycznych substratów specyficznych dla trypsyny i chymotrypsyny. Optimum pH działania enzymu jest w granicach od 7 do 10. Specyficzność substratowa oraz optimum pH wskazują zatem, że enzym jest proteazą neutralno-alkaliczną o właściwościach proteiny, jak też peptydazy trypsyno- i chymotrypsynopodobnej. Dla bliższego scharakteryzowania enzymu stosowano różne inhibitory i aktywatory (Tabela 1). Enzym wykazuje wrażliwość na inhibitory proteaz serynowych jak DFP, PMSF, będąc równocześnie wrażliwym na niektóre inhibitory proteaz cysteinowych. Leupeptyna, antipaina, chymostatyna hamują enzym częściowo lub całkowicie w zależności od substratu (Tabela 1), natomiast powszechnie znane inhibitory proteaz cysteinowych E-64, Ep-475, bestatina nie zmieniają aktywności enzymu [12, 15, 16, 20, 23, 28]. Pepstatyna, specyficzny inhibitor proteaz asparytylowych, nie wywiera wpływu na aktywność enzymu [14, 16, 17, 23, 25]. Związki redukujące grupy tiolowe jak DTT, cysteina czy merkaptoetanol zwykle lekko aktywują enzym (Tabela 1). Zatem enzym wykazuje właściwości zarówno proteazy serynowej jak i cysteinowej. Większość autorów uważa, że zawiera on centra aktywne zarówno serynowe jak i cysteinowe [17]. Niektórzy przypuszczają nato-

miast, że enzym jest proteazą serynową, wymagającą do pełnej i prawidłowej aktywności udziału reszt cysteinowych, znajdujących się w pobliżu centrum aktywnego [20, 21, 28].

Rola HMP w komórce ani też jego naturalne substraty nie są jeszcze znane. Nieznany jest też mechanizm regulacji enzymu. Dla uzyskania informacji o regulacji enzymu *in vivo*, badano w warunkach *in vitro* wpływ na aktywność enzymu wielu substancji występujących w żywej komórce, jak kwasy tłuszczowe, fosforany, kationy. Wykazano, że kwasy tłuszczowe w stężeniach około $0,02 \mu\text{M}$ stymulują, a w stężeniu około $100 \mu\text{M}$ znacznie, bo aż 7—50 krotnie aktywują enzym [20, 21, 27, 28, 30]. Najbardziej znaczącą aktywację powodują kwasy tłuszczowe o 16—24 atomach węgla posiadające wiązanie nienasycone (kwas linolowy i arachidonowy) [30]. Podobnie jak kwasy tłuszczowe działa na enzym SDS w stężeniu 0,02—0,06% [16, 19, 20, 27, 28, 30]. HMP jest również wrażliwy na kationy jedno- i dwuwartościowe, przy czym poszczególne kationy wykazują odmienny wpływ na aktywność enzymu. Obecność kwasów tłuszczowych (lub SDS) zmienia wrażliwość enzymu na kationy [16, 20, 21, 27]. Obserwowano również stabilizujący wpływ ATP i innych trój- i dwufosforanów na enzym [8]. Niektórzy z autorów przypisują też enzymowi właściwości ATPazy [18, 23]. Wynika z tego, że enzym może być regulowany przez zmianę stężeń naturalnie występujących składników komórki, a także przez zmianę wzajemnych proporcji stężeń różnych składników.

HMP posiada przypuszczalnie naturalny inhibitor(y). Inhibitor taki znaleziono w ludzkich erytrocytach [10]. Inhibitor jest wielkocząsteczkowym białkiem o masie 240 kDa złożonym z podjednostek o masie 40 kDa. Inhibitor ten wykazuje wpływ hamujący zarówno na HMP jak i na CANP, podczas gdy nie hamuje trypsyny, chymotrypsyny i papainy.

Przedstawiono powyżej uzyskane w ostatnich latach informacje dotyczące wielkocząsteczkowej, wielokatalitycznej proteazy mimo, iż dane o niej są jeszcze niepełne i często niejednoznaczne. Enzym ten jest dopiero w toku intensywnych badań. Wydaje się jednak, że HMP jest szczególnie interesujący ponieważ reprezentuje on zupełnie nowy typ enzymu proteolitycznego. Ponadto taka właściwość, jak obecność wielu centrów enzymatycznych, sprzyja niewątpliwie przyspieszeniu degradacji substratu w komórce, jak też stwarza możliwość kooperatywnego lub kaskadowego mechanizmu reakcji.

Artykuł otrzymano 23 kwietnia 1987 r.
Zaakceptowano do druku 25 czerwca 1987 r.

PISMIENICTWO

1. McDonald J. K., (1985), *Histochemical J.*, **17**, 773—785.
2. Barrett A. J., McDonald J. K., (1980), *Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography, Endopeptidases, t. 1*, str. 416, Academic Press Inc., London.
3. McDonald J. K., Barrett A. J., (1986), *Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography, Exopeptidases, t. 2*, str. 357, Academic Press Inc., London.
4. Dingle J. T., Fell H. B., (1969), *Lysosomes in Biology and Pathology, t. 1*, str. 543, t. 2, str. 668 North-Holland Publishing Company Amsterdam, London.
5. Pontremoli S., Melloni E., (1986), *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 455—481.
6. Moore B. R., Free S. J., (1985), *Int. J. Biochem.*, **17**, 283—289.
7. Suzuki K., Kawashima S., Imahori K., (1984), w: *Calcium Regulation in Biological Systems*, 213—226. The Takeda Science Foundation.
8. Sugita H., Ishiura S., Kamakura K., Nakase H., Hagiwara K., Nonaka I., Tomomatsu K., (1984), w: *Calcium Regulation in Biological Systems*, 243—256. The Takeda Science Foundation.
9. Korzus G., Turyna B., *Postępy Biochemii* (praca w druku).
10. Murakami K., Etlinger J. D., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7588—7592.
11. Edmunds T., Pennington R. J. T., (1982), *Int. J. Biochem.*, **14**, 701—703.
12. Hardy F. M., Mantle D., Pennington R. J. T., (1983) w: *Biochem. Soc. Trans.*, **11**, 348—349.
13. Ismail F., Gevers W., (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **742**, 399—408.
14. Dahlmann B., Kuehn L., Reinauer H., (1983), *FEBS*, **160**, 243—247.
15. Dahlmann B., Kuehn L., Rutschmann M., Reinauer H., (1985), *Biochem. J.*, **228**, 161—170.
16. Ishiura S., Sano M., Kamakura K., Sugita H., (1985), *FEBS*, **189**, 119—123.
17. Tanaka K., Ii K., Ichihara A., Waxman L., Goldberg A. L., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 15197—15203.
18. Barth R., Hoechst M., Afting E-G., (1984) *Biochem. J.*, **222**, 613—620.
19. Wilk S., Orłowski M., (1983), *J. Neurochem.*, **40**, 842—849.
20. Yamamoto T., Nojima M., Ishiura S., Sugita H., (1986), *Biochim. Biophys. Acta*, **882**, 297—304.
21. Ishiura S., Yamamoto T., Nojima M., Sugita H., (1986), *Biochim. Biophys. Acta*, **882**, 305—310.
22. Tanaka K., Yoshimura T., Ichihara A., Kameyama K., Takagi T., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 15204—15207.
23. Rivett A. J., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 12600—12606.
24. Ray K., Harris H., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7545—7549.
25. Watabe S., Kimura T., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 5511—5517.
26. Watabe S., Kimura T., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 14498—14504.
27. Ishiura S., Nojima M., Yamamoto T., Fuchiwaki T., Okuyama T., Furuya H., Sugita H., (1986), *Int. J. Biochem.*, **18**, 765—769.
28. Ishiura S., Sugita H., (1986), *J. Biochem.*, **100**, 753—763.
29. Kopp F., Steiner R., Dahlmann B., Kuehn L., Reinauer H., (1986), *Biochim. Biophys. Acta*, **872**, 253—260.
30. Dahlmann B., Rutschmann M., Kuehn L., Reinauer H., (1985), *Biochem. J.*, **228**, 171—177.

RENATA JASIŃSKA*, JÓZEF ZBOROWSKI**

Enzymy wymieniające zasady fosfolipidów

The phospholipid base-exchange enzymes

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Wymiana zasady jako droga syntezy fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanolaminy i fosfatydyloseryny w różnych tkankach
- III. Właściwości enzymów wymieniających zasady
- IV. Solubilizacja, oczyszczanie i charakterystyka enzymów wymieniających zasady
- V. Asymetryczne rozmieszczenie w płaszczyźnie poprzecznej błony mikrosomalnej enzymów wymieniających zasady
- VI. Genetyczna regulacja biosyntezy fosfolipidów drogą wymiany zasady
- VII. Rola biologiczna reakcji wymiany zasad

Contents

- I. Introduction
- II. The base-exchange of choline, serine and ethanolamine as a pathway for the synthesis of corresponding phospholipids in various tissues
- III. Properties of the base-exchange enzymes
- IV. Solubilization, purification and characteristics of the base-exchange enzymes
- V. Asymmetrical distribution of the base-exchange enzymes in the transversal plane of the microsomal membrane
- VI. Genetic regulation of phospholipid biosynthesis by base-exchange pathway
- VII. Biological role of the base-exchange reactions

I. Wstęp

Fosfolipidy, obok białek, stanowią główny składnik strukturalny błon biologicznych wszystkich żywych organizmów niezależnie od stopnia rozwoju ewolucyjnego. Zależnie od tkanki i organizmu różne rodzaje fosfolipidów występują w komórkach w określonych proporcjach. Są one asymetrycznie rozłożone w błonach [1, 2]. Jedną z hipotez tłumaczących tę

* Mgr, ** Doc. dr hab., Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

asymetrię jest odmienna lokalizacja enzymów uczestniczących w syntezie poszczególnych rodzajów fosfolipidów i/lub ich przemieszczanie zachodzące po syntezie [2]. Przemieszczanie się fosfolipidowych cząsteczek pomiędzy różnymi błonami wewnątrzkomórkowymi uwarunkowane jest natomiast obecnością i funkcjonowaniem cytoplazmatycznych białek transportujących [3, 4].

Fosfolipidy cholinowe i etanoloaminowe powstają w tkankach zwierzęcych drogą opisaną przez Kennedy'ego, z udziałem odpowiadających CDP-pochodnych [5]. Zmiany w szybkości biosyntezy mogą być przyczyną zróżnicowania procentowej zawartości fosfolipidów w błonach. Intensywność syntezy zależy od wieku zwierzęcia; stwierdzono na przykład, że synteza fosfatydylocholiny jest znacznie bardziej intensywna w mózgu młodych, 2-miesięcznych szczurów niż u osobników starszych [6].

Struktura molekularna fosfolipidów może podlegać różnym modyfikacjom. Przy udziale fosfolipaz A_1 i A_2 odszczepiane są kwasy tłuszczowe, drogą reakcji powstałych lizofosfolipidów mogą być syntetyzowane nowe cząsteczki [7]. Drugą z możliwych, jest wymiana zasady aminowej (choliny, etanoloaminy lub seryny) fosfolipidu na inną wolną zasadę. Reakcję tę nazwano reakcją wymiany zasady (the base-exchange reaction), a enzymy błonowe w niej uczestniczące enzymami wymieniającymi zasady (the base-exchange enzymes). Reakcji tej podlega tylko niewielka część fosfolipidów obecnych w błonach.

W ciągu 28 lat od pierwszych doniesień wykazujących wymianę zasad w fosfolipidach tkanki wątrobowej [8, 9] stwierdzono *in vitro* powszechność występowania tej reakcji w tkankach zwierzęcych oraz częściowo oczyszczono z tkanki mózgowej szczura niektóre enzymy wymieniające zasady. Zbadano rozmieszczenie tych enzymów w płaszczyźnie poprzecznej błony mikrosomów wątroby i mózgu oraz warunki ich działania i specyficzność substratową. Przeprowadzono ponadto obserwacje genetyczne nad enzymami wymieniającymi zasady w hodowlach komórkowych. Wyniki wszystkich tych badań są przedmiotem niniejszego artykułu.

II. Wymiana zasady jako droga syntezy fosfatydylocholiny, fosfatydoetanoloaminy i fosfatydooseryny w różnych tkankach

Reakcja wymiany zasad aminowych obecnych w fosfolipidach jest szeroko rozpowszechniona, zarówno w świecie zwierzęcym, jak i roślinnym. Enzymy katalizujące tę reakcję występują w komórkach głównie w endoplazmatycznym retikulum, a po jego fragmentacji i różnicowym wirowaniu odnajdywane są we frakcji błon mikrosomalnych, w których reakcje wymiany zasad zachodzą z najwyższą wydajnością. Używając tej frakcji bądź całych homogenatów tkankowych w badaniach, wykazano

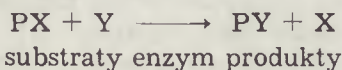
wymianę choliny i etanoloaminy w: wątrobie [8—17], hepatocytach [18], nerce [13], sercu [13, 19] i mózgu szczura [20—23], a także w sercu psa [24], płytkach krwi królika [25—27] i ludzkich leukocytach [28]. W tych ostatnich, podobnie jak w mikrosomach mózgu szczura, aktywność wymieniająca etanoloaminy jest ponad 2-krotnie wyższa niż seryny, a ta niż choliny.

Możliwość *in vivo* syntezy fosfatydylocholin i fosfatydyloetanoloaminy drogą wymiany zasady nie jest ostatecznie wyjaśniona. Po jednoczesnym dożylnym podaniu szczurom ^{32}P -ortofosforanu i ^3H -choliny stwierdzono 20-krotnie wyższy stosunek $^3\text{H}/^{32}\text{P}$ w fosfatydylocholinie wątrobowej niż fosforanie choliny w tej tkance, co wskazuje na intensywną reakcję wymiany choliny [29]. Inni autorzy [30] stwierdzają, że szybkość syntezy fosfatydylocholin w wątrobie drogą wymiany choliny odpowiada jedynie 1/20 szybkości syntezy *de novo* z udziałem CDP-choliny. Podanie domózgowo znakowanego ortofosforanu i choliny również wykazuje zachodzenie reakcji wymiany choliny *in vivo* w tej tkance [21, 31]. Mniej przekonujące dane otrzymano w przypadku reakcji wymiany etanoloaminy zarówno w mózgu [22] jak i w wątrobie [32].

Wbudowywanie seryny do fosfolipidów drogą wymiany zasady badano w tkankach takich jak: wątroba [9, 16, 17, 33, 34], serce [19, 35] czy mózg szczura [36], a także mózg kurczęcia [37], świnki morskiej [38] i królika [39], siatkówka oka [40], płytki krwi [25—27] i tkanka chrzęstna królika [41], serce psa [24], wątroba myszy [42] i płuca chomika [43]. Użyto również hepatocytów szczura [18, 44], mysich fibroblastów [45] i ludzkich leukocytów [28, 46].

Wymianę seryny i innych zasad wykazano w mikrosomach nasion grochu [47] i endospermie nasion rycynusa [48], a także w tkankach niższych ewolucyjnie zwierząt, jak na przykład w ciele tłuszczowym larw muchy [49, 50], w mięśniach szarańczy afrykańskiej [51]. W mitochondriach pierwotniaka *Tetrahymena pyriformis* [52] stwierdzono wbudowywanie znakowanej seryny do fosfatydyloseryny i znakowanej etanoloaminy do fosfatydyloetanoloaminy, nie obserwowano natomiast inkorporacji choliny do fosfatydylocholin. Także mitochondria z komórek raka Ehrlicha [53] i szybko rosnącej hepatomy Morrisa 7777 [54] wbudowują znaczne ilości seryny drogą wymiany zasady. Powstająca w tych ostatnich fosfatydyloseryna szybko jednak ulega dekarboksylacji do fosfatydyloetanoloaminy.

Najbardziej ogólny, schematyczny zapis reakcji wymiany zasady można przedstawić następująco:



gdzie PX — jest cząsteczką endogennego fosfolipidu (fosfatydylocholin, fosfatydyloetanoloaminy, fosfatydyloseryny), a Y — wolnym aminoalkoholem (cholina, etanoloamina, seryna). Produktami reakcji są: PY — nowa

cząsteczka fosfolipidu z wymienioną resztą aminoalkoholową oraz X — uwolniony z substratu aminoalkohol.

Reakcja nie wymaga nakładu energii [9, 10, 33], zachodzi w alkalicznym pH i wymaga specyficznie obecności jonów Ca^{2+} . Reakcję wymiany zasady hamują EDTA [16, 36] lub EGTA [19], wysoka siła jonowa [56] oraz inne niż jon Ca^{2+} dwuwartościowe kationy, na przykład: Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} [10, 24, 25, 28, 33, 57]. W mikrosomach roślin wyższych nie zaobserwowano hamującego działania jonów Mn^{2+} [47].

Początkowo [10] przypuszczano, że enzymem katalizującym reakcję wymiany zasad w mikrosomach jest błonowa fosfolipaza D (fosfatydohydrolaza fosfatydylcholine, EC 3.1.4.4), która powoduje hydrolizę fosfolipidów z utworzeniem kwasu fosfatydowego. Enzym ten w obecności Ca^{2+} i aminoalkoholi umożliwia powstawanie nowych fosfolipidów drogą transfosfatydylacji. Hipoteza ta została odrzucona ze względu na odmienne właściwości fosfolipazy D w porównaniu z enzymami wymieniającymi zasady. Fosfolipaza D wykazuje inne optimum pH reakcji transfosfatydylacji [36, 37, 58], działa zarówno w obecności Ca^{2+} jak i Mg^{2+} . Katalizuje ona wbudowywanie glicerolu do fosfatydylglicerolu i inne reakcje [58], których nie katalizują enzymy wymieniające zasady. Ponadto, jak wykazano, częściowo oczyszczony enzym wymieniający serynę [59] nie spełnia funkcji fosfolipazy D [60].

III. Właściwości enzymów wymieniających zasady

Jak już wspomniano w poprzednim rozdziale, zależną od jonów Ca^{2+} inkorporację seryny, choline i etanolaminy do odpowiednich fosfolipidów drogą wymiany zasad badano *in vitro* w wielu tkankach. Zastosowanie w tych badaniach różnych stężeń Ca^{2+} , buforów i pH (Tabela 1) nie pozwala na bezpośrednie porównywanie wyników. W doświadczeniach z użyciem mikrosomów mózgu kurczęcia [37] zmiana buforu Tris/Cl w medium reakcyjnym na weronalowy/NaOH w tym samym zakresie pH i stężeń nie powodowała istotnych zmian wartości K_m i V_{max} . Bufory: imidazolowy, Tris i glicyloglicynowy użyte zamiast buforu HEPES hamowały reakcje wymiany zasad w przypadku zsolubilizowanych błon mikrosomów mózgu szczura [56]. Zaobserwowano zależność efektywności wymiany wszystkich trzech zasad od pH buforu i stężenia Ca^{2+} w medium reakcyjnym. Stwierdzono to, w przypadku mikrosomów wątroby [16] i mózgu szczura [36, 55], serca psa [24] i płytek krwi królika [27]. Stężenie jonów Ca^{2+} optymalne dla wydajności tych reakcji zwiększa się wraz z obniżaniem pH środowiska i odwrotnie. Sugeruje się [16], że kation Ca^{2+} jest związany elektrostatycznie z ujemnie naładowanymi domenami enzymu. Jony H^+ współzawodni-

cd. Tabell 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
solubilizat cząstek osadzonych przy 35.000 × g	E	13,3	16,5	845 137 000	CEA' CETMA	K			8,33	
	S	43,3	22,4	29 600 5 880	HC-3 CEA	NK M	HEPES	7,2	25,0	[56]
	C	675,0	14,6	49 200 11 200 16 500 62 400 4 700	CETMA HC-3 CEA CETMA HC-3	M M M K NK			8,33	
enzym po II-giej chromatografii na DEAE-celulozie	S	400	57,1 ^e		E; C	nic hamują	HEPES	7,23	25	[59]
	E S	20 110	40 330	25 123	S E	K	HEPES	7,23	8,33	[61]
Synaptosomy mózgu szczura	E	65	1,60							
	S	77	0,56							
	C	500	0,95							[57]
Serce szczura: sarkoplazmatyczne retikulum sarkolema	E	10	77				HEPES	7,8-8,0	4	[19]
	S	40	30							
	E	14	102							
	S	25	34							
Mikrosomy serca psa	E	130	130,8	6 900 110	C S					
	S	60	26,4	330 640	E C	K	HEPES	7,8	2,5	[24]
	C	490	27,0	510	E					
				110	S					

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Frakcja błonowa płytek krwi królika	E	23 (24)	1,02 (3,54)	1 250 ^a 80	C	NK				
	S	58 (65)	1,02 (3,84)	220	E	K	HEPES	7,5	0,1 (3,0)	[27]
	C	360 (400)	0,90 (3,48)	780 450 140	C E S	K K K				

Skróty: E — etanoloamina, S — seryna, C — cholina; HEPES, kwas N-2-hydroksyetylo-piperazyno-N'-2-etanosulfonowy; CAPS, kwas 3-(cykloheksyloamino)propano-1-sulfonowy
^a Ujednolicono jednostki Km, Vmax, Ki przeliczając z wartości podanych w pracach. ^b Reakcje wymiany zasad prowadzono standardowo 15-30 min. w temp. 37°C, używając frakcji błonowych, według różnych autorów, w ilościach 20-250 µg białka na próbę, ^c Typy hamowania: K — kompetytywne, NK — niekompetytywne, M — mieszane. ^d Tylko w tym przypadku użyto D — izomeru seryny. ^e stałe kinetyczne oznaczone dla niższych stężeń E 3-8 µM, w nawiasie dla wyższych stężeń E 10-20 µM. ^f CEA, 2-chloroetyloamina (analog E); CETMA, 2-chloroetylotrimetyloamina (analog C); HC-3, analog C, inhibitor nosnikowego transportu. ^g W pracy podano w nmolach/ml/godz; enzym prowadził specyficznie reakcję wbudowywania S do PE. ^h Oczyszczony enzym katalizował inkorporację S i E. ⁱ Hamowanie inkorporacji zasad do frakcji błonowej płytek krwi badano we wszystkich przypadkach w obecności 0,1 mM Ca²⁺ i 75 µM chloropromazyny.

czą o te same miejsca w enzymie. Enzym jest aktywny tylko w postaci kompleksu z kationami Ca^{2+} . Stężenie Ca^{2+} powyżej optymalnego hamuje reakcję wymiany zasady w wyższym pH, zatem tylko wolny kation Ca^{2+} aktywuje enzym, a formy $\text{Ca}(\text{OH})^+$ i $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hamują jego aktywność.

Różne wartości optimum pH i stężeń jonów wapniowych dla reakcji wymiany poszczególnych zasad sugerowały obecność w tkankach odrębnych enzymów. Przemawiają za tym również wyniki badań z użyciem detergentów, które w różnym stopniu hamują inkorporację wolnych zasad [36]. Preparat zsolubilizowanych błon mikrosomów mózgu szczura [56] wymagał dla wymiany zasad obecności egzogennych fosfolipidów w postaci azolektyny (handlowego preparatu mieszaniny fosfolipidów). Inkorporacja wszystkich trzech znakowanych zasad była zależna od stężenia dodawanego białka enzymatycznego i prostoliniowa w odpowiednim zakresie jego stężeń i w czasie. W tych warunkach jednowartościowe kationy, zależnie od wielkości jonu ($\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+$), hamują inkorporację cholicy i etanoloaminy. Stwierdzono też, że sole chlorkowe tych kationów bardziej hamują reakcję niż octany. Rodanki sodowy i potasowy w stężeniu 0,4 M hamują reakcję wymiany zasad w 50%.

W ostatnich latach, wykazano stymulację inkorporacji seryny i innych zasad na drodze wymiany przez antagonistów kalmoduliny, takich jak: chloropromazyna (CPZ), trifluoroperazyna (TFP) i N-(6-aminoheksylo)-5-chloro-1-naftaleno-sulfonoamid (W-7) w błonach płytek krwi królika [25—27] i błonach ludzkich leukocytów [28]. Wyżej wymienione związki znane są z tego, że hamują efekty biologiczne kalmoduliny, między innymi wydzielanie serotoniny, agregację płytek krwi, zmianę ich kształtu [62, 63], czy aktywność mitogenną limfocytów [64]. Początkowo wykazano, że obniżanie się poziomu endogennej, wolnej seryny w płytkach zależy od czasu działania i stężenia CPZ, a także jest proporcjonalne do indukowanego przez lek stechiometrycznego wbudowywania seryny do fosfatydyloseryny w obecności endogennego Ca^{2+} . Natomiast poziom endogennej etanoloaminy i cholicy wzrastał zależnie od czasu ekspozycji i stężenia CPZ, bez efektywnego wpływu leku na inkorporację tych zasad do odpowiednich fosfolipidów [26]. Wcześniej też sugerowano, że endogenna kalmodulina jest inhibitorem reakcji wymiany zasad w błonach płytek krwi ze względu na tworzenie kompleksów kalmodulina- Ca^{2+} . Egzogenna kalmodulina hamuje jedynie inkorporację cholicy do fosfatydylocholicy [25]. W dalszych badaniach wykazano, że w warunkach fizjologicznych stężeń seryny, etanoloaminy i cholicy, antagoniści kalmoduliny w obecności 0,1 i 3 mM stężeń Ca^{2+} stymulują inkorporację wszystkich trzech zasad do fosfolipidów [27] bez zmiany powinowactwa poszczególnych wolnych zasad do enzymów. Inhibicja wiązania Ca^{2+} z błonami płytek i stymulacja aktywności enzymów wymiany zasad przez leki są ze sobą ściśle skorelowane. Jedynie 6-aminoheksylo-1-naftaleno-sulfonoamid (W-5), słabszy an-

tagonista kalmoduliny hamuje wiązanie Ca^{2+} , a tylko w niewielkim stopniu aktywuje reakcję wymiany zasad [27]. Podobnie, w błonach ludzkich leukocytów pozbawionych wolnych zasad aminowych i kalmoduliny [28], CPZ i TFP stymulują aktywności enzymów wymieniających etanoloaminę i serynę. Dodanie egzogennej kalmoduliny nawet w obecności wysokich stężeń Ca^{2+} hamuje reakcję wymiany choline i seryny, podczas gdy reakcja wymiany etanoloaminy była niewrażliwa na obecność tego białka. Przytoczone wyżej dane wskazują, że stymulacja aktywności enzymów wymiany zasad przez leki nie jest bezpośrednio spowodowana obecnością dużych stężeń wolnego Ca^{2+} . Stymulacja aktywności tych enzymów i hamowanie wiązania Ca^{2+} z błonami wydają się być odrębnymi procesami. Dalsze badania z użyciem oczyszczonych enzymów wymieniających zasady pozbawionych fosfolipidów i kalmoduliny, mogą więc dopiero wyjaśnić czy leki oddziałują bezpośrednio z fosfolipidami, kalmoduliną czy z enzymami.

W określeniu właściwości enzymów wymieniających zasady istotną jest kwestia ich specyficzności substratowej względem rodzajów molekularnych fosfolipidów, biorących udział w reakcjach. W mikrosomach wątroby szczura najefektywniej produkowane *in vitro* w reakcji wymiany choline są cząsteczki fosfatydylocholine z wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi [14, 65]. Szybkość wbudowywania choline do heksanienasyconych rodzajów molekularnych fosfatydylocholine była 10—15 razy większa niż do mononienasyconych rodzajów tego fosfolipidu [16]. Podobnie etanoloamina jest wbudowywana głównie do wielonienasyconych rodzajów fosfatydyloetanoloaminy. Wśród tych ostatnich ilość utworzonych heksanienasyconych rodzajów była dwukrotnie wyższa niż mono- i dinienasyconych [16].

W doświadczeniach *in vivo* najwydajniej znakowane w mikrosomach wątroby są rodzaje fosfatydylocholine z mononienasyconymi kwasami tłuszczowymi [66, 67]. Jednakże w tym przypadku istotną rolę może odgrywać droga syntezy z udziałem CDP-choline. Wbudowaną *in vivo* etanoloaminę odnajduje się w mikrosomach mózgu szczura w fosfatydyloetanoloaminie diacylo- i alkenyloacylo- w stosunku 10 : 1 [68].

Analogiczne badania dotyczące specyficzności substratowej przeprowadzono również dla reakcji wymiany seryny. W mikrosomach wątroby [34] po 10 minutach reakcji radioaktywna seryna najintensywniej, bo aż w 43%, wbudowywana była do fosfatydyloseryny zawierającej kwasy: nasycony — heksanienasycony i w 23% nasycony — tetranienasycony, co w zasadzie jest zgodne z procentowym rozkładem tych rodzajów molekularnych w tkance. Rodzaje fosfatydyloseryny o składzie kwasów tłuszczowych: nasycony — heksanienasycony i nasycony — tetranienasycony stanowią 31,3%, a nasycony — trinienasycony 16,0% całkowitej puli tego fosfolipidu [69]. W przypadku oczyszczonego enzymu [59] najlepszymi akceptorami były kolejno: plazmalogen etanoloaminy z żółtka jaja > fosfatydyloetano-

loamina z wątroby wieprzowej $>$ fosfatydyloetanolamina z żółtka jaja, co sugeruje, że skład kwasów tłuszczowych w fosfatydyloetanolaminie odgrywa ważną rolę. Natomiast fosfatydylocholina, fosfatydyloseryna, fosfatydyloinozytol i kwas fosfatydowy były nieaktywne jako akceptory seryny.

Wymiana seryny w mikrosomach wątroby myszy jest hamowana przez wolne, nasycone kwasy tłuszczowe o długości łańcucha 8-16 atomów węgla, podane w stężeniu 1—10 mM. Kwasy te zmieniają wartość maksymalnej szybkości reakcji (V_{max}), pozostając bez wpływu na stałą K_m względem seryny [70]. Podobnie kwasy: laurynowy, palmitynowy, stearynowy, oleinowy i linolowy hamują syntezę fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanololaminy drogą wymiany zasad w hepatocytach szczura [18].

IV. Solubilizacja, oczyszczanie i charakterystyka enzymów wymieniających zasady

Pierwszą próbę izolowania enzymów wymieniających zasady przeprowadzono na mikrosomach mózgu szczura z zastosowaniem solubilizacji błon przy użyciu amfoterycznego detergentu Miranol H2M, o pI równym 7,0 [71]. W preparacie tym wykazano tylko niewielką inkorporację radioaktywnych zasad w nieobecności egzogenego fosfolipidu. Dodanie azolektyny powodowało znaczne podwyższenie inkorporacji wszystkich trzech zasad. Używając frakcji 35.000 x g mózgu szczura wykazano, że Miranol H2M w stężeniu 1% (w/o) solubilizuje 50% białka, około 30% fosfolipidów, 40% cerebrozydów i 11% cholesterolu [56], a preparaty enzymatyczne są bardzo labilne w obecności detergentu. Stabilność enzymów poprawiono usuwając detergent metodą filtracji na Sephadex G-25. Otrzymany po solubilizacji preparat prowadził reakcję wbudowywania wszystkich trzech zasad do odpowiadających im fosfolipidów z różną szybkością, co sugerowało obecność odrębnych enzymów. W dalszych pracach, prowadzonych na tym samym materiale, zastosowanie odmiennych procedur oczyszczania enzymów (Tabela 2) umożliwiło rozdzielenie aktywności enzymatycznych specyficznie wbudowujących etanolaminę, serynę i cholinę [72]. W badaniach tych mikrosomy solubilizowano w mieszaninie detergentów zawierającej Miranol H2M i cholan sodu, który hamuje inaktywację enzymów wymiany zasad spowodowaną przez Miranol H2M. Oznaczona maksymalna aktywność enzymów w mieszaninie detergentów, przy odzysku białka mikrosomalnego 66,3%, wynosiła w nmolach/mg białka/godz: dla wymiany etanolaminy 28,8, seryny 16,3 i choliny 3,0. Kolejnym etapem w preparatyce było wysalanie siarczanem amonu w obecności azolektyny, która zabezpieczała enzymy przed utratą aktywności w czasie dializy i chromatografii. W osadzie frakcji wysolonej przy 35% nasycenia siar-

czaniem amonu odzyskiwano, niewrażliwą na detergenty, aktywność enzymatyczną katalizującą wymianę choliny. Następne etapy doprowadziły do rozdzielenia aktywności wymieniających etanoloaminę i serynę, które stanowiły odpowiednio 74% i 65% aktywności natywnych mikrosomów [72].

Zmiana warunków solubilizacji i chromatografii na Sepharose 4B oraz dwukrotny rozdział na DEAE-celulozie z użyciem różnych eluentów umożliwiły wyodrębnienie aktywności enzymatycznej wymieniającej serynę [59]. Uzyskano jej 37-krotne oczyszczenie z wydajnością 2-5%. Aktywność specyficzna wbudowywania seryny wynosiła 370 nmoli/mg białka/godz. Stwierdzono jednak, że oczyszczony enzym pozostający w eluencie (0,2 M NaCl) był aktywny tylko w ciągu 24 godzin. W kolejnych próbach [61] oczyszczania tego enzymu obniżono stężenia obu detergentów, wzbogacając medium w β -merkaptoetanol. W otrzymanym preparacie wykazano aktywność enzymów wymieniających etanoloaminę i serynę, natomiast aktywność cholinowa była niemierzalna. W procedurze pominięto etap wysalania siarczanem amonu, aby zapobiec reagregacji enzymów, nanosząc mikrosomalny ekstrakt detergentowy wprost na kolumnę z Sepharose CL-4B. Eluowany drugi niski szczyt białkowy zawierał 80% aktywności enzymów wymieniających serynę i etanoloaminę. Preparat ten zachowywał aktywność w ciągu kilku miesięcy. Z materiału tego, po chromatografii na kolumnie z phenyl-Sepharose 4B odzyskiwano obie aktywności wymieniające w skokowym gradiencie Tritonu X-100. Frakcje eluowane 0,4% roztworem Tritonu X-100 wykazywały najwyższą aktywność specyficzną. Inne detergenty: Miranol H2M, cholan sodu, oktyloglukozyd zastosowane do elucji hamowały aktywności wymieniające etanoloaminę i serynę. Preparat wirowano w gradiencie glicerolu i poddawano elektroforezie na żelu agarozowopoliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących. Aktywności wymieniające etanoloaminę i serynę migrowały w żelu wspólnie, co sugerowało, że mają ten sam ciężar molekularny. Aktywność wymieniającą serynę oczyszczono 43-razy, a wymieniającą etanoloaminę 76-razy w porównaniu z aktywnościami zsolubilizowanego preparatu błon. Stosunek obydwu aktywności był stały w trakcie preparatyki. Aktywność specyficzna wymiany seryny wynosiła 240, a etanoloaminy 405,8 nmola/mg białka/godz. W elektroforezie na żelu poliakryloamidowym z użyciem SDS uzyskano jeden prążek białkowy o masie około 100 kDa, co świadczy o homogenności preparatu. Jak sugerują autorzy tej pracy, w mikrosomach mózgu szczura funkcjonuje jeden enzym wymieniający etanoloaminę i serynę, o dwóch specyficznych miejscach wiążących.

Przedstawione powyżej prace są jedynymi, udokumentowanymi próbami oczyszczenia enzymów wymieniających zasady. Wyniki tych badań są jednak sprzeczne. Udział zatem jednego lub kilku enzymów w reakcjach wymiany zasad w mikrosomach mózgu szczura, a także w innych tkan-

Procedury oczyszczania enzymów wymiany zasad z mikroosmów mózgu szczura

Etapy preparatyki	Miura, Kanfer (1976) [72]	aktywność wymieniająca zasady	Taki, Kanfer (1978) [59]	aktywność wymieniająca zasady	Suzuki, Kanfer (1985) [61]	aktywność wymieniająca zasady
1. Warunki solubilizacji mikroosmów ^a	Skład mieszaniny: 0,8% Miranol H2M (w/o) 0,5% cholan sodu (w/o) 20,0% glicerol (o/o) 5 mM HEPES (pH 7,23)	C+E+S	Skład mieszaniny: 0,8% Miranol H2M (w/o) 0,5% cholan sodu (w/o) 20,0% glicerol (o/o) 2 mM HEPES (pH 7,23) 1 mM EDTA	C+E+S	Skład mieszaniny: 0,5% Miranol H2M (w/o) 0,3% cholan sodu (w/o) 20,0% glicerol (o/o) 5 mM HEPES (pH 7,5) 1 mM B-merkaptopo- etanol	C+E+S
2. Wirowanie	165 000 x g, 60 min	C+E+S	150 000 x g, 30 min	C+E+S	165 000 x g, 60 min	C+E+S
3. Wysłanianie supernatantu siarczanem amonu	frakcja 0-35% nasycenia frakcja 35-55% nasycenia	C	frakcja 0-35% nasycenia frakcja 35-55% nasycenia	C		C
4. Chromatografia na Sepharose 4B	Elucja 0,25% roztworem Miranolu H2M w GHMA ^b	C ^c E+S	Elucja mieszaniną: 0,25% Miranol H2M + 0,125% cholan sodu w GHME	E+S	Elucja GHME ^d	E+S
5. Chromatografia powinowactwa	Affi-Gel 102, elucja: — 0,25% roztworem Miranolu H2M w GHMA — 0,50% roztworem Brij 58 w GHMA	E E+S			phenyl-Sepharose 4B, elucja: — 0,1% roztworem Tritonu X-100 w GHME — 0,4% roztworem Tritonu X-100 w GHME	E+S E+S

6. Chromatografia jonowymienienna	DEAE-celuloza, elucja mieszanina: 0,5% Brij 58 + 0,15 M NaCl w GHMA	DEAE-celuloza (I), elucja skokowym gradientem roztworu NaCl 0,20 M	E+S	
		DEAE-celuloza (II), elucja skokowym gradientem roztworu NaCl 0,16 M 0,20 M	E+S S	
7. Inne metody rozdziatu	S	wirowanie w ciaglym gradientcie glicerolu		E+S
		elektroforeza na zelu agarozowo-poliakryloamidowym		E+S

Skróty: C — cholina, E — etanolamina, S — seryna

^a Solubilizację prowadzono standardowo w łożni lodowej w czasie 2-15 min według różnych autorów. ^b GHMA: 20% roztwór glicerolu, 5 mM HEPES (pH 7,23), 1 mM β-merkaptopo-
etanol, azolektyna (3 μg fosforu/mg białka). ^c Aktywność wymieniająca C wymywała się w pustej objętości kolumny. ^d GHME: 20% roztwór glicerolu, 5 mM HEPES (pH 7,23), 1 mM
β-merkaptopoetanol, 1 mM EDTA.

kach pozostaje nadal kwestią otwartą. Być może w rozwiązaniu tej kwestii będą pomocne coraz bardziej doskonałe metody solubilizacji i chromatografii, a także badania genetyczne umożliwiające wyizolowanie genu lub genów, odpowiedzialnych za syntezę tych enzymów.

V. Asymetryczne rozmieszczenie w płaszczyźnie poprzecznej błony mikrosomalnej enzymów wymieniających zasady

Endoplazmatyczne retikulum jest głównym miejscem syntezy fosfolipidów w komórce. Tu syntetyzowane fosfolipidy wykorzystywane są w biogenezie innych błon komórki. Dlatego też rozmieszczenie enzymów syntezy i degradacji fosfolipidów w dwuwarstwie lipidowej tej błony oraz dostępność ich centrów aktywnych od strony cytoplazmatycznej bądź ekstracytoplazmatycznej budzi zrozumiałe zainteresowanie. Wśród używanych metod najpowszechniejsze to: traktowanie badanych błon enzymami proteolitycznymi (np. trypsyną, chymotrypsyną, pronazą) oraz chemiczne znakowanie określonych grup (np. aminowej) nowo-zsyntetyzowanych fosfolipidów. Stosowane jest też trawienie różnymi fosfolipazami (A₂, C, D), bądź dla lokalizacji fosfolipidowego produktu, bądź dla określenia jaki fosfolipid jest wymagany dla aktywności danego enzymu. We wszystkich przypadkach istotne jest, aby enzymy i znakujące związki nie przechodziły do wewnętrznej warstwy lipidowej badanej błony. Kierując zainteresowanego czytelnika do wcześniej opublikowanego artykułu na łamach Postępów Biochemii, w którym metody te zostały dokładniej omówione [2] zatrzymamy się tutaj jedynie nad rozmieszczeniem enzymów wymiany zasad w płaszczyźnie poprzecznej błony mikrosomalnej. Dane, które przedstawimy uzyskano głównie badając tkanki mózgową i wątrobową. Spośród trzech aktywności wymieniających zasady najbardziej zgodne wyniki uzyskano w przypadku aktywności enzymatycznej wymieniającej cholinę. W obu wyżej wymienionych tkankach centrum aktywne tego enzymu, podobnie jak cholinofosfotransferazy (EC 2.7.8.2) [73—75] zlokalizowano po stronie cytoplazmatycznej błony, a więc zewnętrznej pęcherzyków mikrosomalnych uzyskanych po fragmentacji tkanki. Mikrosomy obu tkanek trawione enzymami proteolitycznymi traciły bowiem aktywność enzymu wymieniającego cholinę bez uszkodzenia integralnej struktury błony. Mikrosomy mózgu traktowano także niskimi stężeniami rtęciodekstranu, który podobnie jak enzymy proteolityczne hamował aktywność wymieniającą cholinę [75]. Trawienie fosfolipazą C powodowało również hamowanie aktywności wymieniającej cholinę, która w tym jednak przypadku była przywracana dodaniem azolektyny [76]. Warto przy tym pamiętać, że około 80% całkowitej zawartości fosfatydylocholiney w błonie mikrosomalnej wątroby szczura znajduje się w zewnętrznej, cytoplazmatycznej warstwie [77].

W podobny sposób badana była aktywność wymieniająca etanoloaminę, jednakże otrzymane wyniki odnośnie jej lokalizacji w płaszczyźnie poprzecznej błony są rozbieżne, a interpretacja ich bardziej skomplikowana. We wcześniejszych doświadczeniach na mikrosomach mózgu wykazano, że aktywności wymieniające etanoloaminę i serynę w przeciwieństwie do aktywności wymieniającej cholinę są niewrażliwe na trawienie trypsyną i dopiero potraktowanie pęcherzyków roztworem taurocholenu prowadzi do ich inaktywacji [76]. Użycie kwasu trójnitrobenzenosulfonowego (TNBS) w dalszych badaniach zarówno mikrosomów mózgu [78] jak i wątroby [79] przybliżyło wyjaśnienie tego zagadnienia. TNBS jest związkami, który w pewnym zakresie stężeń i w odpowiedniej temperaturze nie przechodzi przez błonę. Reagując z grupą aminową amin I-rzędowych tworzy kompleks możliwy do oznaczenia spektrofotometrycznie. Po przeprowadzonej reakcji wymiany z użyciem radioaktywnej etanoloaminy TNBS posłużył do stwierdzenia lokalizacji produktu, a więc nowo-zsyntetyzowanej fosfatydyloetanoloaminy. W obu frakcjach mikrosomalnych wykazano, że występuje ona w warstwie zewnętrznej, a więc cytoplazmatycznej. W przypadku mikrosomów mózgu szczura tylko 24% całkowitej zawartości fosfatydyloetanoloaminy reagowało z TNBS. Odpowiada to jednak całej fosfatydyloetanoloaminie zewnętrznej warstwy błony mikrosomalnej. Wynik ten wskazuje na lokalizację aktywności wymieniającej etanoloaminę po stronie cytoplazmatycznej. Przemawiają również za tym wyniki badań z zastosowaniem trawienia pronazą i „miareczkowania” rtęciodekstranem szorstkiego retikulum endoplazmatycznego mózgu [80]. Użycie TNBS umożliwiło także zlokalizowanie w mikrosomach wątroby enzymu wymieniającego etanoloaminę, jak i produktu reakcji w zewnętrznej (cytoplazmatycznej) warstwie błony [79]. Wykazano ponadto, że dodanie EDTA po przeprowadzonej reakcji wymiany hamuje transport fosfatydyloetanoloaminy do wewnętrznej warstwy. W obecności jonów Ca^{2+} po 2 min reakcji wymiany z radioaktywną etanoloaminą aktywność specyficzna powstającej fosfatydyloetanoloaminy była 3-krotnie wyższa w zewnętrznej warstwie niż w wewnętrznej, natomiast po 30 min ulegała w obu warstwach wyrównaniu. Wskazuje to na szybkie przemieszczanie się produktu wewnątrz błony [79]. Z badań sztucznych błon lipidowych, zbudowanych z dwuwarstwy wynika, że istotną rolę przy przemieszczaniu się fosfatydyloetanoloaminy odgrywa fosfatydyloseryna. Po dodaniu jonów Ca^{2+} ulega ona (a także inne kwaśne fosfolipidy) szybszej dyfuzji lateralnej umożliwiając przemieszczanie się fosfatydyloetanoloaminy w formie heksagonalnej H_{11} pomiędzy obiema monomolekularnymi warstwami [81].

Przeciwstawną lokalizację aktywności wymieniającej serynę wykazano w mikrosomach wątroby i mózgu. W mikrosomach wątroby za pomocą trawienia chymotrypsyną ustalono jej obecność w zewnętrznej warstwie [74]. W mikrosomach mózgu wyniki trawienia trypsyną, chymotrypsyną, pronazą, „miareczkowania” rtęciodekstranem, a także inkubacji z TNBS

po wymianie znakowanej seryny wskazują na jej obecność w warstwie wewnętrznej (ekstracytoplazmatycznej) [82]. W przypadku mikrosomów wątroby nie wykazano hamującego wpływu rtęciodekstranu na aktywność wymieniającą serynę, co jest w pewnej sprzeczności z obserwowaną inaktywacją pod wpływem chymotrypsyny. Proteoliza białek po stronie cytoplazmatycznej może jednak powodować inaktywację centrum aktywnego po stronie wewnętrznej błony [74]. Odmienne rozmieszczenie aktywności enzymatycznej wymieniającej serynę może być także spowodowane specyficznością tkankową. Należy również pamiętać, że preparat mózgowych mikrosomów jest bardziej heterogenny i zawiera prawdopodobnie więcej zanieczyszczeń fragmentami błon komórkowych, a także pochodzi z różnych rodzajów komórek.

Bardzo ciekawe jest, wykazane niedawno, utrzymanie asymetrii w rozmieszczeniu aktywności enzymatycznej wymieniającej etanoloaminę w reagregujących mózgowych pęcherzykach mikrosomalnych po solubilizacji roztworem oktyloglukozydu i jego oddializowaniu [83, 84]. Procedura reagregacji składników białkowo-lipidowych tych pęcherzyków wymaga obecności jonów Ca^{2+} bądź Mg^{2+} w medium dializacyjnym i jest wyższa w pH 6, aniżeli w alkalicznym. Stwierdzono, że dodana egzogenna fosfatydyloetanoloamina hamuje aktywność wymieniającą cholinę w mniejszym stopniu niż wymieniającą etanoloaminę, podczas gdy fosfatydylocholina nie wpływa na wymianę choliny, natomiast aktywuje wymianę etanoloaminy [84].

VI. Genetyczna regulacji biosyntezy fosfolipidów drogą wymiany zasady

Izolowanie i charakterystyka biochemiczna komórek wykazujących specyficzne mutacje enzymatyczne umożliwia wyjaśnienie mechanizmu kontrolującego metabolizm fosfolipidów i określenie znaczenia reakcji wymiany zasad. Bardzo dobrym materiałem do badań genetycznych dotyczących metabolizmu fosfolipidów w komórkach ssaków okazały się hodowane *in vitro* komórki jajnikowe chińskiego chomika (Chinese hamster ovary cells, w skrócie CHO-K1). Komórki te wymagają podłoża, zawierającego cholinę. W warunkach zahamowanej endogennej syntezy fosfatydylocholine wykorzystują one do wzrostu egzogenne fosfolipidy cholinowe: fosfatydylocholinę i lizofosfatydylocholinę, obecne w surowicy cielej dodawanej do pożywki [85]. Komórki CHO-K1 hodowane w nieobecności choliny w pożywce wykazują znaczne zmiany aktywności dwóch enzymów biorących udział w metabolizmie fosfatydylocholine, a mianowicie cytydyliotransferazy CTP: cholinofosforan (EC 2.7.7.15) i enzymu wymieniającego cholinę. Aktywność pierwszego z tych enzymów rośnie, podczas gdy drugiego maleje o około 50%. Dodanie choliny do medium jej pozba-

wionego powoduje szybki wzrost aktywności enzymu wymieniającego cholinę i spadek aktywności cytydyliłotransferazy. Aktywność pozostałych enzymów, biorących udział w szlaku syntezy *de novo*, nie ulega zmianie. Również aktywności wymieniające etanoloaminę i serynę pozostawały niezmiennione w komórkach hodowanych z choliną i bez niej. Wartość K_m względem aktywności wymieniającej cholinę pozostawała stała niezależnie od obecności choliny, natomiast po dodaniu choliny obserwowano 3-krotne zwiększenie wartości V_{max} tego enzymu. W komórkach hodowanych w nieobecności choliny zmniejsza się również powinowactwo aktywności wymieniającej cholinę względem Ca^{2+} . Dodanie fosfatydylocholin z żółtka jaja przywracało aktywność tego enzymu w komórkach hodowanych w nieobecności choliny do poziomu takiego jak w komórkach hodowanych w jej obecności, a także zwiększało powinowactwo enzymu wymieniającego cholinę względem Ca^{2+} . Cykloheksimid, blokujący syntezę białek komórkowych *de novo*, całkowicie hamuje aktywność wymieniającą cholinę w hodowlach prowadzonych bez choliny. Nie wpływa on natomiast na aktywność cytydyliłotransferazy i enzymu wymieniającego cholinę w komórkach hodowanych w obecności choliny, a także na zmiany aktywności tych enzymów obserwowane po dodaniu choliny do hodowli prowadzonej uprzednio bez niej [85].

Po zastosowaniu czynnika mutagennego (etylo-metanosulfonianu) wyselekcjonowano linię komórek CHO o obniżonej aktywności wymieniającej cholinę [86]. Komórki tej linii, oznaczone jako CHO-64, charakteryzowały się wrażliwością wzrostową na podwyższoną temperaturę. W temperaturze 33°C i 40°C aktywność specyficzna enzymu wymieniającego cholinę tych komórek odpowiadała 13% i 6% aktywności komórek rodzicielskich CHO-K1. Komórki CHO-64 hodowane w 40°C wykazywały zmniejszoną w stosunku do komórek rodzicielskich o około 50% zawartość fosfatydyloseryny. Stwierdzono także, że fosfatydyloseryna dodana w postaci liposomów wzmagala szybkość wzrostu komórek mutantów do obserwowanej dla komórek CHO-K1. W przypadku tych ostatnich nie obserwowano wpływu egzogennej fosfatydyloseryny. Aktywności wymieniające etanoloaminę i serynę były w komórkach CHO-64 obniżone o około 50% w stosunku do obserwowanych w komórkach rodzicielskich. Uzyskane szczepy mutantu CHO-64 z przywróconą odpornością na temperaturę 40°C miały natomiast analogiczny jak komórki rodzicielskie CHO-K1 skład fosfolipidów, zawartość fosfatydyloseryny oraz wszystkie trzy aktywności wymieniające zasady. Na podstawie tych wyników autorzy sugerują, że za cechy charakterystyczne mutantu CHO-64 jest odpowiedzialna pojedyncza mutacja w genie strukturalnym kodującym enzym wymieniający cholinę, a nie defekt w posttranslacyjnej modyfikacji białka. Postulują oni również występowanie w komórkach CHO-K1 co najmniej dwóch rodzajów enzymów wymieniają-

cych zasady, z których pierwszy katalizowałby wymianę choliny, etanoloaminy i seryny (defekt którego przejawia się w komórkach mutanta CHO-64) oraz drugiego funkcjonującego normalnie i wykorzystującego serynę i (lub) etanoloaminę jako substrat reakcji.

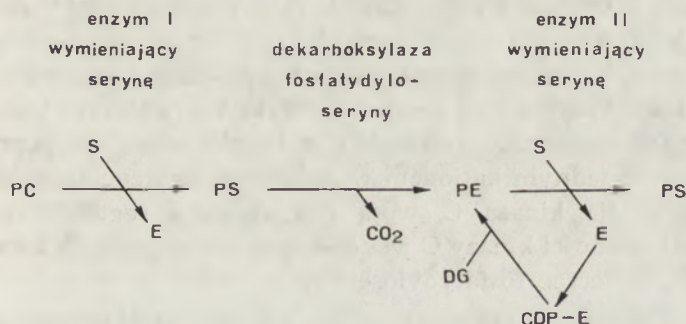
Badania nad wpływem egzogennej fosfatydyloseryny na biosyntezę *de novo* tego fosfolipidu w komórkach CHO-K1 kontynuowano, mierząc inkorporację ^{32}P -ortofosforanu dodanego do środowiska [87]. Wykazano, że wbudowanie fosforanu do komórkowej fosfatydyloseryny zależy od stężenia egzogennej fosfatydyloseryny, a także, że wysokie jej stężenia hamują znakowanie fosfatydyloetanoloaminy tylko częściowo. Inne fosfolipidy jak: fosfatydylocholina, fosfatydyloetanoloamina, fosfatydyloinozytol i sfingomielinina dodane do medium, nie hamują ich endogennej syntezy, a ponadto wbudowywanie ^{32}P -fosforanu do tych fosfolipidów nie jest zależne od fosfatydyloseryny. Hamowanie przez egzogenną fosfatydyloserynę wbudowywania ^{32}P -fosforanu do endogennej fosfatydyloseryny mogło być spowodowane bądź zmniejszoną endogenną syntezą bądź zwiększoną szybkością metabolizmu nowo-zsyntetyzowanego fosfolipidu. Doświadczenia, w których mierzono inkorporację znakowanej L-seryny do endogennej fosfatydyloseryny w obecności i nieobecności egzogennej fosfatydyloseryny, a także inne wykazały, że przyczyną hamowania jest ograniczona endogenna synteza tego fosfolipidu. Egzogenna fosfatydyloseryna ulega wbudowaniu do komórek i może być wykorzystana w biogenezie błon. Fosfolipid ten obecny w medium wzrostowym przez 10 generacji komórek, a także dodany do mieszaniny reakcyjnej, nie hamuje aktywności enzymu wymieniającego serynę.

Wyhodowano także aukstotrofy (phosphatidylserine auxotroph, w skrócie PSA-3) komórek CHO-K1 wymagające bezwzględnie egzogennej fosfatydyloseryny do wzrostu [88]. Mutanty PSA-3 nie syntetyzowały fosfatydyloseryny i wykazywały utratę aktywności wymieniającej serynę w 77% w stosunku do komórek rodzicielskich. Aktywność wymieniająca etanoloaminę była obniżona do 45% w stosunku do komórek CHO-K1, a wymieniająca cholinę aż do 1%. Wykazano również, że dodanie egzogennej choliny hamuje w 60% aktywność wymieniającą serynę w komórkach rodzicielskich, a jest bez wpływu w komórkach mutanta. Minimalna ilość etanoloaminy hamuje prawie zupełnie aktywność wymieniającą serynę w komórkach PSA-3 i CHO-K1. W tych ostatnich seryna i etanoloamina w bardzo małych stężeniach hamują aktywność wymieniającą cholinę. Na podstawie podanych wyżej wyników autorzy postulują dwie aktywności wymieniające serynę: enzym I — katalizujący reakcję wymiany choliny, etanoloaminy i seryny oraz enzym II* — katalizujący reakcję wymiany etanoloaminy i seryny. Mutant PSA-3 wykazuje defekt w enzymie I niezwykle istotny dla syntezy fosfatydyloseryny i wzrostu komórek. Zawar-

* Enzym II odpowiadałby oczyszczonemu enzymowi z mikrosomów mózgu [61]

tość fosfatydyloetanolaminy w komórkach tego mutantu po 2 dniach wzrostu bez fosfatydyloseryny obniża się 2-krotnie w porównaniu z jej ilością w komórkach rodzicielskich, co sugeruje, że fosfatydyloseryna jest głównym prekursorem syntezy fosfatydyloetanolaminy. Wniosek ten potwierdza wcześniejsze wyniki badań z użyciem komórek nerek noworodka chomika (baby hamster kidney cells, w skrócie BHK-21) [89] i komórek CHO-K1, oraz wykazujących defekt w biosyntezie fosfatydyloetanolaminy drogą z udziałem CDP-etanolaminy komórek mutantu CHO (linia 888.3) [90].

Inkubacja komórek CHO-K1 w obecności znakowanej ^{32}P -fosfatydylocholino prowadziła do akumulacji wewnątrz oprócz tego fosfolipidu także radioaktywnej fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy. Powstawania tych dwóch ostatnich fosfolipidów nie zaobserwowano w komórkach mutantu PSA-3, co wskazuje, że fosfatydylocholina nie była tu substratem w reakcji wymiany. Synteza radioaktywnej fosfatydyloseryny podczas inkubacji z ^{32}P -fosfatydyloetanolaminą była wyższa w komórkach mutantu niż w rodzicielskich. Mutant rósł normalnie w obecności fosfatydyloseryny jak i fosfatydyloetanolaminy [91]. Wyniki te jeszcze raz potwierdzają defekt enzymu I wymieniającego serynę. Autorzy proponują następujący schemat biosyntezy fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy w komórkach CHO-K1 (Ryc. 1). Podobnie, fosfatydylocholina jest preferowanym



Ryc. 1. Drogi biosyntezy fosfatydyloseryny w komórkach CHO-K1 według [91].
 Objaśnienia skrótów: PC — fosfatydylocholina, PS — fosfatydyloseryna, PE — fosfatydyloetanolamina, S — seryna, E — etanoloamina, DG — diacyloglicerol, CDP-E — cytydynodifosforan etanolaminy.

substratem reakcji wymiany seryny w syntezie fosfatydyloseryny w transformowanych wirusem SV-40 liniach mysich fibroblastów (STU 51A/232B) [45] i zmutowanych liniach (M.9.1.1.) komórek CHO-K1, które wymagały etanolaminy do wzrostu [92]. Mutant M.9.1.1. jest zupełnie pozbawiony aktywności wymieniającej cholinę, a aktywności wymieniającej serynę i etanolaminę są niższe o około 50% w stosunku do oznaczonych w komórkach rodzicielskich.

VII. Rola biologiczna reakcji wymiany zasad

W poprzednich rozdziałach omówiono metody częściowego oczyszczania enzymów wymieniających zasady fosfolipidów. Podano ich właściwości i występowanie w różnych tkankach, a także uzyskane na podstawie badań genetycznych informacje o regulacji reakcji wymiany zasad. Pomimo, że wiedza na temat tych reakcji rozszerzyła się znacznie w ciągu ostatnich lat nie wyjaśniono ostatecznie ich biologicznej funkcji.

Reakcje wymiany zasad prowadzą do zmian w polarnej części fosfolipidów, a także umożliwiają powstawanie nowych ich rodzajów molekularnych. Proces ten może mieć istotne znaczenie dla „naprawy” i odtwarzania błon, a także dla modyfikacji właściwości fizykochemicznych błon biologicznych (zmiana płynności). Strukturalne przekształcenia fosfolipidów mogą pośrednio wpływać na zmianę konformacji białek błonowych, a więc enzymów i receptorów. Szereg fosfolipidów w znaczący sposób wpływa na aktywność niektórych enzymów. Należą do nich między innymi: ATP-aza transportująca Na^+/K^+ [93], ATPaza transportująca Ca^{2+} [94], fosfataza glukozo-6-fosforanu [58], dehydrogenaza β -hydroksymaślanu [58], kinaza białkowa C [95, 96]. Inkorporacja etanoloaminy drogą reakcji wymiany zasady stymuluje aktywność ATPazy transportującej Na^+/K^+ w mikrosomach mózgu szczura, natomiast reakcja wymiany seryny prowadzi do obniżenia aktywności tego enzymu [93]. Podobny efekt obserwowano w przypadku frakcji mitochondrialnych kraba *Eriocheir sinensis* [97]. Fosfatydyloseryna, która jest syntetyzowana wyłącznie drogą wymiany seryny w tkankach zwierzęcych jest niezbędnym aktywatorem kinazy białkowej C. Cztery cząsteczki fosfolipidu w błonie wiążą się poprzez grupy karboksylowe z jednym kationem wapniowym, tworząc kompleks do którego przyłącza się kinaza C swoją podjednostką regulatorową. Bardzo ważna dla aktywności kinazy C jest obecność nienasyconych kwasów tłuszczowych w cząsteczce fosfatydyloseryny.

Istotna jest obserwacja wzajemnego hamowania aktywności enzymów wymieniających zasady w płytkach krwi królika [27]. Może ona mieć znaczenie *in vivo*. W komórkach tych oznaczone fizjologiczne stężenia wolnych zasad wynosiły: seryny 1,1 mM, etanoloaminy 0,40 mM i cholicy 0,33 mM. W doświadczeniach, w których porównywano inkorporację każdej ze znakowanych ^{14}C zasad w nieobecności i obecności dwóch pozostałych nieznakowanych, wszystkie zasady użyto w stężeniach podanych powyżej. Stwierdzono, że inkorporacja etanoloaminy jest hamowana przez serynę i cholinę w około 70%, a inkorporacja cholicy w około 90% przez serynę i etanoloaminę, natomiast inkorporacja seryny jest hamowana przez etanoloaminę i cholinę tylko w 4-17%. Wynik ten sugeruje, że w warunkach fizjologicznych może zachodzić jedynie reakcja wymiany seryny. Jest to, jak dotychczas jedyny przykład wzajemnej współzależności

enzymów wymiany zasady. Czy zjawisko to ma miejsce również w innych tkankach i w warunkach *in vivo* pozostaje nadal sprawą otwartą.

Omówione wyżej badania wskazują na istotne znaczenie reakcji wymiany seryny. Powstająca tą drogą w endoplazmatycznym retikulum fosfatydyloseryna transportowana jest do mitochondriów, gdzie ulega dekarboksylacji do fosfatydyloetanoloaminy [9, 98]. Nie wiadomo jednak, czy tak tworzona fosfatydyloetanoloamina staje się składnikiem innych błon komórki.

Artykuł otrzymano 2 czerwca 1987 r.
Zaakceptowano do druku 23 czerwca 1987 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Op den Kamp J. A. F., (1979), *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 47—71.
2. Pikuła S., Sarzała M. G., (1984), *Post. Biochem.*, **30**, 107—148.
3. Zborowski J., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 541—557.
4. Zborowski J., (1983), *Post. Biochem.*, **29**, 101—109.
5. Kennedy E. P., Weiss S. B., (1956), *J. Biol. Chem.*, **222**, 193—214.
6. Gaiti A., Brunetti M., Poccinini G., Woelk H., Porcellati G., (1982), *Lipids*, **17**, 291—296.
7. Zborowski J., Sarzała M. G., (1973), *Post. Biochem.*, **20**, 23—34.
8. Dils R. R., Hübscher G., (1959), *Biochim. Biophys. Acta*, **32**, 293—294.
9. Borkenhagen L. F., Kennedy E. P., Fielding L., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, PC 28—PC 30.
10. Dils R. R., Hübscher G., (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, **46**, 503—513.
11. Arvidson G. A. E., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **4**, 478—486.
12. Arvidson G. A. E., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **5**, 415—421.
13. Bjerre K. S., Bremer J., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 570—583.
14. Bjerre K. S., (1971), *FEBS Lett.*, **17**, 14—16.
15. Bjerre K. S., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **270**, 348—363.
16. Bjerre K. S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **296**, 549—562.
17. Bjerre K. S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **306**, 396—402.
18. Bjerre K. S., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **833**, 396—405.
19. Hattori H., Kanfer J. N., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **835**, 542—548.
20. Kanfer J. N., (1982), w *Phospholipids in the Nervous System*, red. Horrocks L. A., Ansell G. B., Porcellati G., t. 1, str. 13—20. Raven Press, New York.
21. Arienti G., Corazzi L., Woelk H., Porcellati G., (1976), *J. Neurochem.*, **23**, 203—210.
22. Arienti G., Corazzi L., Woelk H., Porcellati G., (1977), *Brain Res.*, **124**, 317—329.
23. De Medio G. S., Gaiti A., Corazzi G., Porcellati G., (1973), *Biochem. Soc. Trans.*, **1**, 348—352.
24. Filler D. A., Weinhold P. A., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **618**, 223—230.
25. Morikawa S., Taniguchi S., Mori K., Kumada K., Fujiwara M., Fujiwara M., (1985), *Thromb. Res.*, **37**, 267—278.
26. Fujiwara M., Morikawa S., Taniguchi S., Mori K., Fujiwara M., Takaori S., (1986), *J. Biochem.*, **99**, 615—625.

27. Morikawa S., Taniguchi S., Mori K., Fujii K., Kumada K., Fujiwara M., Fujiwara M., (1986), *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 4473—4477.
28. Niwa Y., Taniguchi S., (1986), *Arch. Biochem. Biophys.*, **250**, 345—357.
29. Treble D. H., Frumkin S., Balint J. A., Beeler D. A., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 163—171.
30. Sundler R., Arvidson G., Akesson B., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **280**, 559—568.
31. Orlando P., Arienti G., Sararino R., Corazzi L., Mossaio P., Porcellati G., (1977), *Adv. Exp. Med. Biol.*, **101**, 319—325.
32. Sundler R., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **306**, 218—226.
33. Hüscher G., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **57**, 555—561.
34. Bjerve K. S., (1984), *Biochem. J.*, **219**, 781—784.
35. Kiss Z., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **67**, 557—561.
36. Kanfer J. N., (1972), *J. Lipid Res.*, **13**, 468—477.
37. Porcellati G., Arienti G., Pirootta M., Giorgini D., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 1395—1417.
38. Miller E. K., Dawson R. M. C., (1972), *Biochem. J.*, **126**, 805—821.
39. Gorazzi G., Blomstrand C., Arienti G., Hamberger A., Porcellati G., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 1167—1180.
40. Mizuno A., (1976), *J. Biochem.*, **80**, 45—62.
41. Wuthier R. E., Cummins J. W., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **337**, 50—59.
42. Taki T., Nishimura K., Matsumoto M., (1973), *Jpn. J. Exp. Med.*, **43**, 87—105.
43. Tombropoulos E. G., (1971), *Arch. Intern. Med.*, **127**, 408—412.
44. Sundler R., Akesson B., Nilsson A., (1974), *FEBS Lett.*, **43**, 303—307.
45. Margraff W. D., Anderer F. A., (1974), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**, 1299—1304.
46. Miras C., Mantzos J., Levis G., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 101—103.
47. Vandor S. L., Richardson K. E., (1968), *Canad. J. Biochem.*, **46**, 1309—1315.
48. Moore T. S., (1975), *Plant Physiol.*, **56**, 177—180.
49. Crone H. D., (1967), *Biochem. J.*, **104**, 695—704.
50. Taylor J. F., Hodgson E., (1972), *Insect Biochem.*, **2**, 243—248.
51. Bygrave F. L., Kaiser W., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **8**, 16—22.
52. Dennis E. A., Kennedy E. P., (1970), *J. Lipid Res.*, **11**, 394—403.
53. Barańska J., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **619**, 258—266.
54. Hostetler K. Y., Zenner B. D., Morris H. P., (1979), *J. Lipid Res.*, **20**, 607—613.
55. Gaiti A., De Medio G. E., Brunetti M., Amaducci L., Porcellati G., (1974), *J. Neurochem.*, **23**, 1153—1159.
56. Saito M., Bourque E., Kanfer J. N., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 304—317.
57. Holbrook P. G., Wurtman R. J., (1985), *J. Neurochem.*, **44**, Suppl., S44 B.
58. Kanfer J. N., (1980), *Canad. J. Biochem.*, **58**, 1370—1380.
59. Taki T., Kanfer J. N., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **528**, 309—317.
60. Saito M., Kanfer J. N., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 318—323.
61. Suzuki T. T., Kanfer J. N., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 1394—1399.
62. Walenga R. W., Opas E. E., Feinstein M. B., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 12523—12526.
63. Kanono Y., Fujii T., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 513—519.
64. Cheung R. K., Grinstein S., Gelfand E. W., (1983), *J. Immunol.*, **131**, 2291—2295.

65. De Medio G. S., Woelk H., Gaiti A., Porcellati G., Fratini F., (1975), *Ital. J. Biochem.*, **24**, 335—350.
66. Spitzer H. L., Norman J. R., Morrison K., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 584—590.
67. Rytter D., Miller J. E., Cornatzer W. A., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 418—421.
68. Gaiti A., Gorazzi G., De Medio G. E., Porcellati G., (1972), *FEBS Lett.*, **27**, 116—120.
69. Bjerve K. S., (1982), *J. Chromatog.*, **232**, 39—46.
70. Mizuno A., Matsudo M., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1638—1644.
71. Saito M., Kanfer J. N., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 391—398.
72. Miura T., Kanfer J. N., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**, 654—660.
73. Higgins J. A., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **558**, 48—57.
74. Ballas L. M., Bell R. M., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **665**, 586—595.
75. Arienti G., Corazzi L., Freysz L., Binaglia L., Roberti R., Porcellati G., (1985), *J. Neurochem.*, **44**, 38—41.
76. Buchanan A. G., Kanfer J. N., (1980), *J. Neurochem.*, **34**, 720—725.
77. Higgins J. A., Dawson R. M. C., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **470**, 342—356.
78. Corazzi L., Binaglia L., Roberti R., Freysz L., Arienti R., Porcellati G., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **730**, 104—110.
79. Hutson J. L., Higgins J. A., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **835**, 236—243.
80. Corazzi L., Porcellati G., Freysz L., Binaglia L., Roberti R., Arienti G., (1986), *J. Neurochem.*, **46**, 202—207.
81. Tilcock C. P. S., Cullis P. R., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **641**, 189—201.
82. Corazzi L., Zborowski J., Roberti R., Binaglia L., Arienti G., (1987), *Bull. Mol. Biol. Med.*, **12**, 19—31.
83. Corazzi L., Arienti G., (1986), *Biochim. Biophys. Acta*, **875**, 362—368.
84. Corazzi L., Arienti G., (1987), *Biochim. Biophys. Acta*, **903**, 277—282.
85. Maeda M., Nishijima M., Akamatsu Y., Sakakibara Y., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 5925—5930.
86. Kuge O., Nishijima M., Akamatsu Y., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1926—1930.
87. Nishijima M., Kuge O., Akamatsu Y., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 5784—5789.
88. Kuge O., Nishijima M., Akamatsu Y., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 5790—5794.
89. Voelker D. R., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2669—2673.
90. Miller M. A., Kent C., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 9753—9761.
91. Kuge O., Nishijima M., Akamatsu Y., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 5795—5798.
92. Voelker D. R., Frazier J. L., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 1002—1008.
93. Hattori H., Kanfer J. N., (1983), *Neurochem. Res.*, **8**, 1185—1195.
94. Hidalgo C., Ikemoto N., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 8446—8454.
95. Ganong B. R., Loomis C. R., Hannum Y. A., Bell R. M., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1184—1188.
96. Bell R. M., (1986), *Cell*, **45**, 631—632.
97. Chapelle S., Zwingelstein G., (1984), *Comp. Biochem. Physiol.*, **78B**, 363—372.
98. Zborowski J., Dygas A., Wojtczak L., (1983), *FEBS Lett.*, **157**, 179—182.

- 61. The Reaction of ...
- 62. ...
- 63. ...
- 64. ...
- 65. ...
- 66. ...
- 67. ...
- 68. ...
- 69. ...
- 70. ...
- 71. ...
- 72. ...
- 73. ...
- 74. ...
- 75. ...
- 76. ...
- 77. ...
- 78. ...
- 79. ...
- 80. ...
- 81. ...
- 82. ...
- 83. ...
- 84. ...
- 85. ...
- 86. ...
- 87. ...
- 88. ...
- 89. ...
- 90. ...
- 91. ...
- 92. ...
- 93. ...
- 94. ...
- 95. ...
- 96. ...
- 97. ...
- 98. ...
- 99. ...
- 100. ...

LESZEK KLECZKOWSKI*

„Aktywaza” karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-difosforanu i fosforan karboksyarabinitolu — klucze do zrozumienia mechanizmu regulacji fotosyntezy?

Rubisco „activase” and carboxyarabinitol phosphate — keys to photosynthesis?

Ostatni rok przyniósł dwa odkrycia w dziedzinie fotosyntezy, które — wydaje się — zasadniczo zmieniają nasze zrozumienie regulacji mechanizmów asymilacji węgla przez rośliny wyższe. Pierwsze z nich [1, 2, 3] dotyczy identyfikacji czynnika białkowego odpowiedzialnego za aktywację karboksylazy/oksygenazy RuBP (Rubisco), enzymu katalizującego pierwszą reakcję cyklu Calvina (karboksylacja RuBP), a także pierwszą reakcję fotooddychania (oksygenacja RuBP). Ów czynnik białkowy, nazwany „aktywazą” Rubisco, występuje w stromie chloroplastów i jest silnie aktywowany przez światło, umożliwiając optymalne funkcjonowanie karboksylazy w warunkach atmosferycznego (0.03%) stężenia CO₂. Drugie odkrycie [4] wiąże się z identyfikacją endogennego inhibitora aktywności Rubisco, 1-fosforanu 2-karboksy-D-arabinitolu (CAP), który jest syntetyzowany w ciemności i degradowany w czasie ekspozycji rośliny na światło. Zarówno „aktywaza” Rubisco jak i CAP stanowią zupełnie nowy koncept regulacji Rubisco, a co za tym idzie regulacji procesu fotosyntezy jako całości.

Mechanizm regulacji aktywności Rubisco jest jednym z najbardziej złożonych zagadnień biochemii roślin. Enzym ten po wyizolowaniu z liści lub chloroplastów wymaga skomplikowanego procesu aktywacji przez CO₂ i Mg²⁺ zanim osiągnie katalityczną aktywność, która z reguły jest niższa od aktywności procesu fotosyntezy *in vivo* [5, 6]. Aktywacja Rubisco przez CO₂ i Mg²⁺ była niedawno omawiana na łamach Postępów Biochemii [7], i wystarczy tu tylko przypomnieć, że proces ten wymaga przyłączenia kolejno cząsteczki CO₂ i Mg²⁺ do centrum aktywnego Rubisco. Powstały kompleks enzym-Co₂-Mg²⁺ jest katalitycznie aktywną formą Rubisco [6]. Z drugiej strony jednak, pewne własności procesu aktywacji *in vitro* nie pokrywają się z fizjologicznymi obserwacjami fotosyntezy. Najbardziej uderzające jest, że pełna aktywacja wyizolowanego enzymu,

*Dr, Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Roślin, Akademia Rolnicza, ul. Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa.

odpowiadająca tej która jest wymagana dla procesu fotosyntezy *in vivo*, następuje tylko przy bardzo wysokich нефизjologicznych stężeniach CO_2 i Mg^{2+} [2, 3, 6, 8], podczas gdy pomiary stanu aktywacji w liściach wykazały, że enzym ten jest w pełni aktywowany przez atmosferyczne stężenie CO_2 [3, 9, 10]. Odkrywcy „aktywazy” Rubisco, Salvucci i wsp. [1, 2], sugerują, że optymalna aktywacja Rubisco na świetle przy fizjologicznym poziomie CO_2 jest wynikiem reakcji pomiędzy Rubisco i „aktywazą”, co prowadzi w konsekwencji do podwyższenia powinowactwa Rubisco dla CO_2 . Reakcja ta najprawdopodobniej polega na zmianie konfiguracji struktury Rubisco, ułatwiając dostęp CO_2 do centrum aktywnego enzymu.

Inna sprzeczność wynika z faktu, że aktywność Rubisco *in vivo* jest stymulowana przez światło [8, 9, 10, 11, 12]. Aktywacja ta jest z reguły przypisywana wzrostowi pH i (Mg^{2+}) w stromie chloroplastów pod wpływem światła. Z drugiej strony, zmiany w wartościach pH i (Mg^{2+}) wymagają dużo mniejszej intensywności światła niż aktywacja [9, 13] i są niewystarczające, by tłumaczyć nimi wysoki poziom aktywacji Rubisco na świetle *in vivo* [6]. Udział „aktywazy” Rubisco w tym procesie został wydedukowany już wcześniej na podstawie doświadczeń z mutantem *Arabidopsis thaliana*, który nie posiada zdolności do pełnej aktywacji Rubisco, podczas gdy mechanizm aktywacji przez CO_2 i Mg^{2+} przebiega u niego normalnie [10]. Badania Salvucciego i wsp. [1, 2] a także Portisa i wsp. [3] pozwoliły na precyzyjniejsze określenie własności „aktywazy”, a przede wszystkim dostarczyły dowodów na aktywację tego regulatorowego białka przez światło.

Obecność endogennej publi CAP, inhibitora Rubisco [4], zapewne także wpływa na wielkość aktywacji tego enzymu wywołanej przez światło. Pierwszymi badaczami, którzy zasugerowali działanie endogennego inhibitora Rubisco, byli Vu i wsp. [14]. Postulowali oni, że związek ten łączy się z nieaktywnym enzymem, utrudniając — w przeciwieństwie do „aktywazy” opisanej przez Salvucciego i wsp. [1] — aktywację Rubisco przez CO_2 i Mg^{2+} . Hipoteza ta znalazła eksperymentalne potwierdzenie w badaniach Gutteridge'a i wsp. [4], a nieco wcześniej w pracy Servaitesa [15], który wykazał, że w ciemności Rubisco jest inhibowana przez niskocząsteczkowy związek chemiczny zawierający grupę(y) fosforanową(e) i przyłączający się do aktywnego centrum enzymu uniemożliwiając katalizę.

CAP przypomina swoją budową chemiczną 1,5-difosforan 2-karboksy-D-arabinitolu, który jest prawdopodobnie produktem pośrednim reakcji karboksylazy i ma bardzo wysokie powinowactwo do enzymu ($K_i = 10^{-11}$ M) [16]. Kinetyka inhibicji Rubisco przez CAP i jego analogi była ostatnio skrupulatnie badana [16, 17], ale dane przytoczone przez Gutteridge'a i wsp. [4] są pierwszymi, które opisują występowanie takiego inhibitora *in vivo*.

Pomimo że mechanizmy syntezy CAP w zaciemnionych liściach i jego degradacji na świetle są nieznanne, wydaje się niemal pewne, że fizjologiczna funkcja CAP związana jest z inhibicją Rubisco w ciemności. Proces degradacji tego inhibitora na świetle jest prawdopodobnie w dużej mierze odpowiedzialny za zjawisko tzw. indukcji fotosyntetycznej. Kiedy liście są oświetlone, asymilacja CO₂ wykazuje pewne opóźnienie (faza indukcji), trwające nieraz kilkadziesiąt minut, zanim fotosynteza osiągnie swą maksymalną aktywność [6, 8, 9, 10, 11]. Dotychczas sądzono, że konieczność autokatalitycznego wzrostu poziomu RuBP, substratu Rubisco, jest głównym czynnikiem tego opóźnienia [8, 9]. Wyniki opublikowane przez Gutteridge'a i w.s.p. [4] wskazują, że proces obniżania endogennego stężenia CAP w oświetlonych liściach może stanowić dodatkowy czynnik, bodajże najważniejszy, dla osiągnięcia pełnej aktywności przez Rubisco. Udziału „aktywazy” Rubisco [1, 2, 3] w tym procesie także nie można wykluczyć.

Podobnie można by tłumaczyć dotychczas nie wyjaśnione zjawisko zmian specyficznej aktywności Rubisco w zależności od warunków świetlnych panujących bezpośrednio przed ekstrakcją enzymu z liści [14, 15, 18].

W chwili obecnej wydaje się pewne, że odkrycia „aktywazy” Rubisco i regulacyjnej roli CAP stanowią przełom w dotychczasowym rozumieniu mechanizmów kontroli fotosyntezy. Prace te tłumaczą szereg pozornie sprzecznych wcześniejszych obserwacji dotyczących regulacji Rubisco i fotosyntezy i tworzą podstawę nowego podejścia do problemu kompleksowej regulacji procesu asymilacji węgla w przyrodzie.

*Artykuł otrzymano 9 kwietnia 1987 r.
Zaakceptowano do druku 1 maja 1987 r.*

PIŚMIENNICTWO

1. Salvucci M. E., Portis A. R., Ogren W. L., (1985), *Photosynth. Res.*, **7**, 193—201.
2. Salvucci M. E., Portis A. R., Ogren W. L., (1986), *Plant Physiol.*, **80**, 655—659.
3. Portis A. R. Salvucci M. E., Ogren W. L., (1986), *Plant Physiol.*, **82**, 967—971.
4. Gutteridge S., Parry M. A. J., Burton S., Keys A. J., Mudd A., Feeney J., Servaites J. C., Pierce J., (1986), *Nature*, **324**, 274—276.
5. Lorimer G. H., Miziorko H. M., (1980), *Biochemistry*, **19**, 5321—5328.
6. Miziorko H. M., Lorimer G. H., (1983), *Annu. Rew. Biochem.*, **52**, 507—535.
7. Maleszewski S., Kamińska Z., (1984), *Post. Biochem.*, **30**, 317—334.
8. Lorimer G. H., Badger M. R., Heldt H. W., (1983), w *Photosynthetic Carbon Assimilation*, red. Siegleman H. W., Hind G., str. 283—306, Plenum, New York.
9. Perchorowicz J. T., Raynes D. A., Jensen R. G., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2985—2989.

10. Somerville C. R., Portis A. R., Ogren W. L., (1982), *Plant Physiol.*, **70**, 381—387.
11. Bahr J. T., Jensen R. G., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **185**, 39—48.
12. Schnyder H., Machler F., Nosberger J., (1984), *J. Exp. Bot.*, **35**, 147—156.
13. Heber U., Takahama U., Neimanis S., Shimizu-Takahama M., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **679**, 289—299.
14. Vu C. V., Allen L. H., Bowes G., (1984), *Plant Physiol.*, **76**, 843—845.
15. Servaites J. C., (1985), *Plant Physiol.*, **78**, 839—843.
16. Pierce J., Tolbert N. E., Barker R., (1980), *Biochemistry*, **19**, 934—942.
17. Hall N. P., Pierce J., Tolbert N. E., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **212**, 115—119.
18. Boyle F. A., Keys A. J., (1987), *Photosynth. Res.*, **11**, 97—108.

SŁOWNICTWO BIOCHEMICZNE

Komisja Słownictwa Biochemicznego przedstawia zalecenia na temat słownictwa kwasów nukleinowych, dziękując jednocześnie prof. dr Wiesławowi Z. Antkowiakowi i doc. dr Włodzimierzowi Krzyżosiakowi z Polskiego Towarzystwa Chemicznego za ceną współpracę.

Słownictwo niejednoznacznie określonych zasad oraz różnych zdefiniowanych kombinacji zasad w sekwencjach kwasów nukleinowych.

Opracowano na podstawie dokumentu Komitetu Nomenklatury Międzynarodowej Unii Biochemicznej (NC—IUB): Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984, opublikowanego w Eur. J. Biochem. (1985), 150, 1—5.

Tłumaczyła *G. Jagura-Burdzy*

Spis treści

1. Wprowadzenie

2. Zastosowanie standardowego słownictwa

2.1. Sekwencje w DNA rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne

2.2. Sekwencje w DNA rozpoznawane przez inne enzymy

2.3. Sekwencje w RNA rozpoznawane przez enzymy biorące udział w procesie translacji

2.4. Degeneracja kodonów

2.5. Tworzenie uproszczonych sekwencji przy użyciu uogólnionych symboli

2.6. Inne zastosowania

3. Przypisanie symboli

3.1. Guanina, adenina, tymina, cytozyna: G, A, T, C

3.2. Puryna (adenina lub guanina): R

3.3. Pirymidyna (tymina lub cytozyna): Y

3.4. Adenina lub tymina: W

3.5. Guanina lub cytozyna: S

3.6. Adenina lub cytozyna: M

3.7. Guanina lub tymina: K

3.8. Adenina lub tymina lub cytozyna: H

3.9. Guanina lub cytozyna lub tymina: B

3.10. Guanina lub adenina lub tytozyna: V

3.11. Guanina lub adenina lub tymina: D

4. Inne pomocnicze symbole

5. Dyskusja

5.1. Interpretacja wstępnych danych sekwencyjnych

5.2. Modyfikowane nukleotydy

1. Wprowadzenie

Wraz z wprowadzeniem szybkich metod sekwencjonowania kwasów nukleinowych, syntezy mieszanych sond oligonukleinowych i komputerowej analizy sekwencji kwasów nukleinowych, użycie pojedynczego symbolu dla określania różnych możliwych nukleotydów występujących w określonej pozycji sekwencji uzyskało w ostatnich latach szerokie rozpowszechnienie. Podczas gdy użycie symboli R i Y dla określenia odpowiednio rybonukleozydów purynowych (A lub G) i pirymidynowych (C lub T) zostało powszechnie zaakceptowane [1, 2], brak jest uzgodnionych symboli oznaczających inne możliwe kombinacje. W ostatnich latach rozpowszechniło się mnóstwo różnorodnych systemów [3—12]. W jednym ze skrajnych przypadków kombinację (C lub G) przedstawia co najmniej pięć różnych symboli [3—5, 9, 12]. Aby uniknąć pomyłek niezbędnym stał się więc ujednoczony zestaw symboli.

Zalecana symbolika obowiązywać ma zarówno w odniesieniu do kwasu deoksyrybonukleinowego jak i rybonukleinowego. Zalecane symbole nie będą rozróżniać między DNA i RNA, zaś symbol T będzie stosowany we wszystkich pozycjach gdzie w RNA występuje U. Podobnie, symbole nie będą wprowadzały rozróżnienia między zasadą, nukleozydem i nukleotydem. Jeśli nie zaznaczono inaczej, należy przyjąć, że sekwencje mają szkielet deoksyrybozowy (DNA). Takie zmiany wcześniejszych zaleceń [1, 2] wprowadzono w następstwie znacznego postępu w technikach sekwencjonowania DNA, który sprawił, że obecnie coraz powszechniej wnioskuje się o sekwencji RNA na podstawie odpowiednich sekwencji DNA. Ponieważ standardowe przedstawienie sekwencji DNA można w prosty sposób przekształcić w odpowiadającą jej sekwencję RNA, zamieniając T na U, nie przewiduje się aby komputerowe banki danych musiały zawierać odrębne zapisy dla RNA. Autorzy powinni jednak zawsze jasno określić, do którego łańcucha: DNA lub RNA odnosi się dana sekwencja. W okolicznościach, w których może zajść pomyłka między DNA i RNA, należy sekwencję poprzedzić małą literą d lub r, podobnie jak podano w poprzednich zaleceniach [1, 2]. Ponieważ obecne zalecenia nadają jednoznaczne alfabetyczne symbole każdej kombinacji nukleotydów, użycie dużych i małych liter nie prowadzi do pomyłek. Jednakże możliwa jest pomyłka między r (ryboza) i R (puryna), a więc należy zachować ostrożność w tych rzadkich przypadkach, gdy różnorodne symbole występują obok siebie. Należy podkreślić, że chociaż doradza się stosowanie symboli pisanych dużymi literami, to jednak obecne zalecenia nie mają wywołać uprzedzeń co do możliwego przyszłego stosowania dla specjalnych celów przeciwstawnych małych i dużych liter.

Poprzednio zalecano [1, 2] używanie łączników dla przedstawienia wiązań fosfodiestrowych w znanych sekwencjach nukleotydów. Ze wzglę-

du na nikłe niebezpieczeństwo zajścia pomyłki między kodonem trójkowym a sekwencją nukleotydów, zalecenia tego nie uważa się obecnie za niezbędne. Można więc opuścić łączniki w sekwencjach, tak jak to uczyniono we wszystkich sekwencjach przedstawionych w tym dokumencie. Jeśli nie zaznaczono inaczej, należy przyjąć, że sekwencję przedstawiono od końca 5' do 3', aczkolwiek nie zniechęca się do zaznaczania tego faktu.

Chociaż w piśmiennictwie istnieje już kilka różnych systemów oznaczania zasad, których struktura nie została w pełni określona, obecna praca nie zawiera systematycznego przeglądu tych systemów. Szczegóły dotyczące poprzednich zaleceń, jak też dane na temat innych systemów można znaleźć w piśmiennictwie [1—12].

2. Zastosowanie standardowego słownictwa

2.1. Sekwencje w DNA rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne

Większość enzymów restrykcyjnych i właściwych im metylaz rozpoznaje proste, jednoznaczne sekwencje nukleotydów w DNA. Na przykład *EcoRI* i *BamHI* rozpoznają odpowiednio sekwencje 5'-GAATTC-3' i 5'-GGATCC-3'. Niemniej jednak, do tej powiększającej się wciąż klasy enzymów należą też takie, które rozpoznają serie pochodnych sekwencji, gdzie w rozpoznawanej sekwencji w tej samej pozycji mogą występować dwie zasady, lub więcej (pełny spis patrz [13]). Na przykład enzym *AvaI* rozpoznaje cztery różne sekwencje: 5'-CCCGGG-3', 5'-CCCGAG-3', 5'-CTCGGG-3', i 5'-CTCGAG-3'. Sekwencję rozpoznawaną przez *AvaI* można więc przedstawić jako 5'-CYCGRG-3', gdzie Y przedstawia pirymidynę, a R -purynę, jak zalecano uprzednio [1, 2]. Jednakże kilka nowo odkrytych enzymów rozpoznaje kombinacje, których nie można przedstawić za pomocą istniejących symboli. Na przykład *AccI* rozpoznaje sekwencję 5'-GT(A lub T)(G lub T)AC-3'. *SduI* rozpoznaje sekwencję 5'-G(A lub G lub T)GC(A lub C lub T)C-3'. Obecne symbole uwzględniają takie możliwości.

2.2. Sekwencje w DNA rozpoznawane przez inne enzymy

Enzymy restrykcyjne są wysoce swoiste względem określonych sekwencji kwasów nukleinowych. W przypadku wielu innych enzymów swoistość ta nie jest tak silnie wyrażona i symbole mają częściowo zaspokoić potrzebę systematycznego przedstawienia cech takich sekwencji. Na przykład sekwencje rozpoznawane przez polimerazę RNA z *Escherichia coli* można przedstawić jako zestawienie dwu sekwencji: 5'-AA(A lub T)-NTNNN(C lub G)TTGACA-3' i 5'-(T lub G)NNTATAAT-3', oddzielonych od siebie przez 13 do 16 nukleotydów [16, 17], gdzie N przedstawia dowol-

ny nukleotydy. Podobny zabieg można zastosować w stosunku do sekwencji rozpoznawanych przez inne białka wiążące DNA, takie jak np. cząsteczki represora.

2.3. Sekwencje w RNA rozpoznawane przez enzymy biorące udział w procesie translacji

Jak już wspomniano powyżej, sekwencje RNA najwygodniej jest przedstawić w postaci odpowiadającego im DNA. Tak więc zasadnicze elementy miejsca inicjacji translacji u *Escherichia coli* można przedstawić jako 5'-(G lub A)(G lub A)GGGNNNNAN(C lub T)ATGNN(A lub T)-NNNNN(C, T lub G) (według [18]). Podobnie miejsca inicjacji translacji eukariotycznych mRNA wydają się być objęte ogólną sekwencją 5'-ANNATG(G lub A)-3' [19].

2.4. Degeneracja kodonów

Chociaż istnieją 64 możliwe triplety kodonowe, kodują one tylko 20 różnych aminokwasów. Tak więc większość aminokwasów wbudowuje się w rosnący łańcuch polipeptydowy w odpowiedzi na dwa lub więcej różnych tripletów w mRNA (patrz [20], praca przeglądowa). Na przykład prolinę koduje 5'-CCN-3', a alaninę 5'-GCN-3'. W innych przypadkach sytuacja jest bardziej złożona, jak np. w przypadku izoleucyny kodowanej przez 5'-AT(T, C lub A)-3'. Zauważmy, że pewne aminokwasy (np. seryna) mogą być kodowane przez dwie odmienne grupy tripletów (5'-TCN-3' i 5'-AG(T lub C)-3', których nie da się jednoznacznie przedstawić jako 5'-(T lub A)(C lub G) (patrz Tab. 4). Warto zauważyć, że syntetyczne sondy oligonukleotydowe do wykrywania sekwencji kodujących białka często mają charakter „sond mieszanych”. Wtedy w określonej pozycji polinukleotydu wbudowuje się mieszaninę dwu (lub więcej) nukleotydów, tak aby uwzględnić wieloznaczność kodu genetycznego (na przykład [2]). Zakłada się, że na opisanie takich mieszanin można użyć kodu jednoliterowego.

2.5. Tworzenie uproszczonych sekwencji za pomocą uogólniających symboli

Gdy dwie wyjściowe sekwencje różnią się rodzajem nukleotydu w określonej pozycji (np. A w jednej, a G w drugiej), można przedstawić uogólnioną, uproszczoną sekwencję, obejmującą obydwa przypadki stosując kod jednoliterowy w miejsce dwu różniących się nukleotydów; w tym przypadku R [11].

2.6. Inne zastosowania

Zakłada się, że symbole będą użyteczne i w tych przypadkach, w których tożsamość nukleotydu nie jest w pełni określona. Tak więc niepewność, wynikająca przy wstępnej analizie sekwencji nukleotydów można w pewnych przypadkach wyrazić za pomocą standardowych symboli.

3. Przypisanie symboli

Przy wyborze symboli brano pod uwagę następujące założenia: 1) zgodność z dotychczasowym słownictwem IUPAC-IUB; 2) logiczne pochodzenie; 3) łatwość zapamiętania; 4) dostępność symboli na standardowej klawiaturze maszyny do pisania; 5) historyczny precedens.

3.1. Guanina, adenina, tymina, cytozyna: G, A, T, C

Te symbole jednoliterowe ustalono uprzednio [1, 2] i są one w powszechnym użyciu. Istnieją jednak trudności z rozróżnieniem dużych liter G i C na złych kopiach sekwencji. Niemniej jednak nie zaleca się używania alternatywnych symboli na określenie G (takich, jak \bar{G} przekreślone, \tilde{G}). Rozróżnienie małych liter jest znacznie łatwiejsze. Zauważ, że T i U można ogólnie uważać za synonimy, chociaż należy zachować ostrożność aby uniknąć dwuznaczności tam, gdzie jest ona prawdopodobna, np. przy omawianiu sztucznych hybrydów DNA i RNA, oraz tam, gdzie jest wskazane specyficzne rozróżnienie między T i U.

3.2. Puryna (adenina lub guanina): R

R jest symbolem zalecanym uprzednio [1,2].

3.3. Pirymidyna (tymina lub cytozyna): Y

Y jest symbolem zalecanym uprzednio [1,2].

3.4. Adenina lub tymina: W

Chociaż na określenie tej pary używano kilku odmiennych symboli (podobnie jak uzupełniającej pary G+C), tylko dwa symbole mają logiczne uzasadnienie: L i W. L pochodzi od gęstości DNA (leight — lekki); G+C — heavy, ciężki, byłoby więc H); W pochodzi od siły wiązań wodorowych między parami zasad (weak, słabe w odniesieniu do A+T; G+C — strong, silne, byłoby więc S). Jednakże system zalecany na określenie układów trzech zasad, (np. kombinacji trzech zasad G, T, C z pominięciem

A, określanej jako nie-A = B itd., patrz poniżej, punkt 3.8) wyklucza H, gdyż oznaczałoby to nie-G. Zaleca się więc stosować symbol W.

3.5. Guanina lub cytozyna: S

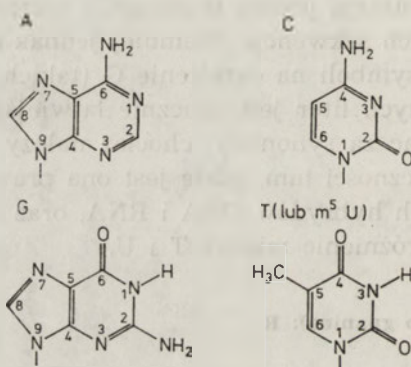
Wybór tego symbolu omówiono powyżej, punkt 3.4.

3.6. Adenina lub cytozyna: M

A i C mają kilka cech wspólnych. Obecność grupy aminowej w podobnych pozycjach (Rys. 1) sprawia, że można było logicznie wprowadzić symbol. Ponieważ A i N są wykluczone, zaleca się M (od aMino).

3.7. Guanina lub tymina: K

Przez analogię z A i C (punkt 3.6) guaninę i tyminę oznacza się przez K, gdyż obie zasady, G i T mają grupy Ketonowe w podobnej pozycji (patrz Rys. 1).



Ryc. 1. Pochodzenie symboli M i K

Cztery zasady narysowano w taki sposób, aby z jednej strony wykazać zależność między adeniną a cytozyną, obie bowiem mają grupy aminowe w pozycji pierścienia najbardziej odległej od miejsca przyłączenia cukru, a z drugiej strony wykazać zależność między guaniną a tyminą, które mają grupy ketonowe w odpowiadających sobie pozycjach. Atomy pierścieni ponumerowano zgodnie z zaleceniami (25—28), chociaż nie jest to korzystne w tym przypadku, wprowadza się bowiem inne numery odpowiadającym sobie pozycjom.

3.8. Adenina lub tymina lub cytozyna: H

Nie-G jest to najprostszy sposób zapamiętania tej kombinacji, a zatem sprawdzano symbole logicznie związane z G. F i H pasowałyby, jako litery występujące przed- i po G w alfabecie. A nie mogłoby mieć jednak odpowiednika do F, wybrano więc H. Użycie H ma historyczny precedens [3].

3.9. Guanina lub cytozyna lub tymina: B

Nie-A, jak powyżej (punkt 3.8).

3.10. Guanina lub adenina lub cytozyna: V

Nie-T, przez analogię z nie-G (patrz punkt 3.8) powinno być U, jest to jednak wykluczone ze względu na możliwość pomyłki z uracylem. Zauważ, że T i U mogą być w niektórych przypadkach rozpatrywane jako synonimy.

3.11. Guanina lub adenina lub tymina: D

Nie-C, jak powyżej (patrz punkt 3.8).

3.12. Guanina lub adenina lub tymina lub cytozyna: N

Ten symbol nasuwa się w związku z brzmieniem słowa aNy, każdy. Uznaje się, lecz nie zaleca używania X na określenie nieznannej zasady, gdyż symbol ten oznacza ksantynę [1, 2]. W pewnych przypadkach pożądane jest wprowadzenie rozróżnienia między „nieokreślony, niesprecyzowany” (N), a „nieznany” (X), ale jeśli używa się X w tym znaczeniu, należy to jasno zaznaczyć.

4. Inne pomocnicze symbole

Istnieje szereg okoliczności, w których dodatkowe symbole mogą być niezbędne w rutynowej pracy. Chociaż w tym rozdziale przedstawiono szereg propozycji, nie stanowią one części obecnych zaleceń.

Po pierwsze, rozważmy brak pewności, czy dana zasada występuje w określonej pozycji, czy też nie. Na przykład symbol „?” albo „+”, określający „G lub A lub T lub C lub brak nukleotydu” mógłby służyć do oznaczania niepewnych regionów o ograniczonej zmiennej wielkości w rozpoznawanej sekwencji (patrz na przykład [23]). Jeden z tych symboli mógłby służyć alternatywnie jako element podkreślający niejednoznaczność: na przykład „?A” mogłoby oznaczać „A lub brak nukleotydu w tej pozycji”. Po drugie, niejednoznaczny brak nukleotydu, zaznaczony w sekwencji dla jej „wyrównania” lub do celów porównawczych można by oznaczać jako „:”, choć pozostawienie pustego pojedynczego miejsca przemawia samo za siebie. Po trzecie, określoną liczbę nieznanymi nukleotydów można by oznaczać za pomocą symbolu takiego jak np. „—” w połączeniu z cyframi, tak iż np. „-300-” mogłoby oznaczać obecność 300 kolejnych nieznanymi nukleotydów. Po czwarte w okolicznościach, w których ważne jest szybkie, wzrokowe rozróżnienie między „znane” (istotne) a „nie-

znane" (nieistotne) można również zastąpić symbol N łącznikiem „—”. Znaczenie wprowadzenia takiego symbolu można ocenić, porównując „NNNNNCNNGNTNN” z „----C--G-T--”. Zauważ, że używając małej litery n można uniknąć wprowadzenia nowego symbolu, jak na przykład nnnnnCnnGnTnn”.

Dodatkowe wprowadzenie ukośnego przekreślenia „/” udogadnia określenie dokładnego miejsca cięcia przez endonukleazy restrykcyjne. Na przykład swoistość cięcia przez powszechnie znany enzym EcoRI można przedstawić jako C/AATTC. W obu łańcuchach symetrycznej względem siebie sekwencji cięcie zachodzi wtedy między G i A.

Należy podkreślić, że symbole dyskutowane w tym rozdziale nie stanowią integralnej części zaleceń i dlatego przy ich użyciu należy je jasno zdefiniować w kontekście w jakim występują.

5. Dyskusja

Obecne słownictwo, zebrane w (Tab. 1) utworzono w celu stosowania go w przypadku niejednoznacznego określenia struktury niektórych zasad występujących w sekwencjach kwasów nukleinowych.

Tab. 1.

Streszczenie zaleceń kodu jednoliterowego

Symbol	Znaczenie	Źródło pochodzenia
G	G	Guanina
A	A	Adenina
T	T	Tymina
C	C	Cytozyna
R	G lub A	puRyna
Y	T lub C	pirymidyna (pYrimidine)
M	A lub C	aMino
K	G lub T	Keto
S	G lub C	silne (Strong) oddziaływanie (3 wiązania wodorowe)
W	A lub T	ślabe (Weak) oddziaływanie (2 wiązania wodorowe)
H	A lub C lub T	nie-G, H występuje w alfabecie po G
B	G lub T lub C	nie-A, B występuje w alfabecie po A
V	G lub C lub A	nie-T (nie-U), V występuje w alfabecie po U
D	G lub A lub T	nie-C, D występuje w alfabecie po C
N	G lub A lub T lub C	każdy (aNy)

W przypadkach, gdzie dopuszcza się występowaniu dwóch lub więcej zasad w określonej pozycji, słownictwo zezwala na przypisanie im jednoliterowego symbolu. Słownictwo to może też mieć zastosowanie tam, gdzie

nie ma pewności co do zasięgu i/lub identyczności sekwencji. W przypadku dwuniciowych kwasów nukleinowych (Tab. 2) zezwala się na przypisanie symboli komplementarnemu łańcuchowi.

Tab. 2.

Definicja symboli komplementarnych

Symbol	A	B	C	D	G	H	K	M	S	T	V	W	N
Uzupełnienie	T	V	G	H	C	D	M	K	S*	A	B	W*	N*

* W pewnych przypadkach symbol i jego komplementarne uzupełnienie są identyczne

Podano przykłady zastosowania zalecanej nomenklatury do zapisu sekwencji rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne typu II (Tab. 3) oraz do podkreślenia niejednoznaczności pojawiających się przy oznaczaniu sekwencji kwasu nukleinowego na podstawie odpowiadającej jej sekwencji aminokwasów (Tab. 4).

Poniżej podano rozważania na temat dwu zastosowań, wykraczających poza zasięg podanego słownictwa.

Tab. 3.

Sekwencje rozpoznawane przez kilka endonukleaz restrykcyjnych typu II, rozpoznających wielorakie sekwencje przedstawione tu za pomocą kodu jednoliterowego
Rozpoznawane sekwencje przedstawiono od 5' do 3'; dokładne miejsce cięcia wskazano przez/. Dane pochodzą z [13]

Enzym	Sekwencja rozpoznawana
<i>AccI</i>	G T / M K A C
<i>AcyI</i> (<i>Hgi</i> DII)	G R / C G Y C
<i>AflIII</i>	A / C R Y G T
<i>AvaI</i>	C / Y C G R G
<i>AvaII</i>	G / G W C C
<i>BanI</i>	G / G Y R C C
<i>BanII</i> (<i>Hgi</i> JII)	G R G C Y / C
<i>CfrI</i> (<i>Gdi</i> II)	Y / G G C C R
<i>EcoRII</i>	/ C C W G G
<i>HaeI</i>	W G G / C C W
<i>HaeII</i>	R G C G C / Y
<i>HgiAI</i>	G W G C W / C
<i>HindII</i> (<i>Hinc</i> II)	G T Y / R A C
<i>NciI</i> (<i>Cau</i> II)	C C / S G G
<i>NspI</i> (<i>Nsp</i> -7524-I)	R C A T G / Y
<i>NspBII</i>	C M G / C K G
<i>SduI</i> (<i>Nsp</i> -7524-II)	G D G C H / C
<i>XhoII</i>	R / G A T C Y

Tab. 4.

Odpowiedniki tripletów kodonowych dla aminokwasów
(standardowy kod genetyczny)

Aminokwas	Kod jednolite- rowy	Triplet/5'—3'/
Glicyna	G	GGN
Alanina	A	GCN
Walina	V	GTN
Leucyna	L	YTN (CTN i TTR)
Izoleucyna	I	ATH
Prolina	P	CCN
Fenylalanina	F	TTY
Tyrozyna	Y	TAY
Cysteina	C	TGY
Metionina	M	ATG
Histydyna	H	CAY
Lizyna	K	AAR
Arginina	R	MGN(CGN i AGR)
Tryptofan	W	TGG
Seryna	S	WSN(TCN i AGY)
Treonina	T	ACN
Kwas asparaginowy	D	GAY
Kwas glutaminowy	E	GAR
Asparagina	N	AAY
Glutamina	Q	CAR
Kwas asparaginowy lub asparagina	B	RAY
Kwas glutaminowy lub glutamina	Z	SAR
Terminator	.	TRR(TAR i TGA)
Niezmany	X	NNN

Sekwencja aminokwasów jest jednoznacznie określona przez sekwencję nukleotydów. Podobnie, możliwe jest przekształcenie sekwencji aminokwasowej na linearny układ niejednoznacznie określonych zasad, ale powstają trudności z kodonami dla leucyny, argininy, seryny i terminatora. W przypadku leucyny, na przykład, kodujące triplety są precyzyjnie określone przez symbole CTN i TTR, ale połączenie tych dwóch daje YTN, który także zawiera w sobie dwa kodony dla fenylalaniny, TTC i TTT. Można utracić taką informację, jeśli przekształci się sekwencję aminokwasów w pojedynczą sekwencję symboli, wyrażających niepewność co do zasad. Aby uniknąć dwuznaczności, należy jasno zaznaczyć, że kiedy triplet, na przykład YTN pojawia się w sekwencji, wydedukowanej z odpowiadającej jej sekwencji aminokwasów, nie obejmuje on możliwości sekwencji TTT lub TTC. Aby to podkreślić, można by drukować takie triplety kursywą.

5.1. Interpretacja wstępnych danych sekwencyjnych

W pewnych przypadkach słownictwo zezwala na wyrażanie niepewności, powstających przy sekwencjonowaniu kwasów nukleinowych za pomocą kodu jednoliterowego. Co najmniej dwie sytuacje, określone symbolami „albo X albo XY” i „prawdopodobnie X” nie zostały w tym opracowaniu właściwie potraktowane. Specjalnie dla takich celów stworzono wyspecjalizowane słownictwo (na przykład [4]).

5.2. Modyfikowane nukleotydy

W wielu organizmach DNA i RNA ulegają modyfikacji w określonych pozycjach. Na przykład, DNA z *Escherichia coli* ulega metylacji na N-6 reszty adeninowej w sekwencji 5'-GATC-3' [24]. Obecne słownictwo nie przypisuje tym zmodyfikowanym nukleotydom żadnego określonego symbolu, a to z następujących powodów: 1) Obecność lub brak danej modyfikacji zależy od umiejscowienia DNA. Sekwencje modyfikowane w jednym organizmie mogą nie ulegać modyfikacji w innym. 2) Modyfikacje są zazwyczaj statystyczne, to znaczy tylko część możliwych miejsc modyfikacji może być wykorzystana *in vivo*. Modyfikacja nukleotydu lub zasady w danym polinukleotydzie nie jest funkcją sekwencji *per se*. Chociaż wiadomo, że trwałe rodzaje RNA (tRNA i rRNA) często mają stały rozkład post-translacyjnych modyfikacji, obecne słownictwo nie ma na celu ani pokrywania się z istniejącymi systemami, ani ich wypierania. Prawdopodobnie nie udałoby się stworzyć prostego i logicznego systemu, który nie kolidowałby z poprzednimi. Należy więc uznać możliwość takiego konfliktu i podejmować starania, aby uniknąć powstania zamieszania, np. w odniesieniu do symboli B, D, i S, które zalecano, odpowiednio, na określenie 5-bromourydyny, 5, 6-dihydrourydyny i tiourydyny, [1, 2], lub W, używanego czasami na określenie wyozyiny [29].

PIŚMIENNICTWO

1. IuPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Abbreviations and symbols for nucleic acids, polynucleotides and their constituents, Recommendations 1970. [1970] *Biochem. J.*, **120**, 449—454, i w innych czasopismach.
2. Skróty i symbole kwasów nukleinowych, polinukleotydów i ich składników. w Nowe Polskie Słownictwo Biochemiczne. Red. A. Morawiecki. PWN Warszawa 1983, s. 133
3. Fitch W. M., (1973) *J. Mol. Evol.* **2**, 123—136
4. Staden R., (1979) *Nucl. Acids Res.* **6**, 2601—2610
5. Clayton J., Kedes L., (1982) *Nucl. Acids Res.* **10**, 305—321
6. Orcutt B. C., George D. G., Fredrickson J. A., Dayhoff M. O., (1982) *Nucl. Acids Res.* **10**, 157—174

7. Patarca R., Dorta B., Ramirez J. L., *Nucl. Acids Res.* **10**, 175—182
8. Stockwell P. A., (1982) *Nucl. Acids Res.* **10**, 115—125
9. Tolstoshev C. M., Blakesley R. W., (1982) *Nucl. Acids Res.* **10**, 1—17
10. McClelland M., (1983) *Nucl. Acids Res.* **11**, R169—173
11. Fitch W. M., (1983) Nieopublikowany manuskrypt
12. Brown N. L., (1983) Nieopublikowany manuskrypt
13. Roberts R. J., (1983) *Nucl. Acids Res.* **11**, R135—167
14. Zabeau M., Roberts R. J. Nieopublikowane obserwacje, cytowane w [13]
15. Janulaitis A., Marcinkeviciene L., Petrusyte M., Mironov A., (1981) *FEBS Lett.* **134**, 172—174
16. Rosenberg M., Court D., (1979) *Annu. Rev. Genet.* **13**, 319—353
17. Siebenlist U., Dimpson R. B., Gilbert W., (1980) *Cell* **20**, 269—281
18. Stormo G. D., Schneider T. D., Gold L., Ehrenfeucht A., (1982) *Nucl. Acids Res.* **10**, 2997—3011
19. Kozak M., (1983) *Microbiol. Rev.* **47**, 1—45
20. Ycas M., (1967) The biological code. Wiley-Interscience, New York
21. Goeddel D. V., Yelverton E., Ullrich A., Heynecker H. L., Miozari G., Holmes W., Seeburg P. H., Dull T., May L., Stebbins N., Crea R., Maeda S., McCandliss R., Sloma A., Tabor J. M., Gross M., Familletti P. C., Pestka S., (1980) *Nature* (London) **287**, 411—416
22. Fitch W. M., (1971) *System. Zool.* **20**, 406—416
23. Stormo G. D., Schneider T. D., Gold L. M., (1982) *Nucl. Acids Res.* **10**, 2971—2996
24. Geier G. E., Modrich P., (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 1408—1413
25. International Union of Pure and Applied Chemistry (1979) Nomenclature of Organic Chemistry. Sections A, B, C, D, E, F and H. Red. Rigaudy J., Klesney S. P. Pergamon Press, Oxford
26. Nomenklatura związków organicznych. PWN Warszawa. (1978) Części A i B, (1979) Część C i Część E., (1981) Część D
27. IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC). Definitive rules for nomenclature of organic chemistry. (1960) *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 5545—5574
28. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Abbreviations and symbols for the description of conformation of polynucleotide chains. Recommendations (1982). (1983) *Eur. J. Biochem.* **131**, 9—15, i w innych czasopismach
29. Singhal R. P., Roberts E. F., Vakharia V. N., (1983) *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **28**, 211—252

RECENZJE

Molecular Cell Biology

James Darnell, Harvey Lodish, David Baltimore

Scientific American Books Inc.

Distributed by W. H. Freeman and Co., 1986

Stron 1187. Cena w twardej okładce 48,95 funtów, w papierowej okładce 18,95 funtów.

Olbryzi postępy w biochemii jaki dokonał się w ostatnich 20 latach (niektórzy nazywają ten okres rewolucją w biologii) zawdzięczamy rozwojowi nowych metod, wykorzystujących zaledwie „minutowe” ilości substancji biologicznych. Można tutaj wymienić ultrawierowanie, nowe mikroskopy, rentgenografię, określenie sekwencji białek oraz DNA, a także nowe wykorzystanie materiału biologicznego jak monoklonalne przeciwciała, wirusy roślinne i zwierzęce, kultury tkankowe i klonowanie genów. „Synenergetyczny” efekt wykorzystania nowego podejścia eksperymentalnego oraz innego myślenia spowodował nagromadzenie fascynujących, nie tylko biologów, informacji o architekturze cząsteczek biologicznych w szczególności białek i kwasów nukleinowych i ich podstawowej roli w procesach komórkowych. Wymienić tutaj można kilka z nich jak transport przez membrany, oddziaływanie ligand-receptor, tworzenie przeciwciał, organizację chromosomów, transkrypcja i dojrzewanie RNA, synteza polipeptydów, przemiany energii. Zagadnienia te, podstawowe dla zrozumienia struktury i funkcji komórki, są w przemyślany i stosunkowo prosty sposób przedstawione w książce Darnella, Lodisha i Baltimora. Składa się ona z 25 rozdziałów podzielonych na 4 grupy tematyczne: 1. Introduction: Molecules, Cells and Experimental Techniques; 2. Gene Expression, Structure and Replication; 3. Cell Structure and Function; 4. Normal and Abnormal Variations in Cells.

Jest ona bardzo podobna co do treści, formy i szaty graficznej do innego opracowania z 1983 r. „Molecular Biology of the Cell” napisanego przez zespół amerykańsko-angielski z J. Watsonem na czele. Obecność D. Baltimora, laureata Nagrody Nobla z 1975 r., w składzie autorów wydaje się być wystarczająco zachęcającym powodem do przeczytania z zapartym tchem rozdziału o raku — ale nie tylko. Inne rozdziały, szczególnie ten o dojrzewaniu RNA zawiera oprócz stanu wiedzy na dzień dzisiejszy, także interesujące spojrzenie historyczne. Czytanie tego i podobnych fragmentów może być intelektualną przygodą pokazującą jak historycznie zagadnienie się rozwijało, w jaki sposób logicznie układały się pewne obserwacje prowadząc do zdumiewających uogólnień, dzisiaj już uznanych faktów.

Pewne wątplenie budzi wymienienie glukozy, a nie fosforanu glicerylaldehydu jako prawdziwego produktu cyklu Calvina. Trzeba przyznać jednak, że tę niespójność można znaleźć także w wielu innych podręcznikach.

Wydaje mi się, że obie książki: „Molecular Biology of the Cell” (B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson), Garland Publ. Inc. 1983 oraz charakteryzowany tutaj podręcznik są niezwykle interesującymi i cennymi opracowaniami i powinny być w zasięgu wszystkich biologów, biochemików, chemików oraz przedstawicieli dziedzin pokrewnych. Łączą one bowiem w sposób przejrzysty biologię molekularną i biochemię oraz biologię komórki i genetykę. Mając tak przygotowany grunt łatwiej rozważać problemy rozwoju, immunologii czy nowotworów.

Oprócz zawartości merytorycznej na uwagę zasługuje forma prezentacji olbrzymiego materiału. Używanie kolorów oraz podtytułów ułatwia systematyzowanie in-

formacji oraz kształtuje przestrzenne rozumienie zachodzących procesów komórkowych. Naprawdę warto podjąć wysiłki mające na celu nabycie tych podręczników jeśli nie prywatnie, to dla bibliotek instytutowych. W Zakładzie, w którym pracuję obie pozycje są dostępne. Warto zastanowić się, aby co najmniej jedna z tych książek ukazała się w polskim przekładzie na naszym rynku.

Jan Barciszewski

Hans-Peter Kleber i Dieter Schlee — „Biochemie I: Allgemeine und funktionelle Biochemie”

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1987
501 stron, 192 ryciny, 32 tabele

Jest to dobry, w pełni nowoczesny podręcznik biochemii ogólnej adresowany przede wszystkim do studentów biologii chociaż z pewnością może być cenną pomocą dydaktyczną także dla studentów medycyny, farmacji, weterynarii i kierunków rolniczych. Mimo stosunkowo skromnej objętości (ok. 500 stron zmniejszonego formatu) autorom udało się przedstawić podstawy biochemii w sposób przejrzysty, atrakcyjny i zgodny z aktualnym stanem wiedzy. Niemała w tym zasługa właściwego wyważenia objętości poszczególnych rozdziałów i starannej selekcji podawanych informacji.

W układzie książki zwraca uwagę, jako rozwiązanie dość rzadko stosowane, dokonanie w rozdziale I („Wprowadzenie”), po zwięzłym określeniu obszarów zainteresowań biochemii i jej powiązań z innymi dyscyplinami, krótkiego przeglądu podstawowych metod badania metabolizmu z wyróżnieniem technik pozwalających na śledzenie przemiany materii w całych organizmach, w izolowanych organach, tkankach i komórkach oraz na poziomie subkomórkowym i molekularnym. Choć siłą rzeczy przegląd ten jest dość ogólny daje jednak czytelnikowi pewne wyobrażenie o różnorodności, wyrafinowaniu i precyzji metod stosowanych we współczesnej biochemii. Obszerny rozdział II („Struktura i funkcje biomolekuł”) omawia kolejno budowę, właściwości i podstawowe funkcje biologiczne cukrów, białek, kwasów nukleinowych i lipidów. Rozdział ten zawiera również podstawowe informacje o enzymach i katalizie enzymatycznej oraz krótko lecz treściwie i nowocześnie ujęte omówienie budowy i funkcji błon biologicznych. Kolejny rozdział „Katabolizm i powstawanie związków wysokoenergetycznych” przedstawia podstawy bioenergetyki, główne szlaki katabolizmu cukrów, lipidów, białek i aminokwasów oraz procesy wiodące do syntezy ATP. Rozdział IV („Szlaki anaboliczne”) omawia drogi biosyntezy różnych składników komórki, przy czym duży nacisk położono na przestrzenne rozmieszczenie różnych procesów biosyntezy w komórce i powiązania pomiędzy poszczególnymi szlakami metabolicznymi. W kolejnym rozdziale „Biochemia kwasów nukleinowych — replikacja, ekspresja genów” zwraca uwagę dość szerokie potraktowanie mechanizmów regulacji ekspresji genów u Prokaryota i Eukaryota, uwzględniające również osiągnięcia ostatnich lat. Ostatni rozdział „Regulacja i integracja metabolizmu” zasługuje na szczególne wyróżnienie ze względu na wyjątkowo przejrzyste i przemawiające do wyobraźni czytelnika przedstawienie różnorodnych mechanizmów regulowania metabolizmu komórki. Wielu omawianych tu zagadnień próżno by szukać w dostępnych na rynku księgarskim podręcznikach biochemii — jako przykład wymienić tu można choćby informacje o roli ubikwityny w degradacji białek.

Od strony redakcyjnej podręcznik został przygotowany bardzo starannie. Śledzenie tekstu ogromnie ułatwiają doskonale dobrane i graficznie opracowane, w dużej

części dwubarwne schematy i rysunki. Książka zaopatrzona jest w obszerny, zawierający ponad 2000 haseł indeks rzeczowy, tablicę przedstawiającą chronologicznie kilkadziesiąt najważniejszych dla rozwoju biochemii odkryć oraz liczący kilkadziesiąt pozycji wykaz piśmiennictwa (głównie artykuły monograficzne) pomyślany jako literatura uzupełniająca. Szkoda, iż autorzy nie powołują się na odpowiednie pozycje tego wykazu bezpośrednio w tekście lub na końcu kolejnych rozdziałów co ułatwiłoby czytelnikowi znalezienie interesującego go artykułu.

Być może u czytelników zainteresowanych szczególnie biochemią roślin, mikroorganizmów lub biochemią kliniczną lektura „Biochemie I” Klebera i Schlee pozostawi pewien niedosyt ze względu na bardzo skromne potraktowanie zagadnień należących do tych działów biochemii. Wydawca zapowiada jednak ukazanie się jeszcze w bieżącym roku drugiej części, opracowanej przez tych samych autorów, pt. „Biochemie II: Spezialle und angewandte Biochemie”, która ma szerzej uwzględnić m.in. wymienione działy biochemii a także niektóre aspekty wykorzystania osiągnięć biochemii w medycynie, rolnictwie i biotechnologii.

W sumie „Biochemie I” jest wartościowym podręcznikiem, gruntownie i nowocześnie prezentującym podstawy biochemii i nie ustępującym wielu renomowanym podręcznikom, które ukazały się ostatnio na świecie. Warto by rozważyć jego ewentualne udostępnienie czytelnikom polskim. Fakt, iż wydawcą jest firma z NRD ułatwi, być może, pertraktacje w sprawie wydania książki w Polsce i umożliwi pojawienie się polskiej wersji w księgarniach w czasie znacznie krótszym, niż to miało miejsce w przypadku polskich tłumaczeń podręczników biochemii opracowanych na Zachodzie — na przykład „Biochemii” A. Lehningera lub „Biochemii” L. Stryera.

Zdzisław Wojciechowski

SPRAWOZDANIE

Krajowe kolokwium n.t. kwasów rybonukleinowych — Zielonka 87

W dniach 12 i 13 marca 1987 w Leśnym Zakładzie Doświadczalnym Poznańskiej Akademii Rolniczej w Zielonce k/Poznania odbyło się Krajowe Kolokwium Kwasów Rybonukleinowych. Organizatorem spotkania był Zakład Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Po czteroletniej przerwie udało się ponownie zebrać w Poznańskim Ośrodku Naukowym ponad 100 reprezentantów prawie wszystkich krajowych grup badawczych zajmujących się kwasami nukleinowymi. Była to dziesiąta z kolei konferencja o tej tematyce. Przypomnijmy tematykę, organizatora i miejsce poprzednich konferencji organizowanych w Ośrodku Poznańskim.

1. Synteza, struktura i własności transferowych kwasów rybonukleinowych, M. Wiewiórowski, Zielonka k/Poznania 1971.
2. Synteza, struktura i własności transferowych kwasów rybonukleinowych, M. Wiewiórowski, Poznań, 1972.
3. Synteza, struktura i własności transferowych kwasów rybonukleinowych, M. Wiewiórowski, Boszkowo k/Poznania 1973.
4. Recent Developments in Oligonucleotide Synthesis and Chemistry of Minor Bases of tRNA, M. Wiewiórowski, Kiekrz k/Poznania 1974.
5. Synthesis, Structure and Chemistry of Transfer Ribonucleic Acids and their Components, M. Wiewiórowski, Dymaczewo k/Poznania 1976.
6. Translation of Natural and Synthetic Polynucleotides, A. Legocki, Błaziejewko k/Poznania 1977.
7. Biological Implications of Protein—Nucleic Acid Interactions, J. Augustyniak, Dymaczewo k/Poznania 1980.
8. Struktura i właściwości kwasów nukleinowych, M. Wiewiórowski, Poznań, 1982.
9. Struktura i właściwości kwasów nukleinowych i białek, M. Wiewiórowski, Poznań 1983.

Jak widać choćby z nazw konferencji niektóre z nich miały charakter międzynarodowy, a w dwóch ostatnich o zasięgu krajowym, brali udział goście zagraniczni. Materiały konferencji 1-7 zostały opublikowane. W 1984 r. odbyło się w Poznaniu Międzynarodowe Sympozjum Chemii Produktów Naturalnych IUPAC, które również obejmowało tematykę kwasów nukleinowych. Organizatorami obecnej konferencji byli: R. W. Adamiak, J. Barciszewski, W. Krzyżosiak i W. T. Markiewicz, a więc osoby, których zainteresowanie kwasami nukleinowymi stymulowała atmosfera wcześniejszych spotkań. O tym wszystkim powiedział w swoim zagajeniu M. Wiewiórowski, Kierownik Zakładu Chemii Bioorganicznej PAN, faktyczny inicjator wspomnianego cyklu spotkań naukowych, które można nazwać również Szkołą n.t. Kwasów Nukleinowych, dedykowanych głównie kwasom rybonukleinowym. Obecną konferencję rozpoczęto od przedstawienia współczesnych problemów chemii RNA. Stan wiedzy o lewoskrętnej formie RNA o tzw. „Z-RNA” przedstawił R. W. Adamiak. Oczywiście było zainteresowanie słuchaczy właściwościami biologicznymi nowej formy RNA, chociaż nie ma dotychczas bezpośrednich dowodów wskazujących na celowość tej struktury *in vivo*. Problem jest interesujący i z pewnością jego rozwiązanie dostarczy interesujących danych na temat różnic strukturalnych DNA i RNA. W. T. Markiewicz mówił o obecnych osiągnięciach w syntezie oligorybonukleotydów. Pytaniem, które wszystkich tutaj nurtuje jest maksymalna możliwa długość syntetycznego RNA. Oczywiście interesująca jest również, a może przede wszystkim chemia takich układów. W. Krzyżosiak dyskutował o fagowych systemach transkrypcji

opartych o RNA polimerazy fagów T7 i SP6. Można było się przekonać jak stosunkowo prosto i łatwo daje się otrzymać nawet miligramowe ilości tRNA lub rRNA in vitro oraz jak wykorzystać tę metodę do ukierunkowanej mutagenyzy. Kolejnym szeroko dyskutowanym tematem były transferowe kwasy rybonukleinowe. W ramach wystąpienia J. Barciszewskiego usłyszeliśmy krótkie podsumowanie różnych właściwości biologicznych tRNA, od biosyntezy białka począwszy poprzez syntezę ścian komórkowych aż po syntezę chlorofilu. Obecnie znanych jest około 400 sekwencji tRNA oraz prawie tyle samo genów. Z roślin wyodrębniono 36 tRNA z czego większość dotyczy nasion łubinu żółtego i zarodków pszenicy. J. Barciszewski omówił szczegółowo udział roślinnych tRNA tytoniu, zarodków pszenicy i łubinu żółtego w supresji kodonu UAG (amber) występujących w RNA wirusa mozaiki tytoniu. Interesujące jest jaki aminokwas włączony jest do peptydu w miejscu kodonu terminującego oraz jaki jest wpływ otoczenia kodonu terminującego na jego odczytanie (A. Legocki). Temat supresji został bardzo ładnie rozwinięty przez W. Zagórskiego, który zajął się supresją informacyjną kodonów nonsensownych, głównie ochre w mitochondriach drożdży. O jądrowych genach tRNA roślin mówili: J. Augustyniak i W. Kędziński. Wydaje się, że w najbliższym czasie uda się określić strukturę genów tRNA z pszenicy i łubinu, jako, że odpowiednie klony udało się wyselekcjonować.

H. Augustyniak omówiła organellowe tRNA akcentując szczególnie geny mitochondrialnych tRNA. Obecni mogli się przekonać jak trudny jest to obiekt badawczy. Mimo wszystko w ostatnich latach określono sekwencję kilku genów tRNA w tym również z łubinu. K. L. Wierzchowski przeniósł uczestników konferencji w dziedzinę badań kinetycznych procesu inicjacji transkrypcji u prokariota, a A. Joachimiak omawiał oddziaływanie kwas nukleinowy—białko na przykładzie układu represor—operator tryptofanowy. Bliskie wydaje się rozwiązanie pełnej struktury kryształów kompleksu DNA białko i zrozumienie molekularnych podstaw ekspresji genów. Zdaniem D. Shugara niezwykle ciekawe doświadczenia prowadzone są w zakresie polifosforanów dwunukleozydów, często nazywanych cząsteczkami sygnałowymi lub alarmonami. Najbardziej znanymi związkami w tej grupie są Ap₄A oraz modyfikowany koniec 3' niektórych mRNA tzw. CAP. Obecność Ap₄A wiąże się obecnie z wieloma procesami biologicznymi np. szok termiczny itp. Niezwykle ciekawe są również enzymy powodujące hydrolizę. Problem ten jest również intensywnie badany w Polsce.

B. Golankiewicz podsumowała dotychczasową wiedzę w dziedzinie badań fluoryzujących zasad i nukleozydów typu Y wyodrębnionych z tRNA^{Phe}. Szczególnie ciekawe informacje dotyczyły biosyntezy tego nukleozydu. H. Lönnberg (Finlandia) mówił o stabilności rybonukleozydów w środowisku alkalicznym.

A. Małkiewicz skoncentrował swoją i słuchaczy uwagę na hipermodyfikowanych pochodnych urydyny obecnych w antykodonie tRNA w tzw. pozycji wobble. Mają one istotne znaczenie w procesie dekodowania informacji genetycznej. Pokazał również, że synteza pochodnych U nie jest trudnym eksperymentem, przynajmniej dla specjalistów.

Bardzo skomplikowane i trudne do badania są oddziaływania cząsteczek tRNA znajdujących się na rybosomie. P. Górnicki pokazał, że wykorzystanie różnego typu modyfikacji chemicznych pozwoliło przybliżyć nasze wyobrażenia o topografii kompleksu translacyjnego. Interesujące było wystąpienie T. Twardowskiego omawiające wpływ alkaloidów chonolizydynowych występujących w łubinie na tworzenie kompleksów czynnika elongacyjnego EPI oraz aminoacylo-tRNA.

Interesująco przebiegała ogólna dyskusja na temat perspektyw badań nad RNA. Mówiono o doświadczeniach wykazujących transport kwasów nukleinowych między organellami (np. 5.8 S RNA), o możliwościach wprowadzania liposomów do mitochondriów. Starano się zrozumieć czy Z-RNA istnieje rzeczywiście i jak go szukać.

Nie pominięto niskocząsteczkowych jądrowych RNA, a także niskocząsteczkowych cytoplazmatycznych RNA. Wspomniano o konieczności badań oddziaływań kwas rybonukleinowy—białko, a także samych RNA np. 5S rRNA, o którego funkcji wiemy niezwykle mało. Wspomniano o istotności dokładnego śledzenia wpływu kationów i anionów na strukturę makrocząsteczki. Na konferencji omawiano nowe zagadnienia związane głównie z RNA. Najwięcej jednak uwagi poświęcono tRNA, modyfikowanym nukleozydom oraz zagadnieniom bezpośrednio z tRNA związanym. Przygotowując konferencję, organizatorzy mieli świadomość, że w roku 1987 mija właśnie 30 lat od czasu odkrycia tego rodzaju RNA przez Zamecnika. Chciano w ten sposób dać wyraz swemu przywiązaniu do tego zagadnienia i skromnie podkreślić ten jubileusz w biologii molekularnej.

Przy okazji jubileuszu należy podkreślić, że to właśnie tRNA jest rodzajem RNA, dla którego dobrze znane są metody określania właściwości biologicznych; jako pierwszy otrzymano w stanie krystalicznym oraz rozwiązano strukturę przestrzenną kryształu. Mimo, że obecnie znacznie częściej prowadzone są badania w dziedzinie DNA, tRNA nie zniknie najprawdopodobniej z mapy naukowej świata i kraju.

Na zakończenie jeszcze jedna refleksja. Otóż wszystkie referaty oparte były o własne doświadczenia. Ten fakt zdecydowanie wyróżniał tę konferencję od pozostałych. Nigdy też dotychczas we wspomnianym cyklu spotkań naukowych nie notowaliśmy tak dużego zainteresowania ludzi młodych. Można było zauważyć przekonanie, że biologia molekularna jest tak atrakcyjną dziedziną wiedzy, iż mimo dużych trudności zaopatrzeniowo-finansowych oraz literaturowych w naszym kraju, będzie się rozwijać.

Sądzić należy, że czas spędzony na konferencji nie był stracony oraz nie były to zwyczajne, szare dni.

Kolejna konferencja z tego cyklu odbędzie się prawdopodobnie w następnym roku.

Jan Barciszewski

The first of these is the fact that the United States is a young nation, and its history is therefore a history of growth and development. It is a history of a people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony.

The second is the fact that the United States is a nation of immigrants. It is a nation of people who have come from many different parts of the world, and who have brought with them their own customs, languages, and religions. This has made the United States a melting pot of different cultures, and has helped to create a unique American identity.

The third is the fact that the United States is a nation of pioneers. It is a nation of people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony. It is a nation of people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony.

The fourth is the fact that the United States is a nation of freedom. It is a nation of people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony. It is a nation of people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony.

The fifth is the fact that the United States is a nation of opportunity. It is a nation of people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony. It is a nation of people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony.

The sixth is the fact that the United States is a nation of progress. It is a nation of people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony. It is a nation of people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony.

The seventh is the fact that the United States is a nation of peace. It is a nation of people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony. It is a nation of people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony.

The eighth is the fact that the United States is a nation of justice. It is a nation of people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony. It is a nation of people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony.

The ninth is the fact that the United States is a nation of hope. It is a nation of people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony. It is a nation of people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony.

The tenth is the fact that the United States is a nation of love. It is a nation of people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony. It is a nation of people who have been able to overcome many difficulties and to build a great nation out of a small colony.

CONTENTS:

Professor Maria Gabriela Sarzała-Drabikowska — Obituary 395

Articles:

M. Jung, W. Zagórski — Genome of HIV (HTLV-III, LAV) — human immunodeficiency virus (Department of Protein Biosynthesis, Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warszawa). 399

L. Kaczmarek — Genetic control of the cell cycle stimulation (Department of Neurophysiology, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warsaw). 425

K. Jagła, J. Domaniewski — Transforming genes as detected by transfection (Department of Pathology, Medical Academy of Bydgoszcz, Bydgoszcz). 433

R. Słomski, E. Ziętkiewicz — DNA recombination techniques in human genetics (Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznań). 451

M. Z. Barciszewska, J. Barciszewski — Eukaryotic transfer ribonucleic acids with suppressor activity (Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznań). 473

G. Plaza — M13 phages in cloning and sequencing of DNA (Department of Tumor Biology, Institute of Oncology, Gliwice). 489

Z. Pietrzkowski — Cytoskeleton and mitogenic action of growth factors (Department of Cell Biology, Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Kraków). 501

J. A. Czyrski, B. Narczewska — PDGF — platelet-derived growth factor (Laboratory of Tumor Virology, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław). 515

B. Rzeszutarska, Z. Kubica, J. Tarnawski — On the influence of α , β -dehydro-amino acid residues on peptide biological activity (Institute of Chemistry, Pedagogical University, Opole). 533

A. M. Konecka — Adrenal opioid peptides (Institute of Genetics and Animal Breeding, Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec). 561

M. Wilk — Enkephalins hydrolysing enzymes and their role in metabolism of enkephalins (Department of Hormonal Medicaments, Institute for Drug Research and Control, Warsaw). 583

J. Kordowska, A. Jakubiec-Puka — High-molecular-weight proteases of animal tissues (Laboratory of Protein Metabolism, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warsaw). 599

R. Jasińska, J. Zborowski — The phospholipid base — exchange enzymes (Department of Cellular Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warsaw). 605

L. Kleczkowski — Rubisco „activase” and carboxyarabinitol phosphate — keys to photosynthesis (Department of Plant Physiology, Institute of Plant Biology, Agricultural University, Warsaw). 629

Nomenclature

Nucleic acid nomenclature — transl. G. Jagura-Burdzy 633

Book reviews

Molecular Cell Biology (J. Barciszewski) 645
 Biochemie I: Allgemeine und funktionelle Biochemie (Z. Wojciechowski) 646

Reports

J. Barciszewski — Reports on the National Colloquium on nucleic on nucleic acids — Zielonka 87. 649

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły monograficzne omawiające wąskie tematy, oraz artykuły przeglądowe referujące szersze zagadnienia z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły pierwszego typu winny w sposób syntetyczny omawiać wybrany temat na podstawie możliwie pełnego piśmiennictwa z kilku ostatnich lat, a artykuły drugiego typu na podstawie piśmiennictwa z ostatnich dwóch lat. Objętość takich artykułów nie powinna przekraczać 20 stron maszynopisu (nie licząc ilustracji i piśmiennictwa). Kwartalnik publikuje także artykuły typu *minireviews*, do 10 stron maszynopisu, z dziedziny zainteresowań autora, opracowane na podstawie najnowszego piśmiennictwa, wystarczającego dla zilustrowania problemu. Ponadto kwartalnik publikuje krótkie noty, do 5 stron maszynopisu, informujące o nowych interesujących osiągnięciach biochemii i nauk pokrewnych, oraz noty przybliżające historię badań w zakresie różnych dziedzin biochemii. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innych czasopismach, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska: poprawki wynikające z błędów drukarni наносimy ołówkiem; niezbędne zmiany autorskie наносimy niebieskim atramentem. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują 25 odbitek swego artykułu.

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

Forma maszynopisu: maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm po lewej i ok. 1 cm po prawej stronie; nie może zawierać więcej niż 60 znaków w jednym wierszu nie więcej niż 30 wierszy na stronie zgodnie z Normą Polska.

Układ maszynopisu: strona okładowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy, na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, adres prywatny, telefon miejsca pracy, tytuł artykułu (w języku polskim i angielskim) oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę stron, liczbę rycin, wzorów i tabel oraz skrót tytułu (nie więcej niż 25 znaków drukarskich).

Strona tytułowa (1) imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści w języku polskim i angielskim, tytuł naukowy autora(ów) i, jego (ich) miejsce(a) pracy, oraz wykaz skrótów stosowanych w pracy.

Strona 2 i następne obejmują tekst pracy do spisu piśmiennictwa włącznie, tabele, spis rycin, wzorów oraz tytuły i objaśnienia do rycin na stronach końcowych.

Dla przejrzystości tekstu obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły informować rzeczowo winny o przedstawionych treściach. Rzeczowy spis treści publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I-1). Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1, Wzór I itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku, np. kwas glutaminowy (I).

Redakcja prosi autorów o zwrócenie szczególnej uwagi na poprawność językową tekstu a także na ścisłość i jasność sformułowań, unikanie gwary laboratoryjnej oraz o niewprowadzanie do tekstu tworzonych doraźnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzania poprawek nie wpływających na treść pracy.

Piśmiennictwo: w artykule należy cytować prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiające przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawionej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem obejmuje prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nie uporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta* (1972), 271, 1 np.

Pispa J. P., Buchanan F. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, 247, 181–184.

Cytując wydawnictwa książkowe podawać należy kolejno: nazwisko(a) i inicjały autora(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stronę cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydania, np.

Dixon M., Weeb E. C., (1964), *Enzymes*, 2 wyd., str. 565, Longmans Green and Co., London;

Grant J. K., (1969) w *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P. N., Greville G. D., t. 5, str. 1–58; Academic Press, London.

Załączniki: każdy załącznik należy sporządzić w 2 egz. na oddzielnych kartkach i opatrzyć kolejnym numerem odpowiadającym numerowi użytemu w tekście oraz oznaczyć (na górze strony ołówkiem) nazwiskiem pierwszego autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuły tabel i nagłówki rubryk powinny jasno opisywać ich treść, zaznaczając, z jakich (jakiej) pracy) pochodzą informacje podane w tabeli.

Ryciny, tj. wykresy, rysunki, schematy lub fotografie należy opatrzyć numeracją w kolejności ich omówienia w tekście. Przyjmuje się zasadę numeracji rycin cyframi arabskimi, a wzorów cyframi rzymskimi. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub na kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10×15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki ujmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz postuluje się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmie wydawca.

Podpisy i objaśnienia pod rycinami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można wpisać na maszynie, należy wyraźnie nanieść czarnym tuszem.

Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu zaleca się autorom konstruowanie oryginalnych rysunków i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa. Prawie wszystkie czasopisma zastrzegają sobie wyłączność druku prac wraz z ich dokumentacją (*Copyright*). Przed włączeniem tabel, wykresów czy schematów do artykułu przeznaczonego do publikacji w *Postęпах Biochemii* należy uzyskać zgodę na przedruk i przedłożyć ją Redakcji.

Redakcja prosi o właściwe pakowanie artykułów, aby zabezpieczyć maszynopis i ilustracje przed pogięciem.

SPIS TREŚCI

Profesor Maria Sarzała-Drabikowska — wspomnienie	395
Artykuły:	
M. Jung, W. Zagórski — Genom HIV (HTLV-III, LAV) ludzkiego wirusa braku odporności immunologicznej.	399
L. Kaczmarek — Genetyczna kontrola pobudzenia cyklu komórkowego.	425
K. Jagła, J. Domaniewski — Geny transformujące wykrywane metodą transfekcji.	433
R. Słomski, E. Ziętkiewicz — Zastosowanie technik rekombinacji DNA w genetyce człowieka.	451
M. Z. Barciszewska, J. Barciszewski — Eukariotyczne transferowe kwasy rybonukleinowe o właściwościach supresorowych.	473
G. Płaza — Zastosowanie fagów M13 w klonowaniu i sekwencjonowaniu DNA.	489
Z. Pietrzykowski — Cytoszkielecik a mitogenne działanie czynników wzrostowych.	501
J. A. Czyrski, B. Narczewska — PDGF — czynnik wzrostowy z płytek krwi.	515
B. Rzeszotarska, Z. Kubica, J. Tarnawski — O wpływie reszt α , β -dehydroaminokwasowych na aktywność biologiczną peptydów.	533
A. M. Konecka — Peptydy opioidowe nadnerczy.	561
M. Wilk — Enzymy rozkładające enkefalinę i ich rola w metabolizmie enkefalin.	581
J. Kordowska, A. Jakubiec-Puka — Wielkocząsteczkowe proteazy tkanek zwierzęcych.	599
R. Jasińska, J. Zborowski — Enzymy wymieniające zasady fosfolipidów.	605
L. Kleczkowski — „Aktywaza” karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-difosforanu i fosforanu karboksylarabitolu — klucze do zrozumienia mechanizmu regulacji fotosyntezy.	629
Słownictwo Biochemiczne	
Zalecenia Komisji Słownictwa: Słownictwo kwasów nukleinowych, tłum. G. Jagura-Burdzy.	633
Recenzje książek	
Molecular Cell Biology (J. Barciszewski).	645
Biochemie I: Allgemeine und funktionelle Biochemie (Z. Wojciechowski)	646
Sprawozdania	
J. Barciszewski — Krajowe kolokwium n.t. kwasów nukleinowych — Zielonka 87.	649