

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 40, NR 4, 1994

Powstawanie i naprawa uszkodzeń DNA	194
Replikacja DNA u <i>E. coli</i>	200
Zastosowanie badań genu <i>p53</i>	211
Receptor estrogenowy	222
Receptor ekdyteroidowy	230
Transkrypcja genu cytochromu <i>p450_{scc}</i>	240
Cytochromy P450	248

Biospecyficzne czyste
i dokładnie oznaczone
ULTRAPURE BIOREAGENTS



Wysoka i starannie oznaczona czystość, bez zanieczyszczeń aktywnych biologicznie – to szczególna cecha ULTRAPURE BIOREAGENTS. Stosując je w badaniach molekularno-biologicznych ogranicza się zakłócający wpływ zanieczyszczeń wprowadzanych z odczynnikami i w ten sposób unika się powtarzania oznaczeń. Równocześnie znacznie ułatwione jest wykrywanie możliwych błędów doświadczalnych, a wyniki pomiarów zyskują na precyzji. ULTRAPURE BIOREAGENTS posiadają dokładnie oznaczone wszystkie cechy ich aktywności biologicznej. Jednoznacznym dowodem ich jakości jest świadectwo analizy widniejące na etykiecie każdego opakowania.

Program i bezpłatne broszury: S. WITKO-EUROCOLOR, skr. poczt. 46, 90-980 Łódź-7, Tel./Fax (042) 84 46 09, 81 31 39, 81 31 40

HPLC bez zakłóceń
przy niezmiennie
wysokiej czystości



Optimal

11 **Acetonitryl** 9017
do wysokosprawnej chromatografii cieczowej M. cz. 41,1
ULTRA GRADIENT
„BAKER ANALYZED”® HPLC Reagent

CH₃CN

ORYGINALNA ANALIZA SERII: LOT G38275 100.0%

Zawartość CH₃CN oznaczona metodą GC 0.02

Absorbancja w UV (w odniesieniu do wody, w kuwecie 1,00 cm)

przy 200 nm 0.006

przy 220 nm < 0.002

przy 254 nm < 0.002

przy 280 nm 189 nm

Zanik przezroczystości w UV śladowych, mierzona jako zasada

Fluorescencja zanieczyszczeń chinonowa: 0.02 ppb

przy emisji 450 nm 0.1 ppb

przy max. emisji dla zanieczyszczeń rozpuszczalnikowych 0.0002

Kwasy dające się zmiareczkować (meo/g) 0.00001

Zasady dające się zmiareczkować (meo/g) 0.1 ppm

Pozostałość po odparowaniu 0.001%

Zawartość wody (oznaczona kulometrycznie) 1.344

Współczynnik załamania światła, η_D²⁰ 0.0005

Test elucji gradientowej (a.u.) < 0.001

przy 210 nm 0.65

przy 254 nm 0.786

Dane izochemiczne: 6.2

Wartość dielektryczna (na Al₂O₃) 6

Gęstość (g/ml) w 20°C 6

Polarność (1)

Grupa rozpuszczalnikowa (1)

(1) Snyder, L.R., J. Chromatography, 92, 223-230 (1974)

Rozpuszczalnik został specjalnie oczyszczony w procesie wielostopowym zawierającym destylację w całkowitej szklanej aparaturze i ultrafiltrację (PPT). Pakowany pod azotem.

Wysoka gwarantowana czystość i świadectwo analizy widniejące na etykiecie każdego opakowania – to podwójny dowód jakości naszego produktu.

Stosując rozpuszczalniki do HPLC „Baker Analyzed” – mamy pewność, że wynik analizy próbki będzie prawdziwy, a nie zniekształcony zanieczyszczeniami wprowadzonymi przez użyty rozpuszczalnik. Na tym można polegać!

S. WITKO – EUROCOLOR, skr. poczt. 46, 90-980 Łódź-7, Tel./Fax (042) 84 46 09

**Kwartalnik „Postępy Biochemii”
wydawany z pomocą finansową
Komitetu Badań Naukowych**

<http://rcin.org.pl>

WYDAWCA

Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
Poland

Drukarnia Naukowo-Techniczna
Mińska 65
03-828 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board
REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 31-24-03

REDAKTORZY

Editors
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 659-70-72 w. 1217
ANNA SZAKIEL
tel. 23-20-46
JOLANTA GRZYBOWSKA
tel. 13-05-15

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
ZYGMUNT CIEŚLA
(Warszawa)
JERZY DUSZYŃSKI
(Warszawa)
BARBARA
GRZELAKOWSKA-SZTABERT
(Warszawa)
CELINA JANION
(Warszawa)
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
(Warszawa)
ANDRZEJ KUTNER
(Warszawa)
ZOFIA LASOTA
(Warszawa)
ANNA WOJTCZAK
(Warszawa)

ADRES REDAKCJI

Address
REDAKCJA KWARTALNIKA
„POSTĘPY BIOCHEMII”
INSTYTUT BIOLOGII
DOŚWIADCZALNEJ
im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
tel (2) 659-85-71 w. 332
fax: (22) 22-53-42
telex: 81-48-92

SPIS TREŚCI CONTENTS

Specyfika powstawania i naprawy mutagennych uszkodzeń materiału genetycznego Site-specific formation and removal of mutagenic DNA damages PIOTR WIDŁAK	194
Enzymologia replikacji DNA <i>Escherichia coli</i> Enzymology of <i>Escherichia coli</i> DNA replication JAROSŁAW MARSZAŁEK	200
Perspektywy praktycznego zastosowania badań nad genem <i>p53</i> Perspectives of practical application of <i>p53</i> studies BEATA SCHLICHTHOLZ, THIERRY SOUSSI	211
Receptor estrogenowy: budowa i funkcja w normalnej i neoplastycznej tkance Estrogen receptor: structure and function in normal and neoplastic tissue ELŻBIETA KULIG	222
Receptor ekdysteroidowy <i>Drosophila melanogaster</i> — jeden z czynników transkrypcyjnych kontrolujących metamorfozę Ecdysteroid receptor from <i>Drosophila melanogaster</i> — one of the transcription factors controlling metamorphosis ANDRZEJ OZYHAR	230
Udział transkrypcji genu cytochromu P450_{scc} w regulacji syntezy hormonów sterydowych w korze nadnerczy The contribution of cytochrome P450 _{scc} gene transcription in the regulation of steroid hormone synthesis in the adrenal cortex DARIUSZ KMIECIAK, WIESŁAW H. TRZECIAK	240
Formy molekularne cytochromu P—450 wątroby szczura Molecular forms of cytochrome P—450 in rat liver KAMILA KOBYLINSKA	248
Roczny spis treści i indeks autorów	253
Komunikat Kolegium Medycyny Laboratoryjnej w Polsce	256
Sprawozdanie z XXX Zjazdu	258

Specyfika powstawania i naprawy mutagennych uszkodzeń materiału genetycznego

Site-specific formation and removal of mutagenic DNA damages

PIOTR WIDŁAK*

Spis treści:

- I. Powstawanie mutacji
- II. Czynniki określające podatność DNA na uszkodzenia
- III. Czynniki modyfikujące tempo naprawy DNA
- IV. Związek między naprawą DNA i mutagenezą

Wykaz stosowanych skrótów: AF — 2-aminofluoren; AAF — 2-acetyloaminofluoren; AAFAF — N-acetoksy-2-acetyloaminofluoren; AFB₁ — aflatoksyna B₁; B(a)P — benzo(a)pyren; BPDE — diolepoksyd benzo(a)pyrenu; BcPHDE — diolepoksyd benzo(c)fenantrenu; BAA — aldehyd bromooctowy; CAA — aldehyd chlorooctowy; DMN — N-dwumetyloN-nitrozamina; ENU — N-etylo-N-nitrozomocznik; MNU — N-metylo-N-nitrozomocznik; GDA — aldehyd epoksypropionowy; *aprt* — transferaza adenino-fosforybozylowa; *hprt* — transferaza hipoksantyno-fosforybozylowa; *dhfr* — reduktaza dwuhydrofolianowa.

I. Powstawanie mutacji

U podstaw procesu ewolucji leży rekombinacyjna i mutacyjna zmienność genetyczna. Zmienność genetyczna jest wynikiem nie tylko mutacji spontanicznych (takich jak: spontaniczna deaminacja metylocytozyny, nieuprawnione parowanie tautomerycznych form cytozyny i tyminy, czy błędy w replikacji DNA), ale również mutacji indukowanych przez fizyczne, chemiczne i biologiczne czynniki środowiskowe. Badając procesy ewolucji obserwuje się zróżnicowanie tempa zmienności genetycznej, nie tylko na poziomie populacji czy grup taksonomicznych, ale również na poziomie pojedynczego genomu. Podręcznikowym przykładem zróżnicowania tempa zmienności genetycznej na poziomie genomu mogą być, z jednej strony geny histonów H4 i H3, a z drugiej geny immunoglobulin

* Dr n. med.; Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, 44-100 Gliwice.

Contents:

- I. Arising of mutations
- II. Factors influencing the susceptibility of DNA to damages
- III. Factors influencing the rate of DNA repair
- IV. Relationship between DNA repair and mutagenesis

i apolipoprotein, które tysiącrotnie różnią się szybkością powstawania niesynonimowych substancji. W obrębie chromatyny obserwuje się występowanie całych regionów materiału genetycznego różniących się szybkością mutowania [1]. Przykładem zróżnicowania tempa procesów mutagenezy, badanych na niższym poziomie organizacji materiału genetycznego, jest obecność tzw. gorących miejsc mutacyjnych (*mutational hot spots*) w specyficznych sekwencjach na przykład onkogenów z rodziny *ras* [2] czy genu supresorowego *p53* [3]. W dużym uproszczeniu można powiedzieć, że tempo powstawania mutacji związane jest z wypadkową szybkości „współzawodniczących” ze sobą procesów: uszkodzania i naprawy materiału genetycznego. Wydaje się więc, że heterogenność procesów mutagenezy musi być związana z heterogennością procesów prowadzących do powstawania i usuwania uszkodzeń materiału genetycznego. Niniejsza praca jest próbą przeglądu wiadomości dotyczących specyfiki powstawania i usuwania uszkodzeń materiału genetycznego, badanej na różnych poziomach jego organizacji. Próbą z konieczności ograniczoną do tylko niektórych rodzajów uszkodzeń i tylko niektórych mechanizmów ich naprawy.

Do niebiologicznych czynników środowiskowych indukujących uszkodzenia materiału genetycznego, oprócz promieniowania jonizującego czy światła ultrafioletowego (UV), należą związki genotoksyczne posiadające zdolność kowalencyjnego wiązania się z DNA i tworzenia tak zwanych „adduktów”. Związki te, z reguły wykazujące właściwości mutagenne i rako-

twórcze, należą do kilku grup, takich jak na przykład: proste związki alkilujące (np. alkilonitrozomoczniki czy alkilonitrozoaminy), policykliczne węglowodory aromatyczne, aminy aromatyczne. O specyfice oddziaływań kancerogenów z materiałem genetycznym decyduje struktura chemiczna zarówno substancji genotoksycznej jak i struktura uszkodzanych nukleotydów (będących składnikiem podwójnego heliksu DNA). W większości przypadków kowalencyjne wiązania chemiczne powstają pomiędzy centrum nukleofilowym w cząsteczce kancerogenu a centrum elektrofilowym na jednym z atomów pierścienia puryny lub pirymidyny (bardzo często jest to atom azotu). Wiadomo, że każda z grup związków genotoksycznych wiąże się wybiórczo ze specyficznym miejscem nukleotydu. I tak na przykład proste związki alkilujące wiążą się głównie z N7 (i słabiej O⁶) guaniny oraz O² i O⁴ tyminy; aminy aromatyczne wiążą się preferencyjnie z C8 i N² guaniny; zaś policykliczne węglowodory aromatyczne z N7 i N² guaniny oraz N⁶ adeniny [przeg. 4]. Uszkodzenia indukowane przez światło UV to cyklobutanowe dimery pirymidynowe i (w mniejszych ilościach) fotoprodukty (6-4)-dipirymidyny, tworzone pomiędzy sąsiadującymi w tej samej nici DNA pierścieniami pirymidynowymi. Powstałe zaś w wyniku działania promieniowania jonizującego rodniki OH powodują pęknięcia wiązań fosfodwuestrowych oraz powstawanie glikolu tyminy. Różne rodzaje uszkodzeń indukowane przez ten sam związek są w różnym stopniu mutagenne i kancerogenne. I tak wydaje się, że alkiloaddukty z tyminą i addukty tworzone przez policykliczne węglowodory aromatyczne z adeniną mogą być bardziej kancerogenne niż addukty tworzone przez te związki z innymi nukleotydami. Uszkodzenia indukowane przez różne czynniki są przyczyną różnych rodzajów mutacji. W przypadku genów transferaz adenino- i hipoksantynofosforybozylowej (*aprt* i *hprt*) stwierdzono, że czynniki takie jak aldehyd octowy, tlenek etylenu i promieniowanie jonizujące indukują powstawanie dużych delecji, promieniowanie UV indukuje głównie tranzycje GC-> AT, addukty indukowane przez proste związki alkilujące tranzycje GC-> AT i AT-> GC, zaś addukty indukowane przez B(a)P transwersje GC-> TA [przeg. 5].

II. Czynniki określające podatność DNA na uszkodzenia

Większość związków genotoksycznych łączy się preferencyjnie z nukleotydem deoksyguanylowym. Jednak z punktu widzenia genetyki i biologii molekularnej istotne jest to, że w obrębie genomu różne nukleotydy deoksyguanylowe (jak i pozostałe nukleotydy) w różnym stopniu podatne są na uszkodzenia i naprawę. Stwierdzono, iż różne sekwencje powtarzające się obecne w genomie szczura kilkunastokrotnie różnią się podatnością na tworzenie adduktów z N-hydroksy-

AAF [6]. Jeszcze większą zmienność w podatności na uszkodzenia wykryto w genie supresorowym *supF tRNA*. Okazało się, że różne miejsca dipirymidynowe w obrębie tego genu kilkudziesięciokrotnie różnią się podatnością na tworzenie fotoproduktów indukowanych przez światło UV [7]. Jednym z czynników determinujących podatność nukleotydu na uszkodzenie jest jego najbliższe sąsiedztwo, czyli sekwencja w jakiej znajduje się dany nukleotyd. Badano reaktywność znajdującego się w różnym kontekście sekwencyjnym nukleotydu deoksyguanylowego na tworzenie adduktów z takimi związkami jak MNU, ENU, B(a)P, AFB₁ czy mitomycyna C. We wszystkich przypadkach stwierdzono, że zarówno nukleotyd występujący od strony 5' jak i od strony 3' nukleotydu deoksyguanylowego ma wpływ na reaktywność guaniny [8-10]. W przypadku uszkodzeń indukowanych przez AFB₁ stymulujący wpływ sąsiedztwa na reaktywność guaniny wyglądał następująco: G > C > A > T od strony 5' i G > T > C > A od strony 3' [11].

Innym czynnikiem, mającym wpływ na reaktywność nukleotydu, jest struktura przestrzenna fragmentu DNA. Jądrowy DNA wykazuje zwykle strukturę prawoskrętnego dwuniciowego heliksu (forma B-DNA). Jednak w obrębie niektórych sekwencji, np. sekwencji bogatych w pary GC czy tzw. sekwencji palindromowych, możliwe jest lokalne przechodzenie struktury B-DNA w lewoskrętną strukturę Z-DNA, trójniciową strukturę H-DNA lub strukturę czteroniciową. Stwierdzono, że niektóre kancerogeny wykazują zdolność wybiórczego uszkodzania nukleotydów w sekwencjach o nietypowej strukturze. Hydroksylamina wiąże się preferencyjnie z cytozynami w sekwencjach pomiędzy dwiema strukturami Z-DNA oraz pomiędzy Z-DNA a B-DNA [12]. Podobnie CAA, GDA i AAAF wiążą się preferencyjnie z nukleotydami w obrębie sekwencji o strukturze innej niż B-DNA, takich jak struktura czteroniciowa czy przejście pomiędzy B-DNA a Z-DNA [13, 14]. Wiadomo również, że addukty indukowane przez takie związki jak AAF i B(a)P mogą być przyczyną lokalnego zaburzenia struktury B-DNA, np. powodując formowanie struktury Z-DNA [15, 16]. Stwierdzono, że utworzenie jednego adduktu ma wpływ na reaktywność sąsiadujących nukleotydów. Mogłoby to być spowodowane zmianami ich nukleofilowości lub lokalnymi zmianami struktury przestrzennej DNA [8].

Większa część jądrowego DNA ma strukturę nukleosomową; można wyróżnić segmenty o długości ok. 200pz, w których *core* DNA „owinięty” jest wokół białkowego rdzenia nukleosomu, a pozostała część (tzw. *linker* DNA) tworzy łącznik pomiędzy nukleosomami. Okazuje się, że różniące się stopniem kondensacji DNA rdzeniowy i łącznikowy różnią się również podatnością na uszkodzenia. Zarówno (6-4)-dipirymidyny indukowane przez promieniowane UV [17], jak addukty tworzone przez BPDE [18] i antybiotyki antracyklinowe [19] powstają w DNA łącznikowym

z większą wydajnością niż w DNA owiniętym wokół rdzenia nukleosomów. Wpływ stopnia upakowania chromatyny na powstawanie uszkodzeń DNA potwierdzają również badania DNA plemników. W jądrach plemników w „upakowywaniu” DNA biorą udział protaminy, co powoduje wyjątkowo silną kondensację ich chromatyny. Wysoki stopień kondensacji chromatyny plemników jest prawdopodobnie przyczyną jej niskiej podatności na uszkodzenia indukowane przez związki chemiczne [przeg. 20].

Większość DNA o słabym stopniu kondensacji, nie mające struktury nukleosomowej i często wykazujące strukturę inną niż B-DNA, to sekwencje regulatorowe wiążące specyficzne białka. Sekwencje takie obecne są w regionach promotorów i sekwencji wzmacniających (*enhancer*) genów aktywnych transkrypcyjnie lub w obrębie miejsc startu replikacji (sekwencje *ori*). Okazuje się, że liczne kancerogeny wiążą się preferencyjnie z takimi właśnie miejscami regulatorowymi. Stwierdzono, że zarówno AAAF [21] i BPDE [18] wybiórczo uszkadzają nukleotydy w okolicy sekwencji *ori* chromosomu wirusa SV40. Również sekwencje znajdujące się po stronie 5' genu β -globiny kurczaka i zawierające elementy regulujące jego transkrypcję są bardziej niż pozostałe części genu podatne na uszkodzenia indukowane przez BAA [22] i BPDE [23]. Z jąder komórkowych można łatwo usunąć niewielką frakcję DNA, silnie podatnego na działanie nukleaz i zawierającego fragmenty genów aktywnych transkrypcyjnie. Stwierdzono, że liczne kancerogeny, takie jak AAF [24], B(a)P [25] czy DMN [26], podawane *in vivo* szczurom, wiążą się preferencyjnie z sekwencjami obecnymi w tej frakcji DNA z jąder hepatocytów. Badania nad specyfiką mutacji indukowanych promieniowaniem UV w genie *hprt* fibroblastów sugerują, że fotoprodukty powstają częściej na nici transkrybowanej [27, 28]. Stwierdzono również, że wiązanie białkowego czynnika transkrypcyjnego może zwiększać częstość powstawania fotouszkodzeń w obrębie sekwencji promotorowych wiążących czynnik transkrypcyjny [29]. Innym czynnikiem zwiększającym podatność DNA na uszkodzenia jest jego replikacja. Stwierdzono, że sekwencje znajdujące się w okolicy widełek replikacyjnych są wybiórczo atakowane przez MNU [30], BPDE [31] i AAAF [32]. Najprawdopodobniej zwiększona podatność DNA aktywnego replikacyjnie i transkrypcyjnie na działanie czynników genotoksycznych związana jest z: (1) jego niskim stopniem kondensacji, (2) obecnością struktur przestrzennych typowych dla aktywnego DNA, (3) brakiem struktury nukleosomalnej lub (4) obecnością zmienionych form nukleosomów [przeg. 33].

Chromatyna jąder interfazowych zorganizowana jest w pętle powstające w wyniku oddziaływania DNA z białkowym szkieletem jądrowym (tzw. macierz jądrowa). Fragmenty pętli DNA związane z macierzą jądrową zawierają sekwencje typu MAR (*matrix attached region*), sekwencje *ori*, część genów aktywnych

transkrypcyjnie i sekwencje regulujące transkrypcję. Z tą strukturą związana jest regulacja procesów replikacji, transkrypcji i różnicowania [przeg. 34]. Wiele danych wskazuje na to, że kancerogeny należące do prostych związków alkilujących [26], policyklicznych węglowodorów aromatycznych [25, 35-37] i amin aromatycznych [38] wiążą się wybiórczo do sekwencji obecnych w macierzy jądrowej.

III. Czynniki modyfikujące tempo naprawy DNA

W jądrze komórkowym funkcjonuje kilka niezależnych systemów naprawy urządzeń DNA. Do mniej skomplikowanych, a jednocześnie rozpoznających tylko niewielką część uszkodzeń, należą: fotolizazy rozszczepiające fotodimery dipiryimidynowe; O⁶-alkiloguanino-DNA-alkilotransferazy usuwające reszty metylowe i etylowe z guaniny; specyficzne DNA-glikozylazy usuwające zmodyfikowane puryny (powstają przy tym miejsca apurynowe, które przy udziale inwertaz mogą być wypełniane bez rozerwania wiązań fosfodwustrowych). Bardziej skomplikowanym systemem, w którym współpracują liczne białka, jest mechanizm naprawy przez wycinanie (*excision repair*). System ten rozpoznaje i naprawia takie uszkodzenia jak miejsca apurynowe, fotoprodukty i addukty indukowane przez liczne związki chemiczne. W uproszczeniu funkcjonuje on tak, że specyficzne białka rozpoznają uszkodzenie i wycinają zawierający uszkodzenie kilku- lub kilkunasto-nukleotydowy fragment jednej nici DNA, uzupełniany następnie przez polimerazę i scalany przez ligazę DNA. Najlepiej poznanym kompleksem enzymatycznym związanym z naprawą przez wycinanie jest UvrABC-nukleaza z komórek *Escherichia coli*. Mechanizmy naprawy DNA chronią komórkę nie tylko przed nieprawidłową transkrypcją i replikacją, ale przede wszystkim przed spowodowanym uszkodzeniem DNA zatrzymaniem procesów transkrypcji czy replikacji (a w konsekwencji śmiercią komórki). Należy przy tym pamiętać że, tak jak w przypadku systemu SOS indukowanego w komórkach bakteryjnych, mechanizmy związane z naprawą DNA same mogą być przyczyną powstawania mutacji [przeg. 39, 40].

Na zróżnicowanie szybkości naprawy DNA mają wpływ czynniki podobne do tych, które decydują o specyfice powstawania uszkodzeń. Specyfika naprawy DNA może być rozpatrywana, z jednej strony jako efekt sekwencji i lokalnej struktury przestrzennej DNA, w której znajduje się uszkodzenie, a z drugiej strony jako efekt aktywności transkrypcyjnej, czy replikacyjnej uszkodzonego genu. Stwierdzono, że addukty indukowane przez pochodne AAF w trzech różnych guaninach w sekwencji 5'-GGCGCC-3' usuwane są z różną szybkością [41]. Wiadomo, że na szybkość naprawy mają również wpływ lokalne zaburzenia struktury DNA. Stwierdzono, że zmiana struk-

tury B-DNA na Z-DNA powoduje wyhamowanie tempa usuwania grupy metylowej z 0⁶-metyloguaniny [42]. Na tempo naprawy DNA ma również wpływ stopień kondensacji chromatyny. Na przykład fotoprodukty indukowane promieniowaniem UV usuwane są szybciej z końców 3' i 5' niż z centralnej części nukleosomu [43].

W odniesieniu do całego genomu można mówić o trzech poziomach szybkości reperacji materiału genetycznego: (1) wolnym — nieaktywnego transkrypcyjnie DNA o wysokim stopniu kondensacji, (2) szybkim — genów aktywnych transkrypcyjnie i (3) przyspieszonym — transkrybowanych nici genów aktywnych. Przykładem wolno naprawianego DNA może być nietranskrybowane, o wysokim stopniu kondensacji, tak zwane alfa-DNA z jąder komórek Naczelnych (*Primates*). Tempo usuwania uszkodzeń indukowanych przez AFB₁ i AAF jest niższe w alfa-DNA niż przeciętnie w całym genomie komórek małpich [44]. Z kolei tak zwane „aktywne DNA” uzyskiwane w czasie frakcjonowania chromatyny i zawierające fragmenty genów transkrybowanych naprawiane jest szybciej niż pozostałe frakcje chromatyny [45, 26]. Bezpośrednich dowodów na wybiórczą naprawę genów aktywnych transkrypcyjnie dostarczyli Bohr i Hanawalt, którzy stwierdzili, że w komórkach CHO (*Chinese hamster ovary*) tempo usuwania fotodimerów dipirymidynowych jest kilkukrotnie wyższe w transkrybowanym genie reduktazy dwuhydrofolianowej (*dhfr*) niż w otaczających go częściach genomu [46]. Od tego momentu preferencyjną naprawę aktywnych transkrypcyjnie genów potwierdzono również w przypadkach innych typów uszkodzeń, innych genów i innych typów komórek [przeg. 47, 48]. Proponowane są różne hipotezy dotyczące mechanizmów wybiórczej naprawy genów aktywnych transkrypcyjnie: (1) kompleks polimerazy RNA zablokowany na uszkodzeniu mógłby być sygnałem dla kompleksu naprawczego; (2) aktywna transkrypcyjnie chromatyna mogłaby być bardziej dostępna dla enzymów reperacyjnych, dzięki swojej otwartej strukturze o słabszym stopniu kondensacji; (3) geny aktywne mogłyby być preferencyjnie naprawiane dzięki ścisłym kontrolom z macierzą jądrową (o ile procesy reperacji podobnie jak transkrypcji czy replikacji związane są z tą strukturą jądra) [przeg. 33]. Sugerowano również, że związek procesów transkrypcji i naprawy DNA może wynikać z udziału tych samych enzymów w obu procesach; przykładem może być związana z procesami naprawy helikaza DNA, będąca jednocześnie składnikiem ludzkiego czynnika inicjującego transkrypcję (BTF2) [49].

Wkrótce po stwierdzeniu wybiórczej naprawy genu *dhfr* okazało się, że w komórkach ssaków uszkodzenia indukowane w tym genie przez światło UV usuwane są szybciej z nici będącej matrycą w procesie transkrypcji, niż z nici nietranskrybowanej [50]. W doświadczeniu, w którym wykorzystano operon laktozowy w komórkach *Escherichia coli* wykazano, że preferencyjne usu-

wanie fotouszkodzeń z nici transkrybowanej genów *lac* ma miejsce tylko po indukcji ich ekspresji [51]. Wiadomo również, że specyficzna dla nici transkrybowanej naprawa fotouszkodzeń w genie *dhfr* może być zahamowana po zahamowaniu syntezy RNA przez α -amanitynę [52]. Dla wyjaśnienia zjawiska preferencyjnej naprawy nici będącej matrycą w procesie transkrypcji proponowane są dwie hipotezy. Pierwsza (tzw. model strukturalny), zakłada, że sygnałem dla kompleksu naprawczego jest lokalna zmiana struktury DNA związana z obecnością zatrzymanego kompleksu transkrypcyjnego czy hybrydy DNA-RNA. Drugi (tzw. model aktywny), zakłada istnienie niezależnego czynnika, który poprzez oddziaływania białko-białko wiąże kompleks naprawczy z zatrzymanym kompleksem transkrypcyjnym [przeg. 53]. W komórkach *Escherichia coli* stwierdzono obecność czynnika białkowego tzw. TRCF (*transcription-repair coupling factor*), o masie ok. 130 kD, kodowanego przez gen *mfd* (*mutation frequency decline*), który zastępuje zablokowany na uszkodzeniu kompleks polimerazy RNA i wiąże się z podjednostką A UvrABC-nukleazy [54, 55]. Choć wiadomo, że preferencyjna naprawa nici transkrybowanej nie jest typowa dla wszystkich rodzajów uszkodzeń DNA [56, 57], to w układach *in vivo* efekt ten opisano w przypadku uszkodzeń indukowanych przez AFB₁ [58], BPDE [59] i BcPHDE [60]. Należy przy tym pamiętać, że zjawisko preferencyjnej naprawy genów aktywnych transkrypcyjnie w nierównym stopniu dotyczy różnych genów i różnych typów komórek.

Nie jest jasna rola struktur macierzy jądrowej w procesach naprawy DNA. Wiadomo, że w jądrach fibroblastów synteza DNA indukowana przez uszkodzenia wywołane światłem UV przebiega szybciej we frakcji związanej z macierzą jądrową. Takiej swoistości nie obserwuje się w komórkach, które utraciły zdolność preferencyjnej naprawy genów aktywnych transkrypcyjnie [61, 62]. Stwierdzono również, że addukty indukowane przez B(a)P w hepatocytach szczura usuwane są preferencyjnie z DNA związanego z macierzą jądrową [63]. Do obecnych w jądrze makrocząsteczek mających wpływ na procesy naprawy DNA należy poliADP-ryboza, prawdopodobnie działająca poprzez modyfikację histonów i regulację aktywności białek związanych z reperacją DNA (topoizomerazy, polimerazy i ligazy DNA). Ponieważ w macierzy jądrowej obecne są polimerazy ADP-rybozy sugerowano, że procesy naprawy DNA (podobnie jak procesy replikacji i transkrypcji) zachodzą w macierzy jądrowej [przeg. 64]. Z drugiej strony wiadomo, że addukty indukowane w DNA wątroby szczurów przez DMN [26] i AAF [65, 66] usuwane są najwolniej z frakcji związanej z macierzą jądrową. Stwierdzono, że uszkodzenia indukowane przez pochodne AAF (w przeciwieństwie do uszkodzeń indukowanych przez UV) nie są preferencyjnie usuwane z genów aktywnych transkrypcyjnie [67]. Można więc przypuszczać, że istnieje

związek pomiędzy preferencyjną naprawą genów aktywnych transkrypcyjnie, a udziałem w procesach reperacji DNA struktur macierzy jądrowej.

W procesie ewolucji szczególnie znaczenie mają uszkodzenia materiału genetycznego i mutacje w komórkach linii generatywnych. Badano wydajność naprawy DNA w czasie oogenezy i spermatogenezy u myszy. Stwierdzono, że w trakcie całego procesu oogenezy (z wyjątkiem wczesnych etapów profazy pierwszego podziału) uszkodzenia indukowane przez promieniowanie UV naprawiane są szybciej w linii komórek generatywnych, niż przeciętnie w komórkach somatycznych [68, 69]. Preferencyjną naprawę uszkodzeń indukowanych przez akrylamid stwierdzono również w trakcie procesu spermatogenezy (do etapu wczesnych spermatyd). Uszkodzenia DNA w komórkach na etapie późnych spermatyd i plemników były słabo naprawiane, lecz jednocześnie DNA tych komórek był bardziej odporny na uszkodzenia [70, 71].

IV. Związek między naprawą DNA i mutagenezą

Na szybkość procesów mutagenezy ma wpływ szybkość zarówno powstawania, jak i usuwania uszkodzeń materiału genetycznego. Powstaje pytanie, który z tych dwóch procesów jest istotniejszy; czy *hot spots* mutacyjne to miejsce gdzie uszkodzenia powstają częściej niż gdzie indziej, czy raczej są to miejsca naprawiane wolniej niż inne. Porównywano częstość powstawania fotouszkodzeń i mutacji indukowanych promieniowaniem UV w różnych miejscach dipirymidynowych genu *supF tRNA* (po transfekowaniu uszkodzonego DNA do fibroblastów), i stwierdzono brak korelacji pomiędzy częstością powstawania uszkodzeń i częstością mutacji. Część *hot spots* mutacyjnych obserwowano w miejscach uszkażanych rzadziej niż inne, z kolei w niektórych miejscach uszkażanych częściej niż przeciętnie częstość mutacji były niższe [7]. Ponieważ częstość mutowania danego nukleotydu nie musi być bezpośrednio związana z częstością uszkażania tego miejsca można przypuszczać, że jest ona związana z: (1) różnicami w szybkości naprawy poszczególnych nukleotydów, (2) różnicami w „dokładności” polimeraz DNA naprzeciw uszkodzonych nukleotydów w różnych miejscach genu i (3) różnicami stosunku *bypass/stop* w przypadkach poszczególnych nukleotydów (gdyby zatrzymanie replikacji było letalne, tylko „przejsię” (*bypass*) uszkodzenia przez polimerazę DNA mogłoby być przyczyną mutacji). Badano częstość powstawania fotouszkodzeń i szybkość ich naprawy w różnych miejscach dipirymidynowych w genie *lacI Escherichia coli*. Stwierdzono związek pomiędzy częstością powstawania mutacji i ilością uszkodzeń na nietranskrybowanej nici tego genu, natomiast brak takiego związku w przypadku uszkodzeń na nici będącej matrycą w procesie transkrypcji. *Hot spot* mutacyjne związane z uszkodzeniami nici transkrybo-

wanej było tożsame z miejscem gdzie naprawa uszkodzeń była wolniejsza niż w innych miejscach [72]. Przeciwnostawne wnioski wynikają z badania mutacji w sekwencji typu NarI ($G^1G^2CG^3CC \rightarrow GGCC$) w komórkach *Escherichia coli*. Mutacja tego typu związana jest z adduktami tworzonymi przez pochodne AAF, przy czym tylko addukt z G^3 indukuje taką delecję. Stwierdzono, że najwolniej naprawianym uszkodzeniem nie był addukt w pozycji G^3 , lecz addukt w pozycji G^2 (czterokrotnie wolniej niż G^3) [41]. Pomimo tych zastrzeżeń wydaje się, że dla procesów mutagenezy decydujące znaczenie ma szybkość naprawy potencjalnie mutagennych uszkodzeń DNA. W genach aktywnych transkrypcyjnie mutacje indukowane przez promieniowanie UV związane są głównie z uszkodzeniami na nici nietranskrybowanej, mimo, że uszkodzenia indukowane przez UV tworzone są co najmniej tak samo często na nici transkrybowanej. Zjawisko to jest związane z preferencyjną naprawą nici będącej matrycą w procesie transkrypcji — w komórkach gdzie nie funkcjonuje preferencyjna naprawa nici transkrybowanej większość mutacji powstaje pod wpływem uszkodzeń tej właśnie nici [27, 28, 73].

Można więc założyć, że chociaż specyfika powstawania jak i usuwania uszkodzeń DNA jest związana ze specyfiką powstawania mutacji, to przebieg naprawy DNA ma decydujące znaczenie dla procesu mutagenezy. Przypuszcza się, że brak całkowitej dokładności i efektywności mechanizmów naprawy DNA jest jedną z ważnych przyczyn zmienności genetycznej całej biosfery [74]. Przykładem związku tempa naprawy DNA ze zmiennością genetyczną na poziomie genomu mogą być geny immunoglobulin. W jądrach limfocytów, w których przebiegają procesy rearanzacji domen genów immunoglobulin, geny *kappa Ig* i *mi Ig* są bardziej podatne na uszkodzenie indukowane przez światło UV i jednocześnie wolniej naprawiane niż te same geny w jądrach granulocytów [75]. Przykładu na związek pomiędzy wydajnością naprawy uszkodzeń DNA i tempem zmienności genetycznej dostarcza również porównanie tych zjawisk w obrębie różnych grup Naczelnych (*Primates*). Ludzie i małpy człekokształtne, u których stwierdzono wyższe tempo reperacji DNA niż u małp wąskonosych i szerokonosych, charakteryzują się wolniejszym tempem ewolucji białek, i co ciekawe, również dłuższym czasem życia [76, 77]. Zaobserwowano również związek pomiędzy defektami mechanizmów naprawy DNA a dziedziczną podatnością na różne rodzaje chorób. Przykładem może być zespół *xeroderma pigmentosum (XP)*. Skóra chorych jest bardzo wrażliwa na promieniowanie UV wskutek wrodzonych defektów w mechanizmach reperacji DNA. Chorzy z zespołem XP charakteryzują się wielokrotnie zwiększonym ryzykiem choroby nowotworowej [przeg. 78].

Artykuł otrzymano 27 grudnia 1993 r.

Zaakceptowano do druku 15 kwietnia 1994 r.

1. Wolfe KH, Sharp PM, Li WH (1989) *Nature* (London) **337**: 283-285
2. Brown K, Buchmann A, Balmain A (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 538-542
3. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsch JA, Wang NJ, Harris CC (1991) *Nature* **350**: 427-428
4. Hemminki K (1983) *Arch Toxicol* **52**: 249-285
5. Meuth M (1990) *Biochim Acta* **1032**: 1-17
6. Gupta RC (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 6943-6947
7. Brash DE, Seetharam S, Kraemer KH, Seidman MM, Bredberg A (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 3782-3786
8. Said B, Shank RC (1991) *Nucl Acids Res* **19**: 1311-1316
9. Sendowski K, Rajewsky MF (1991) *Mutat Res* **250**: 153-160
10. Kumar S, Lipman R, Tomasz M (1992) *Biochemistry* **31**: 1399-1407
11. Benasutti M, Ejadi S, Whitlow MD, Loechler EL (1988) *Biochemistry* **27**: 472-481
12. Johnston BH, Quigley GJ, Ellison MJ, Rich A (1991) *Biochemistry* **30**: 5257-5263
13. Kohwi-Shigematsu T, Scribner N, Kohwi Y (1988) *Carcinogenesis* **9**: 457-461
14. Kohwi Y (1989) *Carcinogenesis* **10**: 2035-2042
15. Sage E, Leng M (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 4597-4601
16. Hogan ME, Dattagupta N, Whitlock JP (1981) *J Biol Chem* **256**: 4504-4513
17. Mitchell DL, Nguyen TD, Cleaver JE (1990) *J Biol Chem* **265**: 5353-5356
18. Seidman M, Slor H, Bustin M (1983) *J Biol Chem* **258**: 5215-5220
19. Cera C, Palu G, Magno SM, Palumbo M (1991) *Nucl Acids Res* **19**: 2309-2314
20. Balhorn R (1989) W: Adolph KW (red) *Molecular biology of chromosome function*. Springer-Verlag, New York, str 366-395
21. Beard P, Kaneko M, Cerutti P (1981) *Nature* (London) **291**: 84-85
22. Kohwi-Shigematsu T, Gelinis R, Weintraub H (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 4389-4393
23. Boles TC, Hogan ME (1984) *Proc Acad Sci USA* **81**: 5623-5627
24. Walker MS, Becker FF, Rodriguez V (1979) *Chem Biol Interact* **27**: 177-190
25. Obi FO, Ryan AJ, Billett MA (1986) *Carcinogenesis* **7**: 907-913
26. Ryan AJ, Billett MA, O'Connor PJ (1986) *Carcinogenesis* **7**: 1497-1503
27. Vrieling H, Van Rooijen ML, Groen NA, Zdzienicka MZ, Simons JW, Lohman PH, van Zeeland AA (1989) *Mol Cell Biol* **9**: 1277-1283
28. McGregor WG, Chen RH, Lukash L, Maher VM, McCormick JJ (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 1927-1934
29. Pfeifer GP, Drouin R, Riggs AD, Holmquist GP (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 1798-1804
30. Cordeiro-Stone M, Topal MD, Kaufmann DG (1982) *Carcinogenesis* **3**: 1119-1127
31. Paules RS, Cordeiro-Stone M, Mass M, Poirier MC, Yuspa SH, Kaufmann DG (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2176-2180
32. Olivero OA, Huitfeldt H, Poirier MC (1990) *Mol Carcinogen* **3**: 37-43
33. Boulikas T (1992) *J Mol Evol* **35**: 156-180
34. Pienta KJ, Partin AW, Coffey DS (1989) *Cancer Res* **49**: 2525-2532
35. Ueyama H, Matsuura T, Nomi S, Nakayasu H, Ueda K (1981) *Life Sci* **29**: 655-661
36. Mironov NM, Glover PL, Sims P (1983) *Carcinogenesis* **4**: 189-193
37. Perin-Roussel O, Barat N, Zajdela F (1988) *Carcinogenesis* **9**: 1383-1388
38. Widlak P, Rzeszowska-Wolny J (1990) *Acta Biochim Polon* **37**: 65-67
39. Walker GH (1985) *Ann Rev Biochem* **54**: 425-457
40. Hoeijmakers JHJ, Bootsma D (1990) *Cancer Cells* **2**: 311-319
41. Seeberg E, Fuchs RPP (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 191-194
42. Boiteux S, Laval F (1985) *Carcinogenesis* **6**: 805-807
43. Jensen KA, Smerdon MJ (1990) *Biochemistry* **29**: 4773-4782
44. Leadon SA, Hanawalt PC (1986) *Mutat Res* **166**: 71-77
45. Arrand JE, Murray AM (1982) *Nucl Acids Res* **10**: 1547-1555
46. Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS, Hanawalt PC (1985) *Cell* **40**: 359-369
47. Hanawalt PC (1989) *Genome* **31**: 605-611
48. Bohr VA (1991) *Carcinogenesis* **12**: 1983-1992
49. Buratowski S (1993) *Science* **260**: 37-38
50. Mellon I, Spivak G, Hanawalt PC (1987) *Cell* **51**: 241-249
51. Mellon I, Hanawalt PC (1989) *Nature* (London) **342**: 95-98
52. Christians FC, Hanawalt PC (1992) *Mutat Res* **274**: 93-101
53. Vos JMH (1992) *Curr Opin Cell Biol* **4**: 385-395
54. Selby CP, Sancar A (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8232-8236
55. Selby CP, Sancar A (1993) *Science* **260**: 53-58
56. Bohr VA (1991) *Adv Exp Med Biol* **283**: 225-233
57. May A, Nairn RS, Okumoto DS, Wassermann K, Stevens T, Jones JC, Bohr VA (1993) *J Biol Chem* **268**: 1650-1657
58. Leadon SA, Lawrence DA (1991) *Mutat Res* **255**: 67-78
59. Chen RH, Maher VM, Brouwer J, van de Putte P, McCormick JJ (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5413-5417
60. Carothers AM, Zhen W, Mucha J, Zhang YJ, Santella RM, Grunberger D, Bohr VA (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 11925-11929
61. Mullenders LHF, van Kestern van Leeuwen AC, van Zeeland AA, Natarajan AT (1988) *Nucl Acids Res* **16**: 10607-10623
62. Mullenders LHF, Venema J, van Hoffen A, Mayne LV, Natarajan AT, van Zeeland AA (1990) W: *Mutation and the Environment* t.A. Wiley-Liss Inc, str 223-232
63. Widlak P, Rzeszowska-Wolny J (1993) *Acta Biochim Polon* **40**: 559-562
64. Boulikas T (1991) *Anticancer Res* **11**: 489-527
65. Gupta RC, Dighe NR, Randerath K, Smith HC (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6605-6608
66. Poirier MC, Fullerton NF, Patterson ED, Beland FA (1990) *Carcinogenesis* **11**: 1343-1347
67. Tang MS, Bohr VA, Zhang XS, Pierce J, Hanawalt PC (1989) *J Biol Chem* **264**: 14455-14462
68. Guli CL, Smyth DR (1988) *Mutat Res* **208**: 115-119
69. Guli CL, Smyth DR (1989) *Mutat Res* **210**: 323-328
70. Sega GA, Generoso EE (1990) *Mutat Res* **242**: 79-87
71. Sega GA, Generoso EE, Brimer PA (1990) *Environ Mol Mutagen* **16**: 137-142
72. Kunala S, Brash DE (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 11031-11035
73. Kochler DR, Awadallah SS, Glickman BW (1991) *J Biol Chem* **266**: 11766-11773
74. Wintersberger U (1991) *FEBS Lett* **285**: 160-164
75. Bianchi MS, Bianchi NO, de la Chapelle A (1990) *Mutat Res* **232**: 89-97
76. Hall KY, Hart RW, Benirschke AK, Walford RL (1984) *Mech Ageing Dev* **24**: 163-173
77. Seino S, Bell GI, Li WH (1992) *Mol Biol Evol* **9**: 193-203
78. Bohr VA, Evans MK, Fornace AJ (1989) *Lab Invest* **61**: 143-161

Enzymologia replikacji DNA *Escherichia coli*

Enzymology of *Escherichia coli* DNA replication

JAROSŁAW MARSZAŁEK*)

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Inicjacja
 - II-1. Matryca DNA
 - II-2. Białko inicjatorowe DnaA
 - II-3. Powstanie kompleksu inicjacyjnego
 - II-4. Białko hamujące inicjację replikacji: IciA (*inhibitor of chromosome initiation*)
- III. Powstanie widełek replikacyjnych
 - III-1. Helikaza DnaB
 - III-2. Białko DnaC
 - III-3. Wiązanie helikazy DnaB z matrycą DNA
 - III-4. Rozwinięcie DNA
- IV. Primosom
 - IV-1. Primaza DnaG
 - IV-2. Synteza primerów
- V. Elongacja
 - V-1. Holoenzym polimerazy III DNA
 - V-2. Replisom
 - V-3. Usuwanie primerów i ligacja DNA
- VI. Terminacja
 - VI-1. Sekwencje terminatorowe *ter* i białko Tus (*terminator utilization substance*)
 - VI-2. Rozdzielenie potomnych cząsteczek DNA
- VII. Rola białek szoku termicznego-hsp (*heat shock proteins*) w replikacji DNA
- VIII. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: ATP γ S — Adenozyno 5'-O-(tiotrifosforan); AMP-PNP — Adenozyno 5'-(β,γ -imino) trifosforan; rNTP — rybonukleotydotrifosforan; dNTP — deoxyrybonukleotydotrifosforan; Py — nukleotyd pirymidynowy; Pu — nukleotyd purynowy; ssDNA — jednoniciowy DNA; SSB — białko wiążące jednoniciowe DNA; NEM — N-etylo-maleimid; DnaA — białko DnaA; *dnaA*-gen DnaA; DnaB — białko DnaB; *dnaB* — gen *dnaB*; DnaC — białko DnaC; *dnaC* — gen *dnaC*; IHF — białko IHF; HU — białko HU

I. Wstęp

Replikacja DNA chromosomu bakterii *Escherichia coli* od wielu lat stanowi klasyczny model doświadczalny w badaniach mających na celu zrozumienie biochemicznego mechanizmu oraz regulacji powielania materiału genetycznego każdej żywej komórki [1, 2]. Badania biochemiczne pozwoliły na wyodrębnienie

Contents:

- I. Introduction
- II. Initiation
 - II-1. DNA matrix
 - II-2. Initiator protein- DnaA
 - II-3. Initiation complex
 - II-4. Protein which inhibits initiation of DNA replication: IciA (*inhibitor of chromosome initiation*)
- III. Replication fork
 - III-1. DnaB protein- helicase
 - III-2. DnaC protein
 - III-3. Binding of DnaB helicase to DNA matrix
 - III-4. DNA unwinding
- IV. Primosome
 - IV-1. DnaG protein- primase
 - IV-2. Synthesis of primers
- V. Elongation
 - V-1. DNA Polymerase III- Holoenzyme
 - V-2. Replisome
 - V-3. Removing of primers and DNA ligation
- VI. Termination
 - VI-1. Termination sequence- *ter* and Tus protein (*terminator utilization substance*)
 - VI-2. Decatenation of daughter DNA molecules
- VII. Role of heat shock proteins- hsp in DNA replication
- VIII. Conclusion

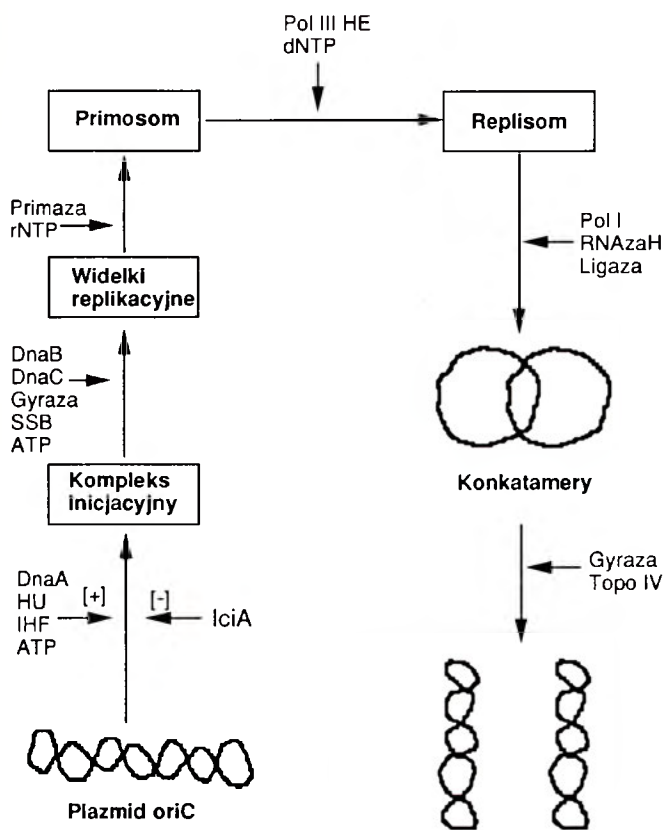
w procesie replikacji DNA szeregu następujących po sobie etapów (Ryc. 1). Czytelnik musi jednak pamiętać, że w komórce poszczególne etapy replikacji DNA mogą zachodzić jednocześnie.

II. Inicjacja

II-1. Matryca DNA

Inicjacja replikacji chromosomu bakteryjnego rozpoczyna się w obrębie określonej sekwencji DNA nazwanej *oriC*, zlokalizowanej w 84 min. mapy genetycznej *E. coli* [3]. Minimalna sekwencja *oriC* (245 par zasad), niezbędna do autonomicznej replikacji minichromosomu w komórce bakteryjnej została określona na podstawie analizy mutantów delecyjnych *E. coli* [3]. W jej obrębie znajdują się cztery 9- nukleotydowe powtórzone odcinki DNA nazwane: R1, R2, R3, R4 o sekwencji najwyższej zgodności (*consensus sequence*) TTAT(C/A)CA(C/A)A [4]. Z odcinkami tymi specyficznie wiąże się białko inicjatorowe DnaA (Ryc. 2) [5, 6]. Pomiędzy sekwencją R1 i R2 znajduje się miejsce specyficznego wiązania białka IHF (*integration host*

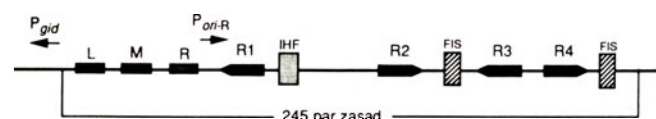
* Pracownia Biofizyki, Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk



Ryc. 1. Etapy replikacji plazmidu *oriC*
 Pol III HE-polimeraza III DNA holoenzym; Pol I-polimeraza I DNA; Topo IV-topoizomeraza IV; [+] — aktywacja; [-] — inhibicja.

factor) [7, 8]. Z kolei pomiędzy R1 i R3, oraz z prawej strony sekwencji R4 znajdują się dwie sekwencje, z którymi specyficznie wiąże się białko Fis (*factor for inversion stimulation*) [9-11]. Po lewej stronie regionu *oriC* znajdują się trzy 13-merowe powtórzone sekwencje, bogate w pary AT nazwane L, M i R. Charakteryzuje je obniżona stabilność heliksu DNA [12, 13]. W negatywnie superhelikalnym plazmidowym DNA, ten fragment sekwencji *oriC* łatwo ulega rozwinięciu nawet bez udziału czynników białkowych. Każdy z 13-merów rozpoczyna się sekwencją GATC. W obrębie minimalnej sekwencji *oriC* znajduje się w sumie 11 sekwencji GATC, w których adenina jest substratem metylotransferazy Dam [14, 15]. Enzym ten katalizuje metylację adeniny w pozycji N-6.

Badania genetyczne wykazały, że dla funkcjonowania procesu replikacji, konieczne jest zachowanie w regionie *oriC* nie tylko sekwencji rozpoznawanych przez białka wiążące się do DNA, ale również dystansu pomiędzy nimi. Przykładowo, zmiana odległości po-



Ryc. 2. Schemat minimalnej sekwencji *oriC*
 L, M, R — sekwencje bogate w pary AT; R1-R4 — miejsca wiązania białka DnaA; IHF — sekwencja rozpoznawana przez białko IHF; FIS — miejsce wiązania białka FIS; P_{gid} — promotor *gid*; P_{oriR} — promotor *oriR*

między sekwencją R3 i R4 o 2 pary zasad prowadzi do powstania sekwencji *oriC* nieaktywnej w replikacji [16]. Topologia regionu *oriC* oraz całej cząsteczki DNA jest również istotna dla prawidłowego funkcjonowania replikacji. W reakcji odtworzonej z oczyszczonych enzymów matrycą replikacji stanowią jedynie kowalencyjnie zamknięte, koliste, negatywnie superzwinięte cząsteczki DNA, zawierające minimalną sekwencję *oriC* [17, 18].

II-2. Białko inicjatorowe DnaA

Badania genetyczne i biochemiczne wykazały, że produkt genu *dnaA*, białko zasadowe o masie cząsteczkowej 53 kDa jest niezbędnym czynnikiem w inicjacji replikacji zależnej od sekwencji *oriC* [19]. Białko to cechują następujące aktywności biochemiczne:

1. Wiąże się specyficznie z 9-merowym odcinkiem dwuniciowego DNA o sekwencji najwyższej zgodności: (T/C)(T/C)(A/T/C)T(A/C)C(A/G)(A/C/T)(A/C) [20-22]. Wiązanie białka DnaA z tą sekwencją obserwowano zarówno w przypadku liniowych jak i kolistych superhelikalnych cząsteczek DNA. Stosując metodę ochrony DNA przed degradacją (*footprinting*), wykazano wiązanie białka DnaA z rozpoznawanymi przez nie sekwencjami w obrębie regionu *oriC*, zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [23].

2. Sekwencje rozpoznawane przez białko DnaA znajdują się w obrębie promotorów szeregu genów: *dnaA*, *mioC*, *uvrB*, *rpoH*. Stwierdzono, że wiązanie DnaA z tymi sekwencjami prowadzi do specyficznego zahamowania transkrypcji [24-30].

3. Białko DnaA wykazuje wysokie powinowactwo do ATP, ADP oraz cAMP [31, 43]. W obrębie genu *dnaA* istnieje sekwencja charakterystyczna dla białek wiążących nukleotydy adeninowe. DnaA wykazuje również bardzo słabą aktywność ATPazy [31].

4. Białko DnaA wiąże kwaśne fosfolipidy takie jak kardiolipina [32].

II-3. Powstanie aktywnego kompleksu inicjacyjnego

W pierwszym etapie inicjacji replikacji, 20 do 30 cząsteczek białka DnaA wiąże się kooperatywnie z czterema sekwencjami R1, R2, R3 i R4 zlokalizowanymi w regionie *oriC* [33]. Powstanie nukleoproteinowego kompleksu prowadzi do znacznych zmian w topologii DNA [19, 20, 34, 35]. Dochodzi do zawinięcia łańcucha DNA wokół cząsteczek DnaA [33]. Wynikiem zmiany struktury DNA jest lokalne rozwinięcie heliksu DNA w obrębie bogatych w pary AT sekwencji L, M i R [36, 37]. Powstanie rozwiniętej struktury DNA wykazano przy pomocy specyficznych dla jednociowego DNA nukleaz: S1 i P1 [36, 38]. Wiele danych wskazuje na to, że jedynie DnaA w kompleksie z ATP jest aktywne w rozwijaniu heliksu DNA. Kompleks DnaA-ADP, podobnie jak DnaA-ATP_γS

oraz DnaA-AMP-PNP, wiąże się z sekwencją *oriC*, jest jednak nieaktywny w replikacji dwuniciowego DNA [31, 39].

Aktywność replikacyjną białka DnaA można mierzyć *in vitro* stosując jako substrat specjalnie przygotowaną jednoniciową matrycę DNA, posiadającą pojedynczą sekwencję wiążącą białko DnaA [40]. W tym systemie replikacji, aktywna jest zarówno forma DnaA-ATP jak i DnaA-ADP [41]. Przeciwciała monoklonalne, które specyficznym hamują wiązanie nukleotydów adeninowych z białkiem DnaA, hamują również replikację dwuniciowego DNA. Obecność tych przeciwciał nie wpływa na replikację jednoniciowej matrycy [41]. Ponieważ synteza DNA na jednoniciowej matrycy nie wymaga rozwijania heliksu DNA, powyższe wyniki popierają hipotezę, zgodnie z którą jedynie DnaA-ATP jest aktywne w rozwinięciu DNA [31, 32, 42].

Zaproponowano następujący sposób regulacji aktywności białka DnaA. Aktywna forma DnaA-ATP tworzy kompleks inicjacyjny. Następnie, w wyniku działania ATPazy, ATP ulega hydrolizie i powstaje nieaktywna forma DnaA-ADP. Kolejna inicjacja replikacji jest możliwa dopiero po zachodzącej bardzo wolno wymianie ADP na ATP. Wykazano, że wiązanie cAMP do DnaA przyspiesza wymianę ADP na ATP, w wyniku czego dochodzi do regeneracji aktywnego kompleksu DnaA-ATP [43]. Dzięki takiemu mechanizmowi cAMP, będący kluczowym czynnikiem regulacji metabolizmu bakterii w zależności od dostępności pokarmu w środowisku, może również wpływać na częstotliwość inicjacji replikacji i szybkość podziałów komórkowych [43]. Podobnie, kwaśne fosfolipidy, w tym kardiolipina, przyspieszają wymianę nukleotydów, ale tylko w przypadku białka DnaA związanego z sekwencją *oriC*. Aktywność wolnego białka DnaA, jest hamowana w obecności fosfolipidów [32, 39, 44].

Od wielu lat sugerowano powiązanie regulacji inicjacji replikacji DNA z metabolizmem błony komórkowej, której jednym z głównych składników są fosfolipidy [45]. Bezpośrednie oddziaływanie kwaśnych fosfolipidów z białkiem inicjatorowym DnaA może być mechanizmem synchronizującym zmiany w strukturze błon zachodzące w czasie podziału komórki z inicjacją replikacji chromosomu bakteryjnego [46]. Innym czynnikiem wiążącym replikację z metabolizmem błony komórkowej jest metylacja sekwencji *oriC* katalizowana przez metylotransferazę Dam [47]. Bezpośrednio po zakończeniu cyklu replikacji, adenina w sekwencjach GATC jest zmetylowana, jedynie na jednej (rodzicielskiej) nici DNA. Hemimetylowana sekwencja *oriC* w porównaniu z sekwencją *oriC* w pełni zmetylowaną ma większe powinowactwo do błony komórkowej [48, 49]. W wyniku wiązania hemimetylowanej sekwencji *oriC* z błoną, inicjacja kolejnej rundy replikacji jest zablokowana, aż do czasu metylacji sekwencji GATC nici potomnej [50]. Wtedy powinowactwo rejonu *oriC* do błony maleje i po uwolnieniu

cząsteczki DNA może ponownie dochodzić do utworzenia kompleksu inicjacyjnego [51]. Przedstawiony powyżej model regulacji inicjacji replikacji jest bardzo atrakcyjny. Jego potwierdzenie wymaga jednak dalszych doświadczeń.

W tworzeniu rozwiniętej struktury DNA białko DnaA wymaga współdziałania innych czynników białkowych. System pozwalający na rozwinięcie matrycy w regionie bogatym w pary AT zrekonstruowano *in vitro* w obecności białka DnaA oraz ściśle określonego stężenia białka HU (*histon-like protein*) [36, 52]. To ostatnie białko może być również zastąpione białkiem IHF (*integration host factor*) [35, 38, 53], które wiąże się z *oriC* pomiędzy sekwencjami R1 i R2 [7]. Białka HU i IHF zaliczane są do II typu białek wiążących DNA, wykazują wysoki stopień homologii i charakteryzuje je podobieństwo strukturalne [54]. Oba są dimerami, które po związaniu z DNA wywołują zmianę konformacji polegającą na zagięciu (*bending*) heliksu. Istotna różnica między nimi polega na tym, że HU wiąże się z DNA niespecyficznym [55] zaś IHF rozpoznaje specyficzną sekwencję [56]. Stwierdzono ponadto bezpośredni wpływ białka HU na wiązanie białka IHF w obrębie sekwencji *oriC*. Na podstawie tych badań zaproponowano hipotezę, zgodnie z którą oba białka współdziałają w inicjacji replikacji [57]. Doświadczenia genetyczne pokazały jednak, że w delecyjnych mutantach nie posiadających białka HU (*hupAB*) plazmidowy DNA zawierający sekwencję *oriC* nie transformował komórek *E. coli* [58]. Podobny fenotyp obserwowano przy jednoczesnym braku genu IHF i polimerazy I DNA (*polA/hip3*) [8]. Dane te sugerują, że *in vivo* w replikacji zależnej od sekwencji *oriC* białka HU i IHF nie mogą zastępować się wzajemnie [57].

W obrębie rejonu *oriC* wykazano również wiązanie białka Fis z specyficznymi sekwencjami zlokalizowanymi w sąsiedztwie R2 i R4 [9, 10]. Fis jest małym (12 kDa) zasadowym białkiem, które wiąże się z DNA i, podobnie jak HU oraz IHF, powoduje jego zagięcie. Fis nie wykazuje jednak homologii z białkami HU i IHF [11, 59, 60]. Doświadczenia genetyczne wskazują na istotną rolę białka Fis w replikacji chromosomu *E. coli* [10], dotychczas nie wiadomo jednak, czy Fis może zastąpić białko HU lub IHF w replikacji DNA *in vitro*.

Wielu autorów uważa, że rola małych białek wiążących się z *oriC* (HU, IHF, Fis) polega na zmianie konformacji DNA, w wyniku której białko DnaA, związane z sekwencją R1-R4, znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie regionu bogatego w pary AT [7]. Umożliwia to katalizowane przez DnaA rozwinięcie heliksu DNA. Ostatnio wykazano, że w obecności DnaA, IHF i HU jedna z nici w obrębie sekwencji M i R jest chroniona przed działaniem nukleazy P1 [38]. Autorzy uważają to za dowód na bezpośrednie oddziaływanie białka DnaA z tymi sekwencjami. Dodatkowego potwierdzenia tej hipotezy dostarczają porównania filogenetyczne. Sekwencje R i M są konser-

watywne w ewolucji wielu gatunków bakterii [61]. Znacznie mniej konserwatywna jest sekwencja L położona najdalej od miejsca wiązania DnaA. Zmiana tej sekwencji na niehomologiczną sekwencję bogatą w pary AT nie ma wpływu na replikację plazmidów *oriC*, zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [13]. Prawdopodobnie białko DnaA nie oddziałuje bezpośrednio z sekwencją L. Całkowite usunięcie każdej z trzech sekwencji bogatych w pary AT uniemożliwia jednak rozwinięcie helisy DNA i hamuje replikację plazmidu *oriC* [12, 62].

Aktywny kompleks inicjacyjny otrzymano *in vitro* poprzez inkubację w temperaturze 30°-38°C mieszaniny reagującej zawierającej superhelikalny DNA plazmidu *oriC*, ATP oraz białka DnaA i/lub IHF [35, 36]. Wysokie stężenie HU i obecność topoizomerazy I (Topo I) powoduje niwelowanie negatywnych superheliksów matrycy, w wyniku tego dochodzi do zahamowania katalizowanego przez białko DnaA rozwinięcia podwójnego heliksu DNA. W tych warunkach niezbędne jest dodanie polimerazy RNA i rybonukleotydów. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że transkrypcja startująca z promotora znajdującego się w pewnej odległości od sekwencji *oriC* wspomaga katalizowane przez białko DnaA rozwinięcie DNA w rejonie bogatym w pary AT [53, 63]. Zjawisko to nazwano aktywacją transkrypcyjną. Doświadczenia *in vivo* wskazują na istotną w inicjacji replikacji DNA rolę transkrypcji inicjowanej z promotora *gid* zlokalizowanego z lewej strony sekwencji *oriC* [13], oraz promotora P *ori-R* znajdującego się w obrębie *oriC* (Ryc. 2) [64]. Polimeraza RNA startuje z tych promotorów w kierunku przeciwnym do położenia regionu bogatego w pary AT. W wyniku przesuwania się polimerazy RNA, negatywne superheliksy DNA nagromadzają się w obrębie sekwencji bogatej w pary AT [65, 66] ułatwiając jej destabilizację [13, 64].

Powstanie aktywnego kompleksu inicjującego replikację zależną od sekwencji *oriC* polega na przyłączeniu białka inicjatorowego DnaA i lokalnym rozwinięciu heliksu DNA. Badania biochemiczne wykazały, że można to osiągnąć *in vitro* stosując kilka systemów doświadczalnych różniących się liczbą dodawanych czynników białkowych. Obecnie trudno jest rozstrzygnąć, które białka asystują w inicjacji replikacji *in vivo*. Istnieje oczywiście możliwość, że komórka w zależności od warunków fizjologicznych wykorzystuje kilka alternatywnych mechanizmów inicjacji replikacji.

II. 4. Białko hamujące inicjację replikacji: IciA (*inhibitor of chromosome initiation*)

Od wielu lat panowała opinia, że replikacja DNA jest regulowana na poziomie inicjacji jedynie przez pozytywny czynnik aktywujący [45]. Białko DnaA ma cechy takiego czynnika. Ostatnio wyizolowano i oczyszczono białko, które specyficznie hamuje replikację plazmidu *oriC*, *in vitro* [67, 68]. Białko to nazywane IciA jest dimerem o masie podjednostki 33 kDa. IciA

wiąże się specyficznie z bogatymi w pary AT sekwencjami: L, M i R i chroni ten region przed rozwinięciem katalizowanym przez białko DnaA [38]. Zahamowanie replikacji obserwowano jedynie wtedy, gdy białko IciA dodano do reakcji przed białkami DnaA, HU i IHF. Białko IciA hamuje również rozwijanie heliksu DNA w warunkach aktywacji transkrypcyjnej. Stosując miejscowo specyficzną mutagenazę wykazano zbieżność pomiędzy powinowactwem IciA do zmutowanej sekwencji L, M i R a hamowaniem replikacji *in vitro* [38]. Plazmidy *oriC*, zawierające sekwencje L, M i R zmutowane w taki sposób, że IciA nie wiązało się z nimi, wykazywały 10-krotnie podwyższoną liczbę kopii w komórce [67]. Bakterie, w których nadprodukowano białko IciA charakteryzowały się wolniejszym wzrostem [68]. Białko IciA może być przeto ważnym czynnikiem regulującym częstotliwość inicjacji replikacji.

III. Powstanie widełek replikacyjnych

III-1. Helikaza DnaB

Widełki replikacyjne [1, 2] powstają dzięki aktywności helikazy, która rozkręca heliks DNA, rozpoczynając od regionu sekwencji *oriC* bogatego w pary AT. Jediną helikazą aktywną w replikacji chromosomu *E. coli* jest produkt genu *dnaB* [69, 70]. Białko DnaB (52 kDa) [71, 72] charakteryzuje się następującymi aktywnościami biochemicznymi:

1. Wiąże ATP i w obecności tego nukleotydu tworzy stabilny heksamer o stechiometrii 6 DnaB-6 ATP [73-75].

2. Jest ATPazą aktywowaną w obecności DNA. Aktywność ta nie jest specyficzna wobec ATP. DnaB hydrolizuje również inne rybonukleotydy [72, 73, 76].

3. Wiąże się z jednoniciowym DNA w obecności Mg^{2+} oraz ATP lub rNTP. Nie ulegające hydrolizie analogi ATP nie hamują wiązania DnaB z ssDNA. Białka SSB hamują wiązanie DnaB z ssDNA [75].

4. Wykazuje aktywność helikazy wymagającą obecności ATP lub rNTP. Nie ulegające hydrolizie analogi nukleotydów hamują aktywność helikazy. W warunkach *in vitro* wykazano, że helikaza DnaB (heksamer) rozplata łańcuch DNA, przesuując się procesywnie wzdłuż pojedynczej nici w kierunku 5'-3'. Białka SSB, dodane do mieszaniny reagującej po związaniu DnaB z jednoniciowym DNA, aktywują helikazę [69, 70].

III-2. Białko DnaC

Produkt genu *dnaC* jest małym białkiem (30 kDa), którego jedyną znaną funkcją jest współdziałanie z helikazą DnaB w wiązaniu z matrycą DNA [77, 78].

1. DnaC, podobnie jak DnaB wiąże nukleotydy adeninowe, nie posiada jednak aktywności ATPazy [79].

2. Tworzy kompleks z białkiem DnaB (zwany dalej kompleksem BC), o stechiometrii 6 DnaB- 6 DnaC- 6

ATP. Kompleks BC jest trwały w obecności ATP lub jego nie ulegających hydrolizie analogów [79, 80].

3. W kompleksie BC dochodzi do zmiany właściwości obu jego komponentów.

Wolne białko DnaC traci aktywność replikacyjną w obecności NEM, związku chemicznego reagującego z resztkami sulfhydrołowymi. Białko DnaC, w kompleksie z DnaB, przestaje być wrażliwe na obecność NEM [77, 79, 80].

Białko DnaC hamuje ATPazową aktywność DnaB oraz obniża wiązanie nukleotydów adeninowych z DnaB [81]. Wzrastające ilości DnaC najpierw aktywują, a następnie hamują aktywność helikazy DnaB [82].

W porównaniu z wolnym białkiem DnaB, kompleks BC ma wyższe powinowactwo wobec jednoniciowego DNA. Wiązanie kompleksu BC z jednoniciowym DNA wykazano również w obecności białka SSB [82].

III-3. Wiązanie helikazy DnaB z matrycą DNA

Doświadczenia *in vitro* wykazały, że helikaza DnaB może przyłączyć się do matrycy DNA zawierającej sekwencję *oriC*, jedynie w postaci kompleksu BC [83]. Wymagana jest również obecność białek DnaA, HU oraz SSB. Miejscem wiązania DnaB jest rozwinięta sekwencja bogata w pary AT [1, 2]. Molekularny mechanizm wiązania helikazy nie był dotychczas znany. Ostatnio wykazano, że białko DnaB może bezpośrednio oddziaływać z białkiem DnaA nawet w nieobecności DNA. Wiązanie DnaB z DnaA jest aktywowane przez białko DnaC. Wbrew wcześniejszym sugestiom [2], nie wykazano bezpośredniego oddziaływania pomiędzy białkami DnaC i DnaA [83]. Przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko białku DnaA hamują wiązanie DnaB z DnaA oraz proces replikacji DNA *in vitro* [83]. Wyniki te wskazują na kluczową rolę bezpośredniego oddziaływania pomiędzy białkami DnaB i DnaA podczas wiązania helikazy DnaB z matrycą DNA. Zagadkowa jest rola białka DnaC w tym procesie. Być może DnaC zmienia konformację DnaB w taki sposób, że białko to wiąże się bardziej efektywnie zarówno z DnaA jak i z jednoniciowym DNA, nawet w obecności białek SSB. Po związaniu kompleksu BC z DNA dochodzi do dysocjacji białka DnaC [82, 83]. Uwolnienie DnaC wymaga prawdopodobnie ATPazowej aktywności DnaB, ponieważ w obecności nie ulegającego hydrolizie analogu ATP γ S, DnaC pozostaje związane w kompleksie nukleoproteinowym nieaktywnym w replikacji DNA [41]. Białko DnaC dodane w wysokim stężeniu do wyizolowanego kompleksu nukleoproteinowego zawierającego jedynie białka DnaA i DnaB hamuje replikację *in vitro* [84, 85]. Równo-molowy stosunek białek DnaB i DnaC jest absolutnie kluczowy dla prawidłowego przebiegu replikacji. Podobnie *in vivo*, nadprodukcja białka DnaC jest toksyczna dla bakterii, może jednak zrekompensować jej efekt nadprodukcując jednocześnie

nie białko DnaB [84]. Obniżenie stężenia białka DnaC jest również szkodliwe dla bakterii. Biochemiczny mechanizm działania letalnej, dominującej, mutacji w genie *dnaB* (*RC231*) [86] polega na konkurencji białka DnaBRC231 (niezdolnego do wiązania się z DNA) i dzikiego białka DnaB o wiązanie białka DnaC. Powstanie nieaktywnego w replikacji kompleksu DnaBRC231-DnaC prowadzi do obniżenia stężenia białka DnaC w komórce i w efekcie do zahamowania replikacji [85].

III-4. Rozwinięcie DNA

Dysocjacja białka DnaC z kompleksu *oriC* DNA-DnaA-DnaB-DnaC aktywuje helikazę DnaB [82, 41], która katalizuje rozwijanie helisy DNA. Prowadzi to do powstania widełek replikacyjnych. Produkt reakcji rozwinięcia matrycy DNA *in vitro*, obserwowano stosując mikroskopię elektronową oraz elektroforezę agarozową [70, 36]. Katalizowana przez helikazę DnaB reakcja rozwijania helisy DNA wymaga obecności białka SSB, które stabilizuje powstały jednoniciowy DNA i zapobiega reasocjacji siostrzanych nici. Wymagana jest również obecność białka HU, obu podjednostek gyrazy (GyrA i GyrB), ATP i Mg²⁺ [36]. W miarę przesuwania się helikazy dochodzi do nagromadzenia pozytywnych superheliksów w dotychczas negatywnie superhelikalnej matrycy DNA. Gyraza będąca topoizomerazą klasy II niweluje pozytywne superheliksy DNA, przez to umożliwia wędrówkę widełek replikacyjnych [88]. W obecności gyrazy, helikaza DnaB rozwija do 90% matrycy DNA, zaś w nieobecności gyrazy, rozwinięty DNA obserwowano jedynie w bezpośrednim sąsiedztwie sekwencji *oriC* [36].

Losy białka DnaA po etapie dysocjacji białka DnaC z kompleksu inicjacyjnego nie są dokładnie znane. Stosując przeciwciała anti-DnaA wykazano obecność tego białka związanego z rozwiniętą matrycą DNA [34]. W innych doświadczeniach *in vitro* pokazano, że po oddysocjonowaniu od jednej matrycy DNA te same cząsteczki DnaA mogą inicjować replikację innej matrycy [42]. Nie wiadomo czy w komórce te same cząsteczki DnaA biorą udział w inicjacji kilku kolejnych cykli replikacji DNA.

IV. Primosom

IV-1. Białko primaza DnaG

Polimeraza III DNA odpowiedzialna za replikację DNA w komórce *E. coli* nie może rozpocząć reakcji polimeryzacji *de novo* od wolnych deoksyrybonukleotydów [1]. Podobnie, jak inne polimerazy DNA, dla rozpoczęcia syntezy nowej nici DNA wymaga ona obecności primerów RNA. Analiza genetyczna wskazuje na to, że enzymem odpowiedzialnym za syntezę primerów jest produkt genu *dnaG* [89]. Białko primaza DnaG jest monomerem o masie cząsteczkowej 65.6

kDa [90]. Primaza DnaG jest niespecyficzną polimerazą RNA, syntetyzuje bowiem primery zawierające zarówno rybo- jak deoksyrybonukleotydy [91]. Niektórzy badacze uważają, że cecha enzymu sprzyja syntezie krótkich primerów. Primery syntetyzowane *in vivo* mają 11(+/-1) nukleotydów [92]. Podczas replikacji chromosomu *E. coli* primaza wiąże się z matrycą DNA w sąsiedztwie białka DnaB [75]. Prawdopodobnie dochodzi do bezpośredniego oddziaływania primazy DnaG i białka DnaB [157]. Według ostatnich doniesień, primaza DnaG rozpoznaje sekwencję GTC i od niej rozpoczyna syntezę primeru. Jednak w obecności białka DnaB primaza jest mniej specyficzna i rozpoznaje sekwencję PuPyPy [92].

IV-2. Synteza primerów

Wydajną syntezę primerów RNA na obu niciach DNA uzyskano dodając primazę DnaG i rybonukleotydy do mieszaniny reagującej, pozwalającej na otrzymanie rozwiniętej działaniem helikazy DnaB, matrycy DNA (II-4.). Najprostszy układ replikacji *in vitro* odtworzono z dziewięciu oczyszczonych białek: DnaA, DnaB, DnaC, Gyr A/B, HU, SSB, DnaG, holoenzym polimerazy III DNA [87]. W tych warunkach bardzo wydajnie replikują się niewielkie plazmidy *oriC*.

Białko DnaG można zastąpić w reakcji replikacji plazmidu *oriC* polimerazą RNA. Wymaga to jednak dodania dodatkowych białek (RNaza H i topoizomeraza I) warunkujących specyficzność reakcji [93]. Tylko w obecności tych białek synteza DNA jest całkowicie zależna od obecności białka DnaA i sekwencji *oriC*. Polimeraza RNA rozpoczyna transkrypcję nie tylko w sąsiedztwie sekwencji *oriC*, lecz również w wielu innych rejonach matrycy DNA. Rola RNazy H, jako czynnika warunkującego specyficzność, polega prawdopodobnie na hydrolizie transkryptów zlokalizowanych poza sekwencją *oriC*. Synteza DNA w systemie zależnym od polimerazy RNA jest 10-krotnie mniej wydajna niż w reakcji zależnej od primazy DnaG.

Synteza primerów katalizowana wyłącznie przez primazę jest zahamowana w obecności topoizomerazy I, RNazy H oraz wysokiego stężenia białka HU. Można ją jednak przywrócić dodając do reakcji polimerazę RNA [93]. Aktywacja przez polimerazę RNA nie polega prawdopodobnie na bezpośrednim udziale tego enzymu w syntezie primerów. Dochodzi raczej do omawianej wcześniej (II-3.) aktywacji transkrypcyjnej [53, 63, 13, 64]. RNaza H warunkuje w tym układzie specyficzność replikacji. Badania genetyczne, oraz doświadczenia z zastosowaniem inhibitorów polimerazy RNA *in vivo* wskazują na istotną rolę tego enzymu w replikacji chromosomu bakteryjnego i plazmidów *oriC* [94-96]. Przyjmuje się, że reakcja syntezy primerów w obecności primazy DnaG i polimerazy RNA jest najbardziej zbliżona do sytuacji fizjologicznej.

V. Elongacja

V-1. Holoenzym polimerazy III DNA

Synteza obu nici DNA w procesie replikacji chromosomu *E. coli* jest katalizowana przez składający się z 10 podjednostek białkowych kompleks enzymatyczny nazwany holoenzymem polimerazy III DNA (Pol III HE) [97, 1, 2]. Katalityczny rdzeń holoenzymu tworzą trzy podjednostki: α (132 kDa), ϵ (27 kDa), θ (10 kDa). Aktywność polimerazy syntetyzującej siostrzaną nić DNA w kierunku od 5' do 3' warunkuje podjednostka α . Podjednostka ϵ działając jak egz nukleaza wycina nieprawidłowo sparowane nukleotydy w kierunku 3'-5'. Dzięki takiej aktywności podjednostki ϵ holoenzym Pol III popełnia błąd jedynie raz na 10^5 syntetyzowanych nukleotydów [158]. Rdzeń polimerazy III charakteryzuje niska procesywność, to znaczy, że enzym nietrwale przyłącza się do matrycy i nie syntetyzuje długich odcinków DNA. Jednak w wyniku przyłączenia kolejnych podjednostek białkowych: τ (71 kDa), γ (47 kDa), δ (35 kDa), δ' (33 kDa), χ (15 kDa), ψ (12 kDa), tworzą się bardziej procesywne formy Pol III. Szczególnie ważna jest podjednostka β (38 kDa), odpowiedzialna za trwałe przyłączenie kompleksu polimerazy do DNA [98]. Holoenzym Pol III odtworzony *in vitro* z 10 oczyszczonych podjednostek pozostaje związany z matrycą DNA przez 30 do 40 min i syntetyzuje długie odcinki DNA z szybkością 750 nukleotydów na sekundę [100-102]. Szybkość syntezy DNA jest porównywalna z tempem replikacji chromosomu *E. coli in vivo* [103]. Ogromna procesywność holoenzymu Pol III umożliwia przebieg procesu replikacji DNA, w którym para widełek replikacyjnych startuje w przeciwnych kierunkach z regionu *oriC* i okrąża cały chromosom w czasie 42 min [104].

V-2. Replisom

Główny problem w procesie syntezy potomnych nici DNA polega na tym, że polimeraza DNA może syntetyzować nowy łańcuch tylko w jednym kierunku od końca 5' do 3'. W związku z tym synteza jednej nici DNA zachodzi w kierunku ruchu widełek replikacyjnych (nić wiodąca), drugiej zaś w kierunku przeciwnym (nić opóźniona) [1]. Omówione właściwości biochemiczne holoenzymu Pol III (V-1.) sugerują, że jest on idealnie przystosowany do syntezy nici wiodącej. Raz przyłączony do matrycy DNA w pobliżu primeru RNA dobudowuje do jego końca 3' kolejne deoksyrybonukleotydy. Wyjątkowa procesywność holoenzymu umożliwia syntezę całej wiodącej nici DNA bez odrywania się od matrycy. Katalizowaną przez holoenzym Pol III reakcję syntezy wiodącej nici DNA odtworzono *in vitro* w obecności ATP, Mg^{2+} , deoksyrybonukleotydów oraz jednoniciowej matrycy DNA z przyłączonym krótkim primerem RNA [105, 106].

Nić opóźniona syntetyzowana jest w sposób nieciąg-

ly. Polimeraza DNA odrywa się od matrycy po zakończeniu syntezy odcinka DNA (fragment Okazaki) i ponownie łączy się z nią w sąsiedztwie następnego primera [1]. Syntezę fragmentów Okazaki stwierdzono badając replikacją *in vitro*, w układzie w którym jedyną polimerazą DNA był holoenzym Pol III [18], co wykazuje, że holoenzym Pol III może syntetyzować obie siostrzane nici DNA.

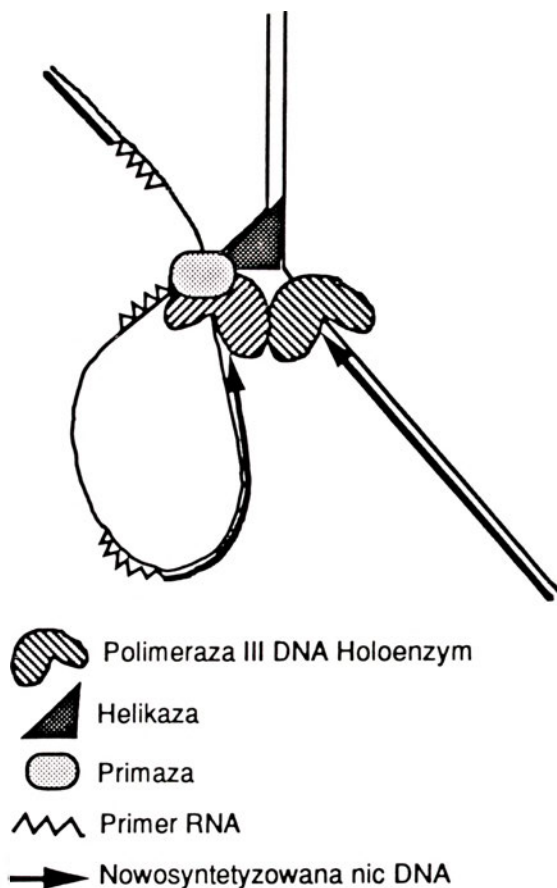
Szereg doświadczeń biochemicznych wskazuje na to, że dwie cząsteczki holoenzymu różniące się składem podjednostek tworzą asymetryczny dimer (Ryc. 3) [106, 97, 2], w obrębie którego z matrycą nici wiodącej jest trwale związana wysoce procesywna forma enzymu. Dzięki połączeniu z drugą cząsteczką holoenzymu, dimer może poruszać się zgodnie z ruchem widełek replikacyjnych. Matryca nici opóźnionej po zakończeniu syntezy fragmentu Okazaki może oddysocjować od enzymu bez naruszania struktury dimeru. W kolejnych cyklach powstający, w wyniku ruchu widełek replikacyjnych, jednoniciowy fragment tej matrycy tworzy pętle, na której primaza syntetyzuje primer — wydłużany następnie przez polimerazę DNA. Poprzez zapętlenie matrycy nici opóźnionej, kierunek syntezy DNA zmienia się o 180° i staje się zgodny z kierunkiem ruchu widełek. Hipoteza ta jest bardzo atrakcyjna, wyjaśnia bowiem w jaki sposób obie siostrzane nici mogą być syntetyzowane w tym samym czasie przez jeden enzym. Obecnie, w wielu laboratoriach trwają prace mające na celu odtworzenie dimeru Pol III z oczyszczonych podjednostek, zbadanie jego struktury i mechanizmu, który reguluje syntezę opóźnionej nici DNA [102, 107-115].

Model asymetryczny dimeru lokalizuje holoenzym w pobliżu helikazy DnaB i primazy. W związku z tym przyjęto, że białka te tworzą wieloenzymatyczny kompleks replisom [116], który może jednocześnie rozwijać helisę DNA, syntetyzować primery RNA i obie siostrzane nici DNA. Badania biochemiczne pokazały, że holoenzym Pol III i helikaza DnaB są trwale związane z DNA, zaś primaza przyłącza się do replisomu na początku cyklu syntezy kolejnego primera [108]. Replisom może być formowany na etapie inicjacji replikacji prawdopodobnie z udziałem białka DnaA. Wyniki badań genetycznych wskazują na możliwość bezpośredniego oddziaływania pomiędzy białkiem DnaA a podjednostką τ polimerazy III DNA, kodowaną przez gen *dnaX* [117].

V-3 Usuwanie primerów i ligacja DNA

Holoenzym Pol III syntetyzuje opóźnioną nić DNA, nie może jednak usunąć primerów RNA i wypełniać pozostających po nich luk. Funkcję tę pełni polimeraza I DNA (Pol I). Jest to pojedynczy polipeptyd o masie 103 kDa [1], posiadający trzy główne aktywności enzymatyczne:

1. polimerazy DNA dobudowującej deoksyrybonukleotydy do końca 3' primera RNA,



Ryc. 3. Schemat struktury replisomu — wieloenzymatycznego kompleksu syntetyzującego synchronicznie obie potomne nici DNA.

2. egzonukleazy 3'-5', korygującej błędnie sparowane nukleotydy,

3. egzonukleazy 5'-3' degradującej sparowane z matrycą fragmenty DNA lub RNA o długości do 10 par zasad.

Pol I przyłącza się do przerw w nici DNA pozostających po syntezie fragmentów Okazaki, wypełnia te luki, jednocześnie usuwając primery. W mieszaninie reagującej złożonej z oczyszczonych enzymów — co stanowi próbę odtworzenia naturalnego środowiska reakcji — degradacja primerów jest aktywowana w obecności RNazy H [34]. Enzym ten prawdopodobnie wspomaga egzonukleolityczną aktywność Pol I. RNaza H nie może jednak całkowicie zastąpić Pol I, ponieważ jedynie polimeraza I DNA potrafi usunąć ostatni rybonukleotyd primera [118, 119]. Polimeraza DNA I nie może połączyć wiązaniem dwustrowym sąsiadujących ze sobą sparowanych nukleotydów. Produktami reakcji katalizowanej przez holoenzym Pol III i Pol I są dwie potomne dwuniciowe cząsteczki DNA zawierające przerwy w miejscach rozpoczęcia syntezy primerów.

Ligaza DNA, monometr o masie 75 kDa [120, 121], katalizuje syntezę wiązania dwustrowego pomiędzy sąsiadującymi ze sobą, sparowanymi, nukleotydami. Źródłem energii w tej reakcji jest hydroliza jednej cząsteczki NAD na każde powstające wiązanie dwustrowe.

VI. Terminacja

VI-1. Sekwencje terminatorowe *ter* i białko Tus (*terminator utilization substance*)

Dwukierunkowa replikacja chromosomu bakteryjnego rozpoczyna się od sekwencji *oriC* (84 min. mapy genetycznej *E. coli*) a kończy się gdy widełki replikacyjne spotykają się w regionie terminatorowym (28.5-33.5 min.) [122, 123]. Region terminatorowy *E. coli* ma 350 par zasad długości, po jego obu stronach zlokalizowane są powtórzone 22- nukleotydowe sekwencje terminatorowe, nazwane odpowiednio *terA*, *terB*, *terC*, *terD*. Ruch widełek replikacyjnych ulega zatrzymaniu w obrębie regionu terminatorowego. Region ten działa jak swoista pułapka. Taki mechanizm umożliwia zakończenie replikacji zawsze w tym samym miejscu, nawet wtedy gdy jedne z widełek przesuwać się wolniej. Zatrzymanie ruchu widełek replikacyjnych jest uzależnione od orientacji sekwencji *ter*. Para sekwencji *terC* i *terB* hamuje widełki przesuujące się zgodnie z ruchem wskazówek zegara, zaś para *terA* i *terD* hamuje widełki poruszające się w przeciwnym kierunku [124, 125].

Działanie sekwencji terminatorowej *ter* jest uzależnione od obecności białka Tus [126]. Produkt genu *tus*, to białko zasadowe o masie cząsteczkowej 36 kDa wiążące się specyficznie z sekwencją *ter*. Dwie grupy badaczy wykazały niezależnie, że białko Tus związane z sekwencją *ter* jest inhibitorem helikazy DnaB [127, 128]. Obecność samej sekwencji *ter*, bez względu na jej orientację, nie ma wpływu na aktywność helikazy DnaB. Białko Tus hamuje aktywności helikazy DnaB tylko wtedy, kiedy sekwencja *ter* występuje w specyficznej orientacji, w tej samej, w której widełki replikacyjne hamowane są *in vivo* [127, 128]. Nie ma natomiast zgody co do mechanizmu działania Tus. Według jednej hipotezy kompleks Tus-DNA stanowi przeszkodę uniemożliwiającą dalszy ruch helikazy [128]. Alternatywna hipoteza zakłada bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy białkiem DnaB i specyficznie zorientowanym dzięki wiązaniu z sekwencją *ter*, białkiem Tus [127]. Fizjologiczna rola omówionego mechanizmu terminacji nie została dotychczas wyjaśniona. Wiele genomów: bakteriofag lambda, plazmid CoIE 1, wirus SV40, nie posiadają takiego mechanizmu. Delecja sekwencji *ter* [129] i unieczynnienie, na drodze mutacji białka Tus nie mają wpływu na replikację plazmidów *oriC* [128]. Być może omówiony mechanizm terminacji jest istotny w replikacji dużego chromosomu bakteryjnego ze względu na jego skomplikowaną topologię. Możliwe, że sekwencje ułatwiające rozdzielanie potomnych cząsteczek DNA zlokalizowane są w obrębie regionu terminatorowego.

VI-2. Rozdzielenie potomnych cząsteczek DNA

Po zakończeniu procesu syntezy nici potomnych,

DNA ma postać dwóch kowalencyjnie zamkniętych, kolistych, splecionych ze sobą cząsteczek. Cząsteczki te muszą ulec rozdzieleniu, czyli dekatencji podczas ostatniego etapu replikacji. Jeżeli obie cząsteczki potomne nie mają nacięć w łańcuchach DNA, to jedynie topoizomerazy klasy II mogą katalizować dekatencję [130, 131]. U bakterii *E. coli* występują dwa enzymy należące do tej klasy; gyraza i niedawno odkryta topoizomeraza IV (produkt genów *parC* i *parE*) [132]. Oba białka wykazują wysoki stopień homologii i są dimerami złożonymi z dwóch różnych podjednostek. Jedynie gyraza, w odróżnieniu od topoizomerazy IV, katalizuje reakcję wprowadzania negatywnych superheliksów do cząsteczki DNA.

Dotychczas uważano, że wyłącznie gyraza katalizuje rozdzielanie potomnych cząsteczek DNA powstałych w wyniku replikacji chromosomu bakteryjnego [133-135]. Wskazywały na to badania genetyczne, gdyż jednym z fenotypowych efektów niektórych mutacji w genach kodujących podjednostki gyrazy (*GyrA* i *GyrB*) są zaburzenia rozdziału (*partitioning*) chromosomów potomnych. W doświadczeniach biochemicznych, w których gyraza była jedynym białkiem należącym do II klasy topoizomeraz uzyskano rozdzielanie potomnych minichromosomów zawierających sekwencje *oriC* [34]. Proces ten nie był jednak wydajny. Jedynie 30% replikujących się minichromosomów ulegało rozdzieleniu. Wykazano również, że w obecności białka HU, gyraza katalizuje dekatencję dimerów DNA, będących produktami replikacji plazmidu pBR322 [135]. Mutacje w genach *parC* i *parE* kodujących topoizomerazę IV, powodują akumulację superhelikalnych dimerów DNA będących produktami replikacji plazmidów w komórce *E. coli* i *Salmonella typhimurium* [136]. Zaobserwowano, że nie wszystkie mutacje w genach *gyrAB* prowadzą do zaburzeń rozdziału potomnych chromosomów. Zahamowanie aktywności gyrazy, poprzez dodanie inhibitorów tego enzymu do hodowli bakteryjnej, nie prowadzi do akumulacji katenatów chromosomów [137]. Na podstawie tych danych przyjmuje się, że w procesie rozdziału potomnych chromosomów czynne są dwie topoizomerazy klasy II. Gyraza miałaby działać na etapie inicjacji i elongacji, wprowadzając negatywne superheliksy i usuwając nagromadzające się w replikowanej cząsteczce DNA pozytywne superheliksy. Topoizomeraza IV zaś, byłaby głównym enzymem odpowiedzialnym za dekatencję produktów replikacji [136, 138]. Dalsze badania pokażą czy przedstawiona hipoteza jest prawdziwa.

VII. Rola białek szoku termicznego-hsp (*heat shock proteins*) w replikacji DNA

Wyniki badań genetycznych wskazują na istotną rolę białek szoku termicznego w replikacji chromosomu bakteryjnego i innych genomów replikujących się w komórce *E. coli*. Mutacje w genach kodujących

białka hsp: *dnaK*, *grpE*, *dnaJ*, *groEL* i *groES* powodują zaburzenie lub zahamowanie procesu replikacji chromosomu *E. coli* [139-141]. Ponadto, mutacje w genach kodujących białka biorące bezpośredni udział w procesie replikacji (*dnaA* i *ssb*) są suprymowane w wyniku nadprodukcji białek GroEL i GroES [142-144].

Biochemiczny mechanizm działania białek hsp został najlepiej poznany w replikacji DNA fagów λ i P1. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że w obu przypadkach białka hsp katalizują częściową dysocjację kompleksów białek replikacyjnych [145-148]. Replikacja plazmidu *oriC in vitro*, nie wymaga obecności białek szoku termicznego [34]. Dodanie do reakcji jednego z białek hsp lub ich kombinacji nie zmienia ani wydajności, ani też kinetyki syntezy DNA [41]. Prawdopodobnie białka hsp nie uczestniczą bezpośrednio w replikacji chromosomu *E. coli*. Białka te mogą jednak stabilizować lub wpływać na proces syntezy enzymów replikacyjnych. Jednym z takich enzymów jest białko inicjatorowe DnaA. Inkubacja monomeru DnaA w temperaturze 30°C prowadzi do agregacji białka i jego inaktywacji. Wykazano, że w tych warunkach obecność białka GroEL lub DnaK skutecznie chroni DnaA przed agregacją [41]. Białko DnaK katalizuje również dysocjację agregatów i przywraca aktywność replikacyjną DnaA [41, 149]. Niektóre temperaturowrażliwe mutanty DnaA (*dnaA46*, *dnaA5*) są nieaktywne w reakcji replikacji badanej w mieszaninie reagującej złożonej tylko z oczyszczonych enzymów. Dodanie do tej mieszaniny reagującej białek DnaK i GrpE prowadzi do aktywacji zmutowanych form DnaA [150-152]. Molekularny mechanizm działania białek hsp na białko DnaA nie jest dokładnie poznany. Można jednak przypuszczać, że jest on związany z „opiekuńczą” (*molecular chaperones*) rolą tych białek chroniących polipeptydy przed denaturacją termiczną i agregacją [153].

Zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia białka inicjatorowego DnaA powinno prowadzić do wzrostu częstotliwości inicjacji replikacji DNA. Okazało się jednak, że obserwowany efekt był znacznie mniejszy niż oczekiwano. Pięciokrotny wzrost syntezy białka DnaA spowodował zwiększenie częstotliwości inicjacji replikacji jedynie o 20% [154]. Nadprodukcja białka DnaA może prowadzić do powstania dużych ilości zagregowanej, nieaktywnej, formy tego białka [41]. Prawdopodobnie białka hsp asystują w procesie prawidłowego zwijania (*folding*) polipeptydu DnaA. W warunkach jego nadprodukcji stężenie białek hsp w komórce może być zbyt niskie, aby mogły one skutecznie „dopilnować” zwijania każdej syntetyzowanej cząsteczki DnaA. Jest również możliwe, że białka hsp kontrolują stężenie aktywnej formy DnaA, a przez to pośrednio wpływają na częstotliwość inicjacji replikacji.

Białka hsp mogą również wpływać na syntezę innych białek biorących udział w replikacji. Ostatnio wykazano wpływ mutacji w genach *dnaK*, *dnaJ* i *grpE*

na stężenie podjednostki ϵ polimerazy III DNA oraz RNazy H [155]. Obecnie trudno rozstrzygnąć, czy efekty fenotypowe w genach kodujących białka hsp na replikację chromosomu bakteryjnego odzwierciedlają specyficzną rolę tych białek w replikacji DNA, czy też jest to wynik ogólnej funkcji białek szoku termicznego, polegającej na asystowaniu w prawidłowym zwijaniu, transporcie komórkowym i ochronie przed denaturacją polipeptydów [139, 140].

VIII. Podsumowanie

Proces replikacji chromosomu *E. coli* jest fascynującym tematem badawczym. Pomimo wielu lat badań, nadal nie rozumiemy biochemicznego mechanizmu inicjacji replikacji. Poznano wprawdzie szereg czynników, które prawdopodobnie odpowiedzialne są za inicjację replikacji: struktura i topologia matrycy DNA, stan metylacji matrycy, oddziaływanie kompleksu inicjacyjnego z błoną komórkową i regulatorami metabolizmu komórkowego. Udało się również odtworzyć proces inicjacji replikacji *in vitro*, lecz nadal nie wiadomo czy znane są wszystkie czynniki biorące w nim udział. Ostatnio znaleziono kolejne białko-Rob (*right oriC binding*) wiążące się z sekwencją *oriC*, którego rola fizjologiczna jest zupełnie nieznaną [156]. Podobna sytuacja jest z każdym kolejnym etapem replikacji DNA.

Dla biologii molekularnej replikacja chromosomu *E. coli* stała się takim klasycznym obiektem badawczym, jakim jest glikoliza w drożdżach dla biochemii. Możliwość badania roli oddziaływań białko-białko, białko-DNA, wpływu topologii DNA i roli błon komórkowych w replikacji chromosomu w układzie doświadczalnym o znanych i sprawdzonych składnikach, powinna doprowadzić do lepszego zrozumienia mechanizmów regulacji cyklu komórkowego.

Artykuł otrzymano 15 lutego 1994 r.

Zaakceptowano do druku 8 lipca 1994.

Piśmiennictwo

1. Kornberg A, Baker T (1992) *DNA Replication*, Freeman, New York
2. Marians KJ (1992) *Annu Rev Biochem* 61: 673-719
3. Oka A, Sugimoto K, Takanami M (1980) *Molec Gen Genet* 178: 9-20
4. Zyskid JW, Cleary JM, Brusilow WS, Harding NE, Smith DW (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1164-1168
5. Fuller RS, Kornberg A (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5817-5821
6. Matsui M, Oka A, Takanami M, Yasuda S, Hirota Y (1985) *J Mol Biol* 184: 529-533
7. Polaczek P (1990) *New Biol* 2: 265-271
8. Filutowicz M, Roll J (1990) *New Biol* 2: 818-827
9. Gille H, Egan JB, Roth A, Messer W (1991) *Nucl Acid Res* 19: 4167-4172
10. Filutowicz M, Ross W, Wild J, Gourse RL (1992) *J Bacteriol* 174: 398-407
11. Finkel SE, Johnson RC (1992) *Mol Microbiol* 6: 3257-3265

12. Kowalski D, Eddy MJ (1989) *EMBO J* 8: 4335-4344
13. Asai T, Takamami M, Imai M (1990) *EMBO J* 9: 4065-4072
14. Geiger GG, Modrich P (1979) *J Biol Chem* 254: 1408-1413
15. Boye E, Lobner-Olesen A (1990) *Cell* 62: 981-989
16. Messer W, Egan B, Gille H, Holz A, Schaefer C, Woelker B (1991) *Res Microbiol* 142: 119-125
17. Fuller RS, Kaguni JM, Kornberg A (1981) *Proc Natl Acad Sci* 78: 7370-7374
18. Kaguni JM, Kornberg A (1984) *Cell* 38: 183-190
19. Fuller RS, Kornberg A (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5817-5821
20. Fuller RS, Funnell BE, Kornberg A (1984) *Cell* 38: 889-900
21. Matsui M, Oka A, Takamami M (1985) *J Mol Biol* 184: 529-533
22. Schaefer C, Messer W (1991) *Molec Gen Genet* 226: 34-40
23. Samitt CE, Hansen FG, Miller JF, Schaechter (1989) *EMBO J* 8: 989-993
24. Atlung T, Clausen E, Hansen FG (1985) *Mol Gen Genet* 200: 442-450
25. Braun RE, O'Day K, Wright A (1985) *Cell* 40: 159-169
26. Kucherer C, Lothar H, Kolling R, Schauzu M, Messer W (1986) *Mol Gen Genet* 205: 115-121
27. Wang Q, Kaguni JM (1987) *Mol Gen Genet* 209: 518-525
28. Lothar H, Kolling R, Kucherer C, Schauzu M (1985) *EMBO J* 4: 555-560
29. van den Berg EA, Geerse RH, Memelink J, Bovenberg RAL, Magnee FA, van de Putte P (1985) *Nucleic Acid Res* 13: 1829-1840
30. Wang Q, Kaguni JM (1989) *J Biol Chem* 264: 7338-7344
31. Sekimizu K, Bramhill D, Kornberg A (1987) *Cell* 50: 259-265
32. Sekimizu K, Kornberg A (1988) *J Biol Chem* 263: 7131-7135
33. Crooke E, Thresher R, Hwang DS, Griffith J, Kornberg A (1993) *J Mol Biol* 233: 16-24
34. Funnell BE, Baker T, Kornberg A (1987) *J Biol Chem* 262: 10327-10334
35. Bramhill D, Kornberg A (1988) *Cell* 52: 743-755
36. Baker TA, Sekimizu K, Funnell BE, Kornberg A (1986) *Cell* 45: 53-64
37. Gille H, Messer W (1991) *EMBO J* 10: 1579-1584
38. Hwang DS, Kornberg A (1992) *J Biol Chem* 267: 23083-23086
39. Crooke E, Castuma CE, Kornberg A (1992) *J Biol Chem* 267: 16779-16782
40. Masai H, Nomura N, Arai K (1990) *J Biol Chem* 265: 15134-15144
41. Marszałek J, Kaguni JM (wyniki przygotowane do publikacji)
42. Yung BYM, Crooke E, Kornberg A (1990) *J Biol Chem* 265: 1282-1285
43. Hughes P, Landoulsi A, Kohiyama M (1988) *Cell* 55: 343-350
44. Yung BY, Kornberg A (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7202-7205
45. Jacob F, Brenner S, Cuzin F (1963) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 28: 329-348
46. Norris V (1990) *J Mol Biol* 215: 67-71
47. Smith DW, Garland AM, Herman G, Enns RE, Baker TA, Zyskid JW (1985) *EMBO J* 4: 1319-1326
48. Ogden GB, Pratt MJ, Schaechter M (1988) *Cell* 54: 127-135
49. Chakraborti A, Gunji S, Shakibai N, Cubeddu J, Rothfield L (1992) *J Bacteriol* 174: 7202-7206
50. Landoulsi A, Malki A, Kern R, Kohiyama M, Hughes P (1990) *Cell* 63: 1053-60
51. Campbell JL, Kleckner N (1990) *Cell* 62: 267-279
52. Dixon NE, Kornberg A (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 424-428
53. Braker TA, Kornberg A (1988) *Cell* 55: 113-123
54. Miller HI (1984) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 49: 691-698
55. Ruvieri-Yaniv J, Gross F (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3428-3432
56. Craig N, Nash H (1984) *Cell* 39: 707-716
57. Bonnefoy E, Ruvieri-Yaniv J (1992) *EMBO J* 11: 4489-4496
58. Ogawa T, Wada M, Kano Y, Imamoto F, Okazaki T (1989) *J Bacteriol* 171: 5672-5679
59. Kahmann R, Rudt F, Koch C, Mertens G (1985) *Cell* 41: 771-780
60. Johnson RC, Simon MI (1985) *Cell* 41: 781-791
61. Zyskid JW, Smith DW (1986) *Cell* 46: 489-490
62. Yung BY, Kornberg A (1989) *J Biol Chem* 264: 6146-6150
63. Skarstad K, Baker TA, Kornberg A (1990) *EMBO J* 9: 2341-2348
64. Asai T, Chen C-P, Nagata T, Takamami M, Imai M (1992) *Mol Gen Genet* 231: 169-178
65. Liu LF, Wang JC (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7024-7027
66. Wu H-Y, Shyy S, Wang JC, Liu LF (1988) *Cell* 53: 433-440
67. Hwang DS, Kornberg A (1990) *Cell* 63: 325-331
68. Thony B, Hwang DS, Fradkin L, Kornberg A (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4066-4070
69. LeBowitz JH, McMacken R (1986) *J Biol Chem* 261: 4738-4748
70. Baker TA, Funnell BE, Kornberg A (1987) *J Biol Chem* 262: 6877-6885
71. Reha-Krantz LJ, Hurwitz J (1978) *J Biol Chem* 253: 4043-4050
72. Nakayama N, Arai N, Kaziro Y, Arai K (1984) *J Biol Chem* 259: 88-9673
73. Reha-Krantz LJ, Hurwitz J (1978) *J Biol Chem* 253: 4051-4057
74. Arai K, Yasuda S, Kornberg A (1981) *J Biol Chem* 256: 5247-5252
75. Arai K, Kornberg A (1981) *J Biol Chem* 256: 5260-5266
76. Arai K, Kornberg A (1981) *J Biol Chem* 253: 5253-5259
77. Wickner S, Hurwitz J (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 921-925
78. Kobori JA, Kornberg A (1982) *J Biol Chem* 257: 13763-13769
79. Wahle E, Lasken RS, Kornberg A (1989) *J Biol Chem* 264: 2463-2468
80. Kobori JA, Kornberg A (1982) *J Biol Chem* 257: 13770-13775
81. Biswas SB, Biswas E (1987) *J Biol Chem* 262: 7831-7838
82. Wahle E, Lasken RS, Kornberg A (1989) *J Biol Chem* 264: 2469-2475
83. Marszałek J, Kaguni JM (1994) *J Biol Chem* 269: 4883-4890
84. Allen GC, Kornberg A (1991) *J Biol Chem* 266: 22096-22101
85. Marszałek J, Kaguni JM (1992) *J Biol Chem* 267: 19334-19340
86. Shrimankar P, Stordal L, Maurer R (1992) *J Bacteriol* 174: 7689-7696
87. van der Ende A, Baker TA, Ogawa T, Kornberg A (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 3954-3958
88. Wang J (1991) *J Biol Chem* 266: 6659-6662
89. Weshler JA, Gross JD (1971) *Mol Gen Genet* 113: 273-284
90. Wickner S, Wright M, Hurwitz J (1973) *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 1613-1618
91. Rowen L, Kornberg A (1978) *J Biol Chem* 253: 770-774
92. Yoda K, Okazaki T (1991) *Mol Gen Genet* 227: 1-8
93. Ogawa T, Baker TA, van der Ende A, Kornberg A (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 3562-3566
94. Lark KG (1972) *J Mol Biol* 64: 47-60
95. Messer W (1972) *J Bacteriol* 112: 7-12
96. Petersen SK, Hans FG (1991) *J Bacteriol* 173: 5200-5206
97. McHenry CS (1991) *J Biol Chem* 266: 19127-19130
98. Kong X-P, Onrust R, O'Donnell M, Kuriyan J (1992) *Cell* 69: 425-437
99. Johanson K O, McHenry CS (1982) *J Biol Chem* 257: 12310-12315
100. Maki S, Kornberg A (1988) *J Biol Chem* 263: 6561-6569
101. Studwell PS, O'Donnell M (1990) *J Biol Chem* 265: 1171-1178

102. O'Donnell M, Studwell PS (1990) *J Biol Chem* **265**: 1179-1187
103. Chandler M, Bird RE, Caro L (1975) *J Mol Biol* **94**: 127-131
104. Zyskid JW, Smith DW (1992) *Cell* **69**: 5-8
105. O'Donnell M, Kornberg A (1985) *J Biol Chem* **260**: 12884-12891
106. Maki H, Maki S, Kornberg A (1988) *J Biol Chem* **263**: 6570-6578
107. Studwell-Vaughan PS, O'Donnell M (1991) *J Biol Chem* **266**: 19833-19841
108. Wu CA, Zechner EL, Marians KJ (1992) *J Biol Chem* **267**: 4030-4044
109. Zechner EL, Wu CA, Marians KJ (1992) *J Biol Chem* **267**: 4045-4053
110. Zechner EL, Wu CA, Marians KJ (1992) *J Biol Chem* **267**: 4054-4063
111. Wu CA, Zechner EL, Hughes AJ, Franden MA, McHenry CS, Marians KJ (1992) *J Biol Chem* **267**: 4064-4073
112. Wu CA, Zechner EL, Reems JA, McHenry CS, Marians KJ (1992) *J Biol Chem* **267**: 4074-4083
113. Onrust R, O'Donnell M (1993) *J Biol Chem* **268**: 11766-11772
114. Xiao H, Dong Z, O'Donnell M (1993) *J Biol Chem* **268**: 11779-11784
115. Studwell-Vaughan PS, O'Donnell M (1993) *J Biol Chem* **268**: 11785-11791
116. Kornberg A (1987) *J Cell Sci Suppl* **7**: 1-13
117. Blinkowa A, Walker J (1983) *J Bacteriol* **153**: 535-538
118. Westergaard O, Brutlag D, Kornberg A (1973) *J Biol Chem* **248**: 1361-1364
119. Darlix J (1975) *Eur J Biochem* **51**: 369-376
120. Lechman IR (1976) *Science* **186**: 790-797
121. Engler MJ, Richardson CC (1982) *Enzymes* **15**: 3
122. Hill TM, Henson JM, Kuempel P (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 1754-1758
123. De Massy B, Bejar S, Louarn J, Louarn J-M, Bouche J-P (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 1759-1763
124. Kuempel PL, Pelletier AJ, Hill TM (1989) *Cell* **59**: 581-583
125. Hill TM, Marians KJ (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2481-2485
126. Hill TM, Tecklenburg ML, Pelletier AJ, Kuempel PL (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 1593-1597
127. Khatri GS, MacAllister T, Sista PR, Bastia D (1989) *Cell* **59**: 667-674
128. Lee EH, Kornberg A, Hidaka M, Kobayashi T, Horiuchi T (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9104-9108
129. Henson JM, Kuempel PL (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 3766-3770
130. Wang JC (1985) *Annu Rev Biochem* **54**: 665-697
131. Wang JC (1991) *J Biol Chem* **266**: 6659-6662
132. Kato J, Nishimura Y, Imamura R, Niki H, Hiraga S, Suzuki H (1990) *Cell* **63**: 393-404
133. Steck TR, Drlica K (1984) *Cell* **36**: 1081-1088
134. Bliska JB, Cozzarelli NR (1987) *J Mol Biol* **194**: 205-218
135. Marians KJ (1987) *J Biol Chem* **262**: 10362-10368
136. Adams DE, Shekhtman EM, Zechiedrich L, Schmidt MB, Cozzarelli NR (1992) *Cell* **71**: 277-288
137. Kreuzer KN, Cozzarelli NR (1979) *J Bacteriol* **140**: 424-435
138. Peng H, Marians KJ (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8571-8575
139. Gross CA, Straus DB, Erickson JW (1990) W: *Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (red) Stress Proteins in Biology and Medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, str 167-189
140. Georgopoulos C, Ang D, Liberek K, Zylicz M (1990) W: *Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (red) Stress Proteins in Biology and Medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, str 191-221
141. Malki A, Hughes P, Kohiyama M (1991) *Mol Gen Genet* **225**: 420-426
142. Fayet O, Louarn JM, Georgopoulos C (1986) *Mol Gen Genet* **202**: 435-445
143. Jenkins AJ, March JB, Oliver IR, Masters M (1986) *Mol Gen Genet* **202**: 446-454
144. Ruben SM, VanDenBrink-Webb SE, Rein DC, Meyer RR (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 3767-3771
145. Zylicz M (1992) *Phil Trans R Lond B* **339**: 271-278
146. Wickner S, Hoskins J, McKenney K (1991) *Nature (London)* **350**: 165-167
147. Wickner S, Hoskins J, McKenney K (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7903-7907
148. Das Gupta S, Mukhopadhyay G, Papp PP, Lewis MS, Chattoraj DK (1993) *J Mol Biol* **232**: 23-34
149. Hwang DS, Crooke E, Kornberg A (1990) *J Biol Chem* **265**: 19244-19248
150. Hwang DS, Kaguni JM (1991) *J Biol Chem* **266**: 7537-7541
151. Hupp TR, Kaguni JM (1993) *J Biol Chem* **268**: 13143-13150
152. Hupp TR, Kaguni JM (1993) *J Biol Chem* **268**: 13137-13142
153. Pelham HRB (1986) *Cell* **46**: 959-961
154. Atlung T, Lobner-Olsen A, Hansen FG (1987) *Mol Gen Genet* **206**: 51-59
155. Foster PL, Marinus MG (1992) *J Bacteriol* **174**: 7509-7516
156. Skarstad K, Thony B, Hwang DS, Kornberg A (1993) *J Biol Chem* **268**: 5365-5370
157. Tougu K, Peng H, Marians KJ (1994) *J Biol Chem* **269**: 4675-4682
158. Echols H, Goodman MF (1991) *Annu Rev Biochem* **60**: 477-511



Do członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Zarząd P.T.Bioch. uprzejmie prosi wszystkich członków o wpłatę zaległych i bieżących składek członkowskich. Zachęcamy także do zaprenumerowania „Postępów Biochemii”.

Perspektywy praktycznego zastosowania badań nad genem *p53*

Perspectives of practical application of *p53* gene studies

BEATA SCHLICHTHOLZ¹,
THIERRY SOUSSI²

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Analiza molekularna
 - II-1. Częstotliwość występowania mutacji w genie *p53*
 - II-2. Rozkład mutacji w genie *p53*
 - II-3. Stosowane metody
- III. Analiza immunohistochemiczna
 - III-1. Aspekty molekularne
 - III-2. Zastosowanie kliniczne
- IV. Analiza serologiczna
- V. Leczenie nowotworów przez odbudowę funkcji supresorowej białka *p53*
- VI. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: hsp — białko szoku termicznego, HSR — regiony o dużej częstotliwości mutacji, PCR — ang. *polymerase chain reaction* (synteza łańcuchowa fragmentów DNA przy użyciu polimerazy i specyficznych primerów), S — sekwencjonowanie, HOT — ang. *hydroxylamine hydrochloride and osmium tetroxide reaction*, DGGE — ang. *denaturing gradient gel electrophoresis* (gradientowa elektroforeza denaturująca), CDGE — ang. *constant denaturant gel electrophoresis* (stałostężeniowa elektroforeza denaturująca), SSCP — ang. *single strand conformation polymorphism* (jednoniciowy polimorfizm konformacyjny).

I. Wstęp

Badania zmierzające do rozwiązania problemu powstawania nowotworów doprowadziły w ostatnich latach do identyfikacji nowotworowych genów supresorowych. Odkrycie genów hamujących podziały komórkowe wzbogaca naszą wiedzę o uwarunkowaniach genetycznych choroby nowotworowej oraz pozwala lepiej zrozumieć normalne mechanizmy regulujące wzrost. Intensywne badania tej właśnie grupy genów zmierzają w kierunku opracowania metod prognostycznych, diagnostycznych, jak i terapii nowotworowej bazującej na odkrytych genetycznych zależnościach. Genem skupiającym uwagę wielu badaczy jest gen *p53* i jego białkowy produkt. Białko roku 1993 [1] stanowi interesujący obiekt badawczy ze względu

Contents:

- I. Introduction
- II. Molecular analysis
 - II-1. Frequency of *p53* gene mutations
 - II-2. Spectrum of *p53* gene mutations
 - II-3. Applied methods
- III. Immunohistochemical analysis
 - III-1. Molecular aspects
 - III-2. Clinical application
- IV. Serological analysis
- V. Therapy based on restoration of wild-type *p53* function
- VI. Concluding remarks

na częste występowanie w przypadku wielu chorób nowotworowych zmutowanej, a tym samym nieaktywnej formy białka *p53*. Pomimo intensywnych badań rola białka *p53* w cyklu komórkowym nie jest do końca wyjaśniona. Gen *p53*, uważany początkowo za onkogen, okazał się w rzeczywistości być genem supresorowym, hamującym inwazyjny wzrost komórek [2-6]. W niniejszej pracy zostaną przedstawione trzy główne rodzaje analizy białka *p53*, tj. analiza molekularna, immunohistochemiczna i serologiczna oraz możliwości ich praktycznego wykorzystania.

II. Analiza molekularna genu *p53*

Badania nad molekularnymi podstawami chorób nowotworowych wskazują, że są one wynikiem akumulacji mutacji w genach, istotnych z punktu widzenia prawidłowego funkcjonowania komórki. Geny te zaliczane są do klasy onkogenów i genów supresorów transformacji nowotworowej.

II-1. Częstotliwość występowania mutacji w genie *p53*

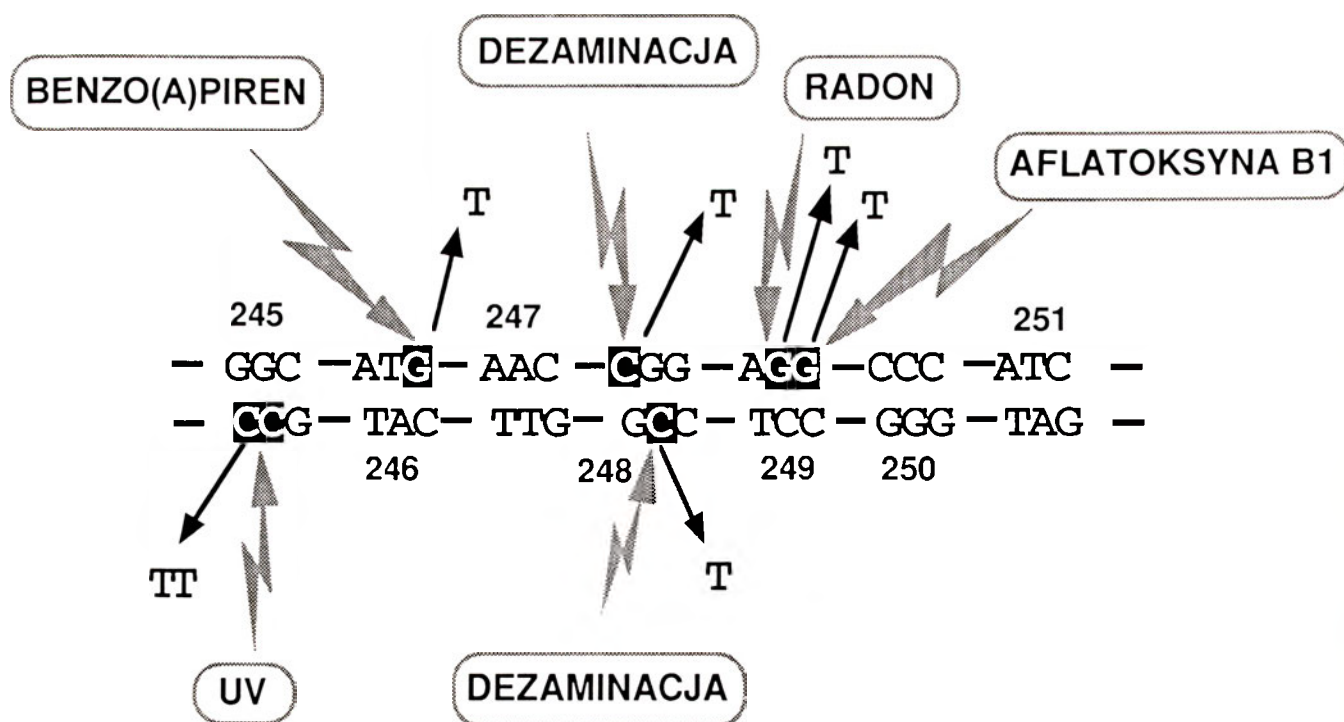
Powszechnie obserwowanym defektem genowym w komórkach rakowych są mutacje w genie *p53*, które pozostają w związku przyczynowym z procesem kancerogenezy. Z wielu obserwacji wynika również, że mutacjom w genie *p53* towarzyszy utrata allelu niezmutowanej formy *p53*, co w efekcie końcowym doprowadza do utraty supresorowej funkcji białka [7, 8].

¹ Mgr, Katedra Biochemii, Uniwersytet Gdański, Kładki 24, 80-822 Gdańsk, ² prof., U301 INSERM, 27 rue J. Dodu, 75010 Paris, France

W dwunastu najczęściej spotykanych nowotworach zidentyfikowano mutacje somatyczne w genie *p53* występujące ogółem u 40 do 45% pacjentów [9, 10] z różną częstotliwością, zależną od rodzaju nowotworu (Tabela 1). Ponadto mutacje genu *p53* występują u pacjentów z tzw. syndromem Li-Fraumeni (LFS), którzy charakteryzują się dziedzicznymi skłonnościami do zapadania na choroby nowotworowe w młodym wieku [11, 12]. Mutacje w genie *p53* należą głównie do mutacji punktowych zmiany sensu warunkujących ekspresję zmutowanego białka [9]. Mutacje te, o negatywnie dominującym efekcie wpływającym na redukcję funkcjonalnych tetramerów, są jednym z pięciu mechanizmów inaktywacji genu *p53* i jego produktu białkowego przedstawionych przez Vogelsteina i Kinzlera [13]. Drugi mechanizm związany jest z delecją allelu w *locus p53* redukującą ekspresję i powstawanie tetramery, co prowadzi do spadku ekspresji genów hamujących podziały komórkowe. Mutacje nonsensowne lub typu *splice site* są odpowiedzialne za skrócenie produktu białkowego genu *p53*, uniemożliwiając tym samym oligomeryzację i powstawanie aktywnej formy tetramery. Kolejny, czwarty mechanizm polega na oddziaływaniu białka *p53* z produktami wirusów onkogennych wywołującymi inaktywację białka *p53* na skutek związania się z *p53* i jego degradację. Ostatecznie produkt genu *p53* może być zmieniony w wyniku wzmocnionej ekspresji genu *mdm-2*, która interferuje z aktywnością białka *p53*. Konsekwencją braku prawidłowo funkcjonującego białka *p53* jest utrata kontroli nad podziałami komórki i naprawą uszkodzeń DNA, prowadząca do gromadzenia aberracji chromosomowych i rozwoju transformacji nowotworowej.

II-2. Rozkład mutacji w genie *p53*

Przeprowadzone do tej pory analizy pozwoliły zlokalizować około 3000 mutacji w genie *p53*. Badania Nigro i wsp. [7] wskazują, że 95% mutacji zgromadzonych jest w centralnej części genu, z czego 57% może być znaleziona w czterech regionach (A-D) o dużej częstotliwości mutacji (ang. *hot-spot regions* (HSR)), które to regiony zlokalizowane są w czterech z pięciu, wysoce konserwatywnych ewolucyjnie, domenach. Późniejsze badania Caron de Fromental i Soussi [10] ujawniły nieznaną dotąd region HSR często ulegający mutacjom, zwłaszcza w przypadku raka płuc, tzw. HSR A'. Spośród pięciu powyżej zdefiniowanych regionów HSR można wyróżnić trzy kodony najczęściej ulegające mutacjom, a odpowiadające Arg¹⁷⁵, Arg²⁴⁸ i Arg²⁷³. Niektóre z somatycznych mutacji w genie *p53* wykazują wysoką specyficzność tkankową zależną od substancji kancerogennych [83]. Przykładem jest aflatoksyna B₁ wywołująca transwersję G → T w kodonie 249 specyficzną dla raka wątrobowokomórkowego [84]. Mutacja dwóch przylegających par zasad typu CC → TT oraz mutacja polegająca na transwersji G → T są charakterystyczne dla raka skóry [85, 86]. Ponadto, transwersje G → T występują z dużą częstotliwością w przypadku nowotworów tytoniozależnych, jak rak płuc, przelyku, głowy i szyi [22, 87]. Region HSR szczególnie często ulegający mutacjom, zlokalizowany pomiędzy kodonem 245 a 251, wraz z rodzajami mutacji i wywołującymi je czynnikami mutagennymi przedstawiony jest na rycinie 1. Spektrum mutacji genu *p53* jest różne w przypadkach poszczególnych rodzajów nowotworów, dlatego analiza rodzaju mutacji może dostarczyć istotnych



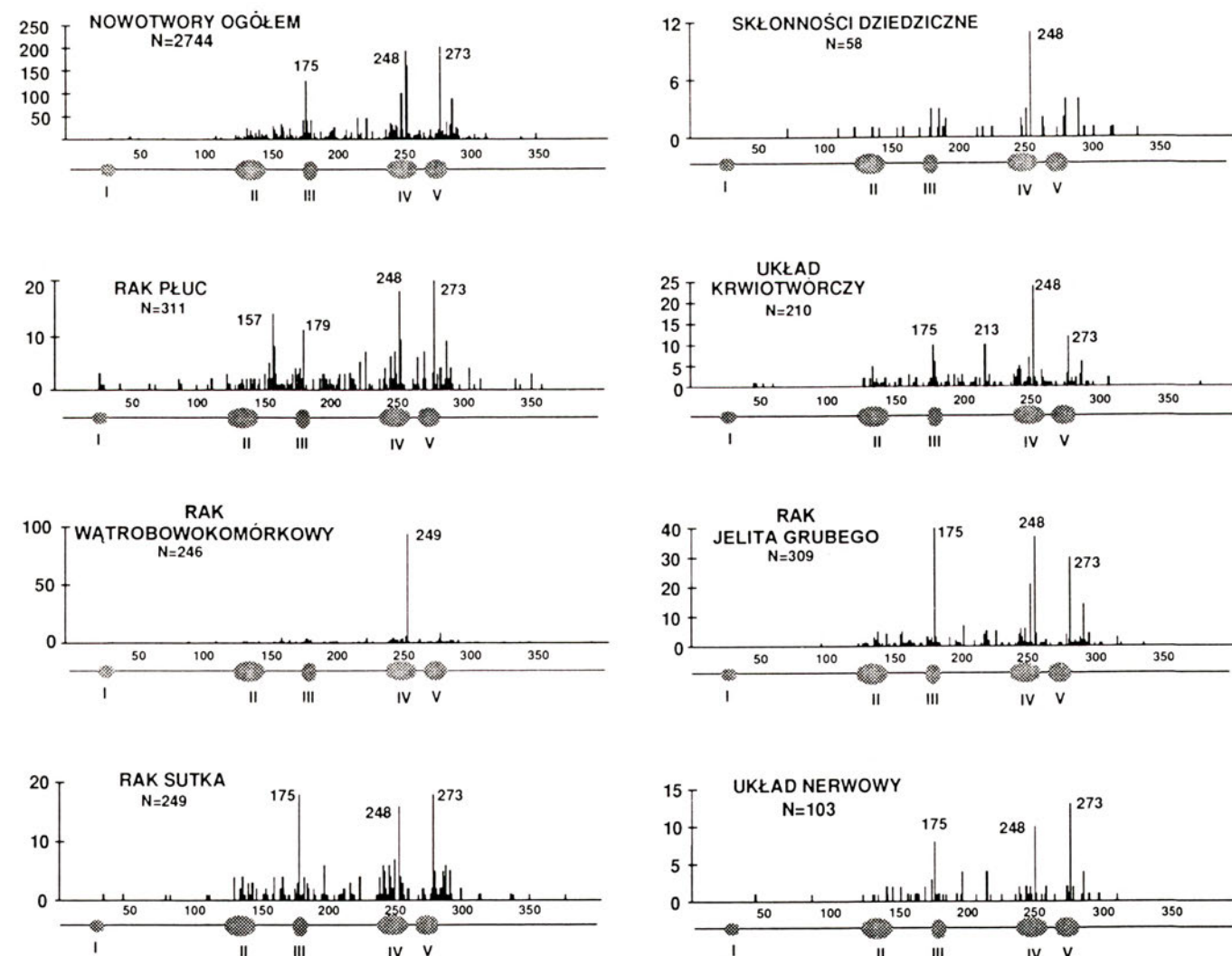
Ryc. 1. Region o dużej częstotliwości mutacji (pomiędzy kodonem 245 a 251), z zaznaczeniem rodzaju mutacji oraz czynnika mutagennego.

informacji odnośnie etiologii choroby nowotworowej oraz zdefiniować regiony białka p53, istotne dla pełnienia właściwych temu białku funkcji biologicznych. Częstotliwość mutacji w genie *p53* wzrasta wraz ze stopniem zaawansowania nowotworu i tak np. w przypadku raka jelita grubego ilość mutacji punktowych rośnie w miarę przemiany guza niezłośliwego (adenoma) w formę złośliwą (carcinoma) [88]. Jakkolwiek mutacje w genie *p53* spotykane są we wczesnych stadiach transformacji nowotworowej [89, 90], to jednak ich największa częstotliwość obserwowana jest w przypadku nowotworów o niskim stopniu zróżnicowania, co pozwala na wykorzystanie tej cechy w prognosytcie [91, 92]. Rozkład mutacji w genie *p53* w przypadku różnych chorób nowotworowych z zaznaczonymi konserwatywnymi domenami przedstawiony jest na rycinie 2.

II-3. Stosowane metody

Zdolność efektywnego wykrywania mutacji w genie *p53* ma duże znaczenie kliniczne ze względu na możliwość detekcji mutacji w skłonnościach dziedzicznych,

umożliwiając tym samym identyfikację pacjentów o wysokim ryzyku zachorowalności na raka. Ponadto, analiza wykrytych mutacji stanowi materiał do intensywnych badań zmierzających do określenia klinicznego znaczenia mutacji w genie *p53*. Powszechnie stosowaną techniką biologii molekularnej pozwalającą na analizę mutacji w genie *p53* jest bezpośrednie sekwencjonowanie uprzednio zamplifikowanych metodą PCR sekwencji DNA genu *p53*. Pomimo, że jest to metoda bardzo czuła, pozwalająca na dokładną lokalizację oraz określenie charakteru mutacji, duży nakład czasu oraz pracy przy użyciu tej techniki spowodował rozwój nowych metod zaliczanych do tzw. metod pośrednich. Detekcja substytucji jednej pary zasad jest możliwa poprzez wykonanie przy użyciu RNAazy cięcia pojedynczej nici RNA w kompleksie RNA:DNA [93]. Oddziaływanie zasad pirymidynowych tymidyny i cytozyny z substancjami chemicznymi w heterodupleksach DNA:DNA umożliwiło opracowanie chemicznej metody detekcji mutacji, tzw. metody HOT (ang. *hydroxylamine hydrochloride and osmium tetroxide reaction*). Tymidyna i cytozyna, w miejscach błędnego dopasowania (ang. *mismatch*)



Ryc. 2. Rozkład mutacji w genie *p53* człowieka w przypadku różnych rodzajów nowotworów. Oś odciętych reprezentuje 393 kodony genu *p53*, a oś rzędnych przedstawia ilość mutacji przypadającą na poszczególne kodony. Liczby rzymskie (I-V) oznaczają położenie konserwatywnych domen genu *p53*, natomiast N całkowitą ilość mutacji.

Tabela 1

 Metoda analizy molekularnej oraz częstotliwość mutacji w genie *p53* spotykana w przypadku dwunastu najczęściej występujących nowotworach

Lp	Rodzaj nowotworu	Częstotliwość występowania %	Metoda analizy	Częstotliwość zmian w genie <i>p53</i>	Autorzy	Pismienictwo			
wg Parkin i wsp. 1993 [14]			wg Soussi i wsp. 1994 [15]						
1	rak płuc drobnokomórkowy	11.8	S	11/15	Takahashi i wsp., 1991	[16]			
	wielkokomórkowy		S	16/20	D'Amico i wsp., 1992	[17]			
S		20/27	Miller i wsp., 1992	[18]					
SSCP (4-9)		6/10	Hensel i wsp., 1991	[19]					
SSCP (2-11)		23/27	Sameshima i wsp., 1992	[20]					
SSCP (5,7-8)		18/28	Lohmann i wsp., 1993	[21]					
S		14/30	Suzuki i wsp., 1992	[22]					
RNaza/S		23/51	Chiba i wsp., 1990	[23]					
SSCP		60/115	Kishimoto i wsp., 1992	[24]					
SSCP (5-8)		57/77	Mitsudomi i wsp., 1992	[25]					
SSCP		35/71	Horio i wsp., 1993	[26]					
2	rak żołądka	9.9	S	6/10	Kim i wsp., 1991	[27]			
			S (5-9)	7/12	Matozaki i wsp., 1992	[28]			
			DGGE (5-8)	15/29	Renault i wsp., 1993	[29]			
			CDGE (5-9)	3/9	Seruca i wsp., 1992	[30]			
			SSCP	9/24	Tamura i wsp., 1991	[31]			
			SSCP (5-11)	6/12	Yamada i wsp., 1991	[32]			
			3	rak sutka	9.4	S (5, 7-8)	2/13	Chen i wsp., 1991	[33]
S (5-8)	7/49	Davidoff i wsp., 1991				[34]			
S (5-9)	4/11	Kovach i wsp., 1991				[35]			
S (1-11)	7/27	Moll i wsp. 1992				[36]			
S (5-9)	14/44	Sommer i wsp., 1992				[37]			
HOT (5-9)	41/137	Coles i wsp., 1992				[38]			
CDGE (5-9)	11/32	Borresen i wsp., 1991				[39]			
CDGE (5, 7-8)	18/109	Thorlacius i wsp., 1993				[40]			
SSCP (4-9)	11/26	Osborne i wsp., 1991				[41]			
SSCP (5-9)	10/59	Runnebaum i wsp., 1991				[42]			
SSCP (2, 5-9)	18/96	Mazars i wsp., 1992				[43]			
4	rak jelita grubego	8.9				S (5-9)	23/33	Baker i wsp., 1990	[8]
						S (5-9)	5/7	Rodrigues i wsp., 1990	[44]
						S (4-9)	8/14	Ishioka i wsp., 1991	[45]
			S (5-8)	16/24	Shaw i wsp., 1991	[46]			
			S (5-9)	10/15	Cunningham i wsp., 1992	[47]			
			CDGE (5-9)	14/33	Lothe i wsp., 1992	[48]			
			DGGE (5-8)	49/90	Hamelin i wsp., 1993	[49]			
			SSCP (5-8)	45/96	Kikuchi-Yanoshita i wsp., 1992	[50]			
			SSCP (5-9)	84/149	Peidano i wsp., 1993	[51]			
			5	rak szyjki macicy	5.7	S	2/8	Crook i wsp., 1991	[52]
S	2/2	Scheffner i wsp., 1991				[53]			
S	3/24	Crook i wsp., 1992				[54]			
SSCP (5-8)	2/36	Fujita i wsp., 1992				[55]			
6	rak gardła	5.4				brak danych			
7	chłoniaki	4.2	S	9/27	Gaidano i wsp., 1991	[56]			
			SSCP (5-8)	10/12	Farrell i wsp. 1991	[57]			
			SSCP (5-8)	10/27	Bhatia i wsp., 1992	[58]			
8	rak wątrobowokomórkowy	4.1	S (5-8)	5/10	Bressac i wsp., 1990	[59]			
			S (5-8)	8/16	Hsu i wsp., 1991	[60]			
			S (5-8)	20/61	Sheu i wsp., 1992	[61]			
			S (5-8)	2/15	Hollstein i wsp., 1993	[62]			
			SSCP (2-11)	7/43	Murakami i wsp., 1991	[63]			
			SSCP (5-8)	10/50	Buetow i wsp., 1992	[64]			
			SSCP (5-8)	17/26	Oda i wsp., 1992	[65]			
			SSCP (5-8)	49/169	Oda i wsp., 1992	[66]			

9	rak przetyku	4.0	S (5-8) S (5-8) S (5-9) SSCP (5-8) SSCP (5-8) SSCP (2-11)	15/34 5/10 7/18 6/24 14/25 15/32	Hollstein i wsp., 1990 Bennett i wsp., 1991 Hollstein i wsp., 1991 Casson i wsp., 1991 Huang i wsp., 1993 Wagata i wsp., 1993	[67] [68] [69] [70] [71] [72]
10	rak gruczołu krokowego	3.8	SSCP (4-9) SSCP (4-9)	9/14 1/10	Bookstein i wsp., 1993 Effert i wsp., 1993	[73] [74]
11	rak pęcherza moczowego	3.2	S (5-9) SSCP (4-11) SSCP (5-8)	11/18 8/23 29/80	Sidrasky i wsp., 1991 Fujimoto i wsp., 1992 Spruck i wsp., 1993	[75] [76] [77]
12	białaczka	2.8	różna mniejsza niż 10%		Fenaux i wsp., 1991 Gaidano i wsp., 1991 Jonveaux i wsp., 1991 Soussi i Jonveaux, 1991 Fenaux i wsp., 1992	[78] [79] [80] [81] [82]

w heterodupleksach DNA w odpowiedniej reakcji chemicznej, ulegają modyfikacjom umożliwiającym cięcie z wykorzystaniem piperydiny [94, 95]. Zależna od składu zasad zdolność denaturacji dwuniciowego DNA w różnych temperaturach i stężeniach substancji denaturującej leży u podstaw metody DGGE [96] i jej wariantu CDGE [97] (ang. *denaturing gradient gel electrophoresis* oraz *constant denaturant gel electrophoresis*). Różnica w migracji pojedynczych nici DNA w żelu poliakrylamidowym, wynikająca z odmiennej drugorzędowej struktury pojedynczej nici DNA zależnej od składu zasad, pozwoliła na opracowanie techniki SSCP (ang. *single strand conformation polymorphism*) [98, 99]. Każda z powyżej przedstawionych technik jest powszechnie stosowana do identyfikacji mutacji w genie *p53* (Tabela 1). SSCP i CDGE są technikami szybkimi oraz czułymi w 90%, niemniej jednak każdy ekson musi być analizowany niezależnie. Metoda HOT umożliwia jednorazową analizę znacznie większych fragmentów DNA, jest jednak bardziej czasochłonna oraz wymaga specyficznych odczynników chemicznych. Posiada natomiast znacznie większą czułość w porównaniu z innymi pośrednimi metodami analizy molekularnej, aczkolwiek zdarza się, że nie wykrywa transwersji G → T [100]. Częstotliwość występowania mutacji w genie *p53* jest zmienna i zależy od rodzaju nowotworu, jak i lokalizacji geograficznej. Rozbieżność danych spotykanych w piśmiennictwie jest prawdopodobnie uwarunkowana różnymi podejściami badawczymi oraz sposobem przygotowania próby, dlatego zarówno do celów badawczych, a zwłaszcza klinicznych mutacje powinny zawsze zostać zsekwencjonowane lub potwierdzone poprzez kolejny niezależny test z wykorzystaniem odmiennej techniki.

III. Analiza immunohistochemiczna

III-1. Aspekty molekularne

Krótki czas półtrwania aktywnej formy białka p53

od 6 do 20 minut uniemożliwia jej gromadzenie się w ilości wykrywalnej konwencjonalnymi technikami immunoprecypitacji lub immunohistochemicznymi. Wydłużenie się czasu półtrwania do 6 godzin, częstokroć wynik zmiany konformacji pod wpływem mutacji [16, 101-104] umożliwia wykrycie stabilnego białka przy zastosowaniu techniki immunohistochemicznej używanej powszechnie jako pośredni wskaźnik mutacji w genie *p53*. Zależność ta została potwierdzona przez badania Bartek i wsp. oraz Gannon a i wsp., którzy do analizy użyli monoklonalnych przeciwciał PAb240 specyficznie rozpoznających zmutowaną formę białka p53 [105, 106]. Związek pomiędzy obecnością mutacji a podwyższonym poziomem białka p53 został odnotowany, między innymi w przypadku raka sutka, krtani i płuc [107-110].

Nie wszystkie mutacje punktowe wywołują podwyższenie poziomu białka p53 [44], jak również nie są one jedynym mechanizmem stabilizacji białka p53. Zwiększona stabilność to rezultat tworzenia kompleksów z białkami wirusowymi: dużym antygenem T wirusa SV40 [111], białkiem E 1b adenowirusa Ad5 [112] oraz białkiem komórkowym hsp 70 [113]. Także produkt genu *mdm-2* o zwiokrotnionej ekspresji obserwowanej w przypadku mięsaków oddziałuje bezpośrednio z białkiem p53 wywołując jego inaktywację [114]. Nie jest wykluczone, że Mdm-2 w wyniku związania się z białkiem p53 wpływa na jego stabilizację, aczkolwiek w chwili obecnej brak jest wystarczających dowodów. Prawdopodobnym jest występowanie niepoznanych, jak dotąd, białek komórkowych odpowiedzialnych za stabilizację p53 i regulację jego funkcji. Zwiększenie poziomu p53 w komórce jest również wynikiem działania czynników uszkodzających DNA, do których możemy zaliczyć substancje chemiczne oraz promieniowanie UV lub γ [103, 115-117]. W związku z powyższym należy zachować dużą ostrożność w interpretowaniu pozytywnych wyników analizy immunohistochemicznej jako odzwierciedlenia mutacji w genie *p53* [118].

III-2. Zastosowanie kliniczne

Analiza immunoreaktywności białka p53, z uwzględnieniem stopnia złośliwości oraz stadium zaawansowania nowotworu, wskazuje na możliwość wykorzystania białka p53 jako interesującego markera biologicznego [91, 119-121]. Przeprowadzone badania wykazują zbieżność pomiędzy obecnością białka p53 a agresywnym stadium choroby nowotworowej. Nie wyklucza się jednak zastosowania białka p53 jako biomarkera wczesnego stadium nowotworu w przypadku raka przetyku [122]. Na podstawie wyników, pochodzących z analizy szerokiej grupy pacjentów z różnymi rodzajami nowotworów, można wysnuć pierwsze wnioski odnośnie ulepszenia, standaryzacji i praktycznego wykorzystania metody immunohistochemicznej [119, 123, 124]. Akumulacja stabilnego białka w większości przypadków w jądrze komórek nowotworowych oraz jego niewykrywalność w otaczającej je tkance normalnej, w połączeniu z łatwością i szybkością metody immunohistochemicznej, umożliwiają wykorzystanie tej ostatniej w prognosyce. Powtarzalność oraz dokładność metody w dużym stopniu zależy od zastosowanych przeciwciał, które powinny charakteryzować się dużą specyficznością oraz powinowactwem do antygeny bez względu na metodę przygotowania próby. W tym celu podjęto szerokie działania zmierzające do otrzymania antyludzkich monoklonalnych przeciwciał, mogących znaleźć zastosowanie w analizie immunohistochemicznej [125, 126]. Nie bez znaczenia pozostaje także sposób utrwalenia materiału, który ma być poddany analizie oraz metoda detekcji kompleksu antygen-przeciwciało [127].

IV. Analiza serologiczna

Po raz pierwszy obecność przeciwciał anty-p53 u myszy z chemicznie indukowaną transformacją nowotworową została zaobserwowana w 1979 r. [103], a następnie potwierdzona u innych zwierząt [128, 129]. W 1982 roku Crawford i w s p. odnotowali humoralną odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko białku p53 u 9% kobiet z rakiem sutka [130]. Późniejsze badania Caron de Fromentej i w s p. wykazały obecność przeciwciał anty-p53 w surowicy 12% dzieci z różnymi rodzajami nowotworów i 20% w przypadku chłoniaka Burkitta [131]. Prace te zapoczątkowały nowy nurt badań nad właściwościami białka p53 i doprowadziły do analizy serologicznej szerokiej grupy pacjentów [132]. Obserwuje się związek pomiędzy występowaniem przeciwciał anty-p53, a obecnością mutacji w genie *p53* [133, 134], zwłaszcza mutacji prowadzących do akumulacji białka [134]. Interesujące jest zjawisko braku przeciwciał anty-p53 w przypadku mutacji w eksonie 8, która związana jest z wysokim poziomem białka p53 w przypadku raka płuc. Zakładając wpływ akumulacji białka na po-

wstanie odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko białku p53, świadczyć by to mogło o słabej immunogenności tego rodzaju mutacji lub defektywnym procesie prezentacji antygeny [134]. Davidoff i w s p., analizując grupę kobiet z rakiem sutka, wykazali związek pomiędzy obecnością przeciwciał anty-p53 a mutacjami zlokalizowanymi w eksonach 5 i 6 genu *p53*. Ze względu na fakt, że mutanty te tworzą kompleks z białkiem szoku termicznego hsp 70, autorzy postulują udział białka hsp 70 w prezentacji antygeny i indukcji odpowiedzi immunologicznej [133]. Z ostatnich badań wynika, że przeciwciała anty-p53 rozpoznają zarówno natywną jak i zmutowaną formę białka p53, a immunogenne domeny białka zlokalizowane są na jego C- i N-końcowym odcinku, a więc poza regionem często ulegającym mutacjom, czyli regionem *hot-spot*. [134-137]. Obserwacje te dotyczą szerokiej grupy pacjentów z różnymi rodzajami nowotworów, jak i zwierząt immunizowanych ludzkim, niezmutowanym białkiem p53 [135, 136]. Wynika stąd, że indukcja odpowiedzi immunologicznej jest rezultatem przełamania tolerancji na skutek dużej akumulacji immunogennego białka. Jakkolwiek istnieje korelacja pomiędzy obecnością przeciwciał, a akumulacją białka p53 i obecnością mutacji, nie jest to jednak bezpośredni mechanizm wiodący do wywołania humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Przyczyny występowania przeciwciał anty-p53 tylko u pewnych pacjentów nie są w pełni poznane i stanowią przedmiot intensywnych badań. Pierwsze prace zajmujące się analizą serologiczną sugerują możliwość praktycznego jej wykorzystania w prognosyce i monitorowaniu terapii. Badania Volkman i w s p. wykazały, że analiza obecności przeciwciał anty-p53 u chorych na raka wątroby, może uzupełniać konwencjonalną metodę, badającą stężenie markera onkologicznego, jakim jest alfafetoproteina (AFP) [138]. Jak wynika z porównania dokonanego w tabeli 2, ten dopiero rozwijający się rodzaj analizy może być konkurencyjny w stosunku do analizy molekularnej i immunohistochemicznej oraz stanowić podstawę do opracowania prostego i szybkiego testu, który by wykazywał obecność w ustroju choroby nowotworowej.

V. Leczenie nowotworów przez odbudowę funkcji supresorowej białka p53

Wraz z rozwojem efektywnych technik umożliwiających dostarczenie genu do wybranych komórek terapia genowa stała się rzeczywistością. Dwie powszechnie stosowane metody *in vitro* wprowadzania obcych genów o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym oparte są na metodzie fizycznej, tj. transferze liposomalnym [139] oraz metodzie wykorzystującej defektywne replikacyjnie wirusy DNA lub RNA [140-142]. Na podstawie dotychczasowych danych perspektywy wykorzystania genu *p53* w leczeniu nowotworów wydają się być realne oraz bardzo obiecujące. Prze-

Tabela 2Rodzaje analiz stosowanych do badań genu *p53* i jego produktu białkowego (zmodyfikowana wersja tabeli wg Soussi i w.s.p. [15]).

Metoda	Sposób analizy	Wyniki	Zalety	Wady
Analiza molekularna -bezpośrednia	Sekwencjonowanie genu <i>p53</i>	Identyfikacja mutacji oraz delekcji genu	Pozwala na dokładną analizę miejsca i rodzaju mutacji	Czasochłonna Nieskuteczna w przypadku mutacji położonych poza regionem sekwencjonowanych eksonów Tkanka nowotworowa jest niezbędna do jej przeprowadzenia Niemożliwa do zastosowania w rutynowej diagnostyce
	Sekwencjonowanie kodujących regionów cDNA			
	Sekwencjonowanie eksonów 4-8			
-pośrednia	HOT DGGE CDGE SSCP	Stwierdzenie obecności mutacji oraz delekcji genu	Szybka do przeprowadzenia Może być wykorzystana do analizy dużej liczby pacjentów	Dokładność metody wynosi 90% Tkanka nowotworowa jest niezbędna do jej przeprowadzenia Niemożliwa do zastosowania w rutynowej diagnostyce
Analiza immunohistochemiczna	Zastosowanie poliklonalnych lub monoklonalnych przeciwciał	Detekcja białka <i>p53</i> w komórcie nowotworowej	Umożliwia identyfikację stabilizacji białka <i>p53</i> niewywołaną przez mutację Może być zastosowana w rutynowej diagnostyce	Nieskuteczna w przypadku całkowitej delekcji genu <i>p53</i> oraz mutacji, które nie wywołują akumulacji białka <i>p53</i> Tkanka nowotworowa jest niezbędna do jej przeprowadzenia
Analiza serologiczna	Immunoblotting Immunoprecypitacja ELISA	Stwierdzenie obecności przeciwciał anti- <i>p53</i> w surowicy pacjentów	Pozwala na wykrycie zmian (stabilizacji?) białka <i>p53</i> niewywołanych przez mutację Może być zastosowana w rutynowej diagnostyce Tkanka nowotworowa nie jest wymagana Może być pomocna w określeniu zaawansowania procesu nowotworowego i monitorowaniu terapii	Nieskuteczna w przypadku mutacji, które nie wywołują odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko białku <i>p53</i>

przebadane niezależnie badania wykazały, że transfekcja oraz ekspresja dzikiej formy białka *p53* w nowotworowych liniach komórkowych z delecją obydwu alleli genu *p53*, lub zawierających zmutowaną formę białka, wywołuje supresję nadmiernej proliferacji komórkowej i zahamowanie transformacji nowotworowej [2, 143, 144]. Ponadto, Fujiwara i w.s.p. stosując retrowirusowe wektory jako nośniki genu dzikiej formy białka *p53* wykazali, że są one w stanie penetrować trójwymiarowe, wielokomórkowe, nowotworowe struktury modelowe, natomiast ulegający ekspresji gen *p53* indukuje zaprogramowaną śmierć komórki, czyli apoptozę w przypadku komórek raka płuc [145]. Dalsze badania [146] bazujące na istniejącej zależności pomiędzy utratą funkcji przez biał-

ko *p53*, a wzrostem oporności na chemioterapeutyki [147] ujawniły nowy aspekt terapii genowej. W wyniku transfekcji linii komórkowej wielkokomórkowego raka płuc zrekombinowanym adenowirusem, zawierającym dziką formę genu *p53*, zwiększono wrażliwość komórek na chemioterapeutyki, sugerując tym samym skuteczność połączenia terapii genowej z chemioterapią w leczeniu nowotworów [146]. W tym miejscu należy również zwrócić uwagę na terapeutyczny aspekt czynników, które przywracają nieaktywnej formie białka *p53* właściwą mu funkcję. Wiadomym jest, że zmutowane białko *p53* tworzy kompleks z białkiem szoku termicznego hsp 70 [113, 148, 149], zarówno z formą konstytutywnie obecną w komórce, jak i formą indukowaną warunkami stresowymi [149]. Biologicz-

na rola kompleksu p53-hsp 70 nie jest w pełni poznana. Badania Hainaut i Milner [150] sugerują udział hsp 70 w przywracaniu zmutowanej formie białka p53 natywnej konformacji i wytwarzaniu jego właściwej struktury oligomerycznej, tzn. tetrameru. Białka szoku termicznego typu hsp 70 zaliczane do tak zwanych białek opiekuńczych (ang. *molecular chaperones*) [151] mogą mieć istotny wpływ na regulację aktywności białka p53. Łącząc się z domenami hydrofobowymi, uczestniczą nie tylko w formowaniu właściwej struktury białek i przywracaniu natywnej konformacji białkom po ustąpieniu warunków stresowych, ale także biorą udział w podstawowych procesach komórkowych zachodzących w warunkach fizjologicznych, jak na przykład transport białek przez błony, morfogeneza struktur komórkowych, proteoliza. W świetle ostatnich badań nową obiecującą strategię walki z chorobą nowotworową reprezentuje zastosowanie białek szoku termicznego, których podwyższony poziom został zaobserwowany w komórkach nowotworowych [152]. Ze względu na fakt, że reakcja układu odpornościowego na spontanicznie rozwijający się nowotwór jest zwykle niewystarczająca, uwaga badaczy skoncentrowana jest na wykrywaniu nowotworowych antygenów stanowiących cel ataku cytolitycznych limfocytów T, jak i na znalezieniu sposobów wzmocnienia aktywności tych komórek układu odpornościowego. Wysoka immunogenność białek szoku termicznego [153] została wykorzystana w badaniach Luckacs [154], który wzmocnił odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko komórkom nowotworowym poprzez transfekcję genem kodującym białko szoku termicznego (hsp65) z *Mycobacterium leprae*. Równocześnie zaobserwowano cofnięcie się procesu rakotwórczego, która to zmiana może być rezultatem przywrócenia właściwych dla białka p53 funkcji supresorowych pod wpływem oddziaływania hsp65 z p53 [154]. W chwili obecnej prezentacja polipeptydów zmutowanej formy białka p53 przez cząsteczki klasy I głównego kompleksu zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*), mająca na celu indukcję cytotoksycznych limfocytów T, stanowi podstawę dla konstrukcji polipeptydowych szczepionek nowotworowych [155]. Nie mniej interesująca strategia terapii nowotworowej pojawiła się wraz z odkryciem genu *WAF1/CIP1*, którego indukcja związana jest ekspresją niezmutowanego genu *p53* [156, 157]. Białko p53 pobudzając transkrypcję genu *WAF1/CIP1*, silnego inhibitora kinaz zależnych od cyklin, hamuje nadmierną proliferację komórki. Identyfikacja białka *WAF1/CIP1* zapoczątkowała nowy nurt badań zmierzający do znalezienia związków blokujących podziały komórkowe poprzez imitację efektu inhibitorowego typowego dla produktu genu *WAF1/CIP1*, zaburzającego funkcjonowanie cyklu komórkowego. Ponadto, zastosowanie preparatów blokujących czynniki inaktywujące białko p53, a tym samym umożliwiających prawidłowe

jego funkcjonowanie, stanowi alternatywny sposób podejścia do leczenia chorób nowotworowych.

VI. Uwagi końcowe

Postępy w dziedzinie biologii molekularnej są coraz częściej wykorzystywane w innowacyjnych podejściach do zagadnień zarówno diagnostycznych, jak i prognostycznych oraz otwierają nowy etap w poszukiwaniu skutecznej terapii nowotworów złośliwych. Na szczególną uwagę zasługują geny supresory transformacji nowotworowej jako markery biologiczne, znajdujące zastosowanie w rozpoznawaniu nowotworów, monitorowaniu wyników leczenia i jako wskaźniki nawrotu choroby.

W niniejszym artykule przedstawiono trzy powszechnie stosowane sposoby analizy białka p53, które będą mogły, zapewne, mieć zastosowanie w praktyce klinicznej. Są to: analiza DNA pacjentów, analiza immunohistochemiczna tkanki i analiza serologiczna. Wydaje się, że mogą one stanowić bazę dla efektywnych metod uzupełniających obecnie stosowane badania lekarskie oraz istniejące już testy kliniczne. Zwrócono także uwagę na obiecujące perspektywy zastosowania białka p53 w terapii genowej, którego stan funkcjonalny może dostarczać istotnych informacji odnośnie skuteczności zastosowanej chemioterapii lub radioterapii.

Podziękowania:

Autorzy dziękują dr B. Szewczykowi za cenne uwagi i dyskusję w trakcie przygotowywania manuskryptu. Praca w części finansowana w ramach grantu KBN # 0088/P2/94/07.

Artykuł otrzymano 15 lipca 1994 r.

Zaakceptowano do druku 30 lipca 1994 r.

Piśmiennictwo

1. Culotta E, Koshland JDE (1993) *Science* **262**: 1958-1961
2. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JKV, Vogelstein B (1990) *Science* **249**: 912-915
3. Chen P-L, Chen Y, Bookstein R, Lee W-H (1990) *Science* **250**: 1576-1580
4. Mercer WE, Shields MT, Amin M, Saure GJ, Appella E, Romano JW, Ullrich SJ (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 6166-6170
5. Diller L, Kassel J, Nelson CE, Gryka MA, Litwak G, Gebhardt M, Bressac B, Ozturk M, Baker SJ, Vogelstein B, Friend SH (1990) *Moll Cell Biol* **10**: 5772-5781
6. Johnson P, Gray D, Mowat M, Benchimol S (1991) *Moll Cell Biol* **11**: 1-11
7. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hoestetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B (1989) *Nature* (London) **342**: 705-708
8. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B (1990) *Cancer Res* **50**: 7717-7722

9. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, and Harris CC (1991) *Science* **253**: 49-53
10. Caron de Fromental C, Soussi T (1992) *Genes, Chrom Cancer* **4**: 1-15
11. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, JR, Nelson CE, Kim D, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friend SH (1990) *Science* **250**:1233-1238
12. Srivastava S, Zou Z, Pirolo K, Blattner W, Chang EH (1990) *Nature (London)* **348**: 747-749
13. Vogelstein B, Kinzler KW (1992) *Cell* **70**: 523-526
14. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1993) *Int J Cancer* **54**: 594-606
15. Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B (1994) *Int J Cancer* **57**: 1-9
16. Takahashi T, Takahashi T, Suzuki H, Hida T, Sekido Y, Ariyoshi Y, Ueda R (1991) *Oncogene* **6**: 1775-1778
17. D'Amico D, Carbone D, Mitsudomi T, Nau M, Fedorko J, Russell E, Johnson B, Buchhagen D, Bodner S, Phelps R, Gazdar A, Minna JD (1992) *Oncogene* **7**: 339-346
18. Miller CW, Simon K, Aslo A, Kok K, Yokota J, Buys CHCM, Terada M, Koeffler HP (1992) *Cancer Res* **52**: 1695-1698
19. Hensel CH, Xiang RH, Sakaguchi AY, Naylor SL (1991) *Oncogene* **6**: 1067-1071
20. Sameshima Y, Matsuno Y, Hirohashi S, Shimosato Y, Mizoguchi H, Sugimura T, Terada M, Yokota J (1992) *Oncogene* **7**: 451-457
21. Lohmann D, Pütz B, Reich U, Böhm J, Präuer H, Höfler H (1993) *A J P* **142**: 907-915
22. Suzuki H, Takahashi T, Kuroishi T, Sayama M, Ariyoshi Y, Takahashi T, Ueda R (1992) *Cancer Res* **52**: 734-736
23. Chiba I, Takahashi T, Nau MM, D'Amico D, Curiel DT, Mitsudomi T, Buchhagen DL, Carbon D, Piantadosi S, Koga H, Reissman PT, Slamon DJ, Holmes EC, Minna JD (1990) *Oncogene* **5**: 1603-1610
24. Kishimoto Y, Murakami Y, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T (1992) *Cancer Res* **52**: 4799-4804
25. Mitsudomi T, Steinberg SM, Nau MM, Carbone D, D'Amico D, Bodner S, Oie HK, Linnoila RI, Mulshine JL, Minna JD, Gazdar AF (1992) *Oncogene* **7**: 171-180
26. Horio Y, Takahashi T, Kuroishi T (1993) *Cancer Res* **53**: 1-4
27. Kim JH, Takahashi T, Chiba I, Park JG, Birrer MJ, Roh JK, Lee HD, Kim JP, Minna JD, Gazdar AF (1991) *J Nat Cancer Inst* **83**: 938-943
28. Matozaki T, Sakamoto C, Matsuda K, Suzuki T, Konda Y, Nakano O, Wada K, Uchida T, Nishisaki H, Nagao M, Kasuga M (1992) *Biochem Biophys Res Comm* **182**: 215-223
29. Renault B, Vandenbroek M, Fodde R, Wijnen J, Pellegata NS, Amadori D, Khan PM, Ranzani GN (1993) *Cancer Res* **53**: 2614-2617
30. Seruca R, David L, Holm R, Nesland JM, Fangan BM, Castedo S, Sobrinho-Simoes M, Borresen AL (1992) *Brit J Cancer* **65**: 708-710
31. Tamura G, Kihana T, Nomura K, Terada M, Sugimura T, Hirohashi S (1991) *Cancer Res* **51**: 3056-3058
32. Yamada Y, Yoshida T, Hayashi K, Sekiya T, Yokota J, Hirohashi S, Nakatani K, Nakano H, Sugimura T, Terada M (1991) *Cancer Res* **51**: 5800-5805
33. Chen LC, Neubauer A, Kurisu W, Waldman FM, Ljung BM, Goodson W, Goldman ES, Moore D, Balazs M, Liu E, Mayall BH (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 3847-3851
34. Davidoff AM, Humphrey PA, Iglehart JD, Marks JR (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5006-5010
35. Kovach JS, McGovern RM, Cassidy JD, Swanson SK, Wold LE, Vogelstein B, Sommer SS (1991) *J Nat Cancer Inst* **83**: 1004-1009
36. Moll UM, Riou G, Levine AJ (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7262-7266
37. Sommer SS, Cunningham J, McGovern RM, Saitoh S, Schroeder JJ, Wold LE, Kovach JS (1992) *J Nat Cancer Inst* **84**: 246-252
38. Coles C, Condie A, Chetty U, Steel CM, Evans HJ, Prosser J (1992) *Cancer Res* **52**: 5291-5298
39. Borresen AL, Hovig E, Sorensen BS, Malkin D, Lystad S, Andersen TI, Nesland JM, Isselbacher KJ, Friend SH (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8405-8409
40. Thorlaciuss S, Borresen AL, Eyfjord JE (1993) *Cancer Res* **53**: 1637-1641
41. Osborne RJ, Merlo GR, Mitsudomi T, Venesio T, Liscia DS, Cappa APM, Chiba I, Takahashi T, Naum M, Callahan R, Minna JD (1991) *Cancer Res* **51**: 6194-6198
42. Runnebaum IB, Nagarajan M, Bowman M, Soto D, Sukumar S (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10657-10661
43. Mazars R, Spinardi L, Bencheikh M, Simony-Lafontaine J, Jeanteur P, Theillet C (1992) *Cancer Res* **52**: 3918-3923
44. Rodrigues NR, Rowan A, Smith MEF, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7555-7559
45. Ishioka C, Sato T, Gamoh M, Suzuki T, Shibata H, Kanamaru R, Wakui A, Yamazaki T (1991) *Biochem Biophys Res Comm* **177**: 901-906
46. Shaw P, Tardy S, Benito E, Obrador A, Costa J (1991) *Oncogene* **6**: 2121-2128
47. Cunningham J, Lust JA, Schaid DJ, Bren GD, Carpenter HA, Rizza E, Kovach JS, Thibodeau SN (1992) *Cancer Res* **52**: 1974-1980
48. Lothe RA, Fossli T, Danielsen HE, Stenwig AE, Nesland JM, Gallie B, Borresen AL (1992) *J Nat Cancer Inst* **84**: 1100-1108
49. Hamelin R, Jego N, Laurentpuig P, Vidaud M, Thomas G (1993) *Oncogene* **8**: 2213-2220
50. Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Ito S, Seki M, Tanaka K, Maeda Y, Iino H, Fukayama M, Koike M, Mori T, Sakuraba H, Fukunari H, Iwama TT, Miyaki M (1992) *Cancer Res* **52**: 3965-3971
51. Peidano MA, Fernandez-Renart M, Capella G, Wilson L, Perucho M (1993) *Int J Oncol* **9**: 123-134
52. Crook T, Wrede D, Tidy JA, Mason WP, Evans DJ, Vousden KH (1992) *Lancet* **339**: 1070-1073
53. Scheffner M, Munger K, Byrne JC, Howley PM (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:5523-5527
54. Crook T, Wrede D, Vousden KH (1991) *Oncogene* **6**: 873-875
55. Fujita M, Inoue M, Tanizawa O, Iwamoto S, Enomoto T (1992) *Cancer Res* **52**: 5323-5328
56. Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Nari A, Newcomb EW, Magrath IT, Knowles DM, Dallafavera R (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5413-5417
57. Farrell PJ, Allan G, Shanahan F, Vousden KH, Crook T (1991) *EMBO J* **10**: 2879-2887
58. Bhatia KG, Gutierrez MI, Huppi K, Siwarski D, Magrath IT (1992) *Cancer Res* **52**: 4273-4276
59. Bressac B, Galvin KM, Liang TJ, Isselbacher KJ, Wands JR, Ozturk M (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 1973-1977
60. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC (1991) *Nature (London)* **350**: 427-428
61. Sheu JC, Huang GT, Lee PH, Chung JC, Chou HC, Lai MY, Wang JT, Lee HS, Shih LN, Yang PM, Wang TH, Chen DS (1992) *Cancer Res* **52**: 6098-6100
62. Hollstein MC, Wild CP, Bleicher F, Chutima-tawin S, Harris CC, Srivatanakul P, Montesano R (1993) *Int J Cancer* **53**: 51-55
63. Murakami Y, Hayashi K, Hirohashi S, Sekiya T (1991) *Cancer Res* **51**: 5520-5525
64. Buetow KH, Sheffield VC, Zhu MH, Zhou TL, Shen FM, Hino O, Smith M, McMahon BJ, Lanier AP, London WT, Redeker AG, Govin-

- darajan S (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9622-9626
65. Oda T, Tsuda H, Scarpa A, Sakamoto M, Hirohashi S (1992) *Cancer Res* **52**: 3674-3678
 66. Oda T, Tsuda H, Scarpa A, Sakamoto M, Hirohashi S (1992) *Cancer Res* **52**: 6358-6364
 67. Hollstein MC, Matcalf RA, Welsh JA, Montesano R, Harris CC (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9958-9961
 68. Bennett WP, Hollstein MC, He A, Zhu SM, Resau JH, Trump BF, Metcalf RA, Welsh JA, Midgley C, Lane DP, Harris CC (1991) *Oncogene* **6**: 1779-1784
 69. Hollstein MC, Peri L, Mandard AM, Welsh JA, Montesano R, Metcalf RA, Bak M, Harris CC (1991) *Cancer Res* **51**: 4102-4106
 70. Casson AG, Mukhopadhyay T, Cleary KR, Ro JY, Levin B, Roth JA (1991) *Cancer Res* **51**: 4495-4499
 71. Huang Y, Meltzer SJ, Yin J, Tong Y, Chang EH, Srivastava S, McDaniel T, Boynton RF, Zou ZQ (1993) *Cancer Res* **53**: 1889-1894
 72. Wagata T, Shibagaki I, Imamura M, Shimada Y, Toguchida J, Yandell DW, Ikenaga M, Tobe T, Ishizaki K (1993) *Cancer Res* **53**: 846-850
 73. Bookstein R, Macgrogan D, Hilsenbeck SG, Sharkey F, Allred DC (1993) *Cancer Res* **53**: 3369-3373
 74. Effert PJ, McCoy RH, Walther PJ, Liu ET (1993) *J Urol* **150**: 257-261
 75. Sidransky D, Voneschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, Paul M, Green P, Hamilton SR, Frost P, Vogelstein B (1991) *Science* **252**: 706-709
 76. Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, Kakizoe T, Sasaki H, Sugimura T, Terada M (1992) *Cancer Res* **52**: 1393-1398
 77. Spruck CH, Rideout WM, Olumi AF, Ohneseit PF, Yang AS, Tsai YC, Nichols PW, Horn T, Hermann GG, Steven K, Ross RK, Yu MC, Jones PA (1993) *Cancer Res* **53**: 1162-1166
 78. Fenaux P, Jonveaux P, Quiquandon I, Lai JL, Pignon JM, Loucheux-Lefebvre MH, Bauters F, Berger R, Kerckaert JP (1991) *Blood* **78**: 1652-1657
 79. Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, Magrath IT, Knowles DM, Dallafavera R (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5413-5417
 80. Jonveaux P, Fenaux P, Quiquandon I, Pignon JM, Lai JL, Loucheux-Lefebvre MH, Goossens M, Kerckaert JP, Bauters F, Berger R (1991) *Oncogene* **6**: 2243-2247
 81. Soussi T, Jonveaux P (1991) *Nouv Rev Franç Hematol* **33**: 477-480
 82. Fenaux P, Preudhomme C, Lai JL, Quiquandon I, Jonveaux P, Vanrumbeke M, Sartiaux C, Morel P, Loucheux-Lefebvre MH, Bauters F, Berger R, Kerckaert JP (1992) *Leukemia* **6**: 246-250
 83. Vogelstein B, Kinzler KW (1992) *Nature* (London) **355**: 209-210
 84. Ozturk M, Bressac B, Puisieux A, Kew M, Volkmann M, Bozcall S, Mura JB, Monte S, Carlson R, Blum H, Wands J, Takahashi H, Weizsacker F, Galun E, Kar S, Carr BI, Schroder CH, Erken E, Varinli S, Rustgi VK, Prat J, Toda G, Koch HK, Liang XH, Tang Z, Shouval D, Lee H, Vyas GN, Sarosi I (1991) *Lancet* **338**: 1356-1359
 85. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Ponten J (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10124-10128
 86. Moles JP, Moyret C, Guillot B, Jeanteur P, Guilhou JJ, Theillet C, Bassetseguin N (1993) *Oncogene* **8**: 583-588
 87. Somers KD, Merrick MA, Lopez ME, Incognito LS, Schechter GL, Casey G (1992) *Cancer Res* **52**: 5997-6000
 88. Fearon ER, Vogelstein B (1990) *Cell* **61**: 759-767
 89. Bennett WP, Hollstein MC, Metcalf RA, Welsh JA, He A, Zhu S, Kusters I, Resau JH, Trump BF, Lane D, Harris CC (1992) *Cancer Res* **52**: 6092-6097
 90. Sozzi G, Miozzo M, Donghi R, Pilotti S, Carriani CT, Pastorino U, Porta GD, Pierotti MA (1992) *Cancer Res* **52**: 6079-6082
 91. Thor AD, Moore DH, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihnsaus E, Lynch HT, Marcus JN, Schwartz L, Chen LC, Mayall BH, Smith HS (1992) *J Natl Cancer Inst* **84**: 845-855
 92. Horio Y, Takahashi T, Kuroishi T, Hibi K, Suyama M, Niimi T, Shimokata K, Yamakawa K, Nakamura Y, Ueda R, Takahashi T (1993) *Cancer Res* **53**: 1-4
 93. Myers RM, Larin Z, Maniatis T (1985) *Science* **230**: 1242-1246
 94. Cotton RGH, Rodrigues NR, Campbell RD (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 4397-4401
 95. Montandon AJ, Green PM, Giannelli F, Bentley DR (1989) *Nucl Acids Res* **17**: 3347-3358
 96. Fischer SG, Lerman LS (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 1579-1583
 97. Borresen AL, Hovig E, Sorensen BS, Malkin D, Lystad S, Andersen TI, Nesland JM, Isselbacher KJ, Friend SH (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8405-8409
 98. Orita M, Iwahara H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2766-2770
 99. Orita MY, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989) *Genomics* **5**: 874-879
 100. Condie A, Eeles RA, Borresen A-L, Coles C, Cooper CS, Prosser J (1993) *Human Mutation* **2**: 58-66
 101. Jenkins JR, Currie GA (1984) *Nature* (London) **312**: 651-654
 102. Levine AJ, Momand J, Finlay CA (1991) *Nature* (London) **351**: 453-456
 103. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 2420-2424
 104. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, van Tuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, Whyte R, Vogelstein B (1989) *Science* **244**: 217-221
 105. Bartek J, Iggo R, Gannon J, Lane DP (1990) *Oncogene* **5**: 893-899
 106. Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP (1990) *EMBO J* **9**: 1595-1602
 107. Singh S, Simon M, Meybohm I, Jantke I, Jonat W, Maass H, Goedde HW (1993) *Hum Genet* **90**: 635-640
 108. Davidoff AM, Humphery PA, Iglehart DJ, Marks JR (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5006-5010
 109. Maestro R, Dolcetti R, Gasparotto D, Dogliani C, Pelucchi S, Barzan L, Grandi E, Boiocchi M (1992) *Oncogene* **7**: 1159-1166
 110. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL (1990) *Lancet* **335**: 675-679
 111. Lane DP, Crawford LV (1979) *Nature* (London) **278**: 261-263
 112. Sarnow P, Ho YS, Williams J, Levine AJ (1982) *Cel* **28**: 387-394
 113. Pinhasi-Kimhi O, Michalovitz D, Ben-Zeev A, Oren M (1986) *Nature* (London) **320**: 182-185
 114. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992) *Cell* **69**: 1237-1245
 115. Maltzman W, Czyzyk L (1984) *Mol Cell Biol* **4**: 1689-1694
 116. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW (1991) *Cancer Res* **51**: 6304-6311
 117. Hall PA, Mckee PH, Menage HP, Dover R, Lane DP (1993) *Oncogene* **8**: 203-207
 118. Wynford-Thomas D (1992) *J Pathol* **166**: 329-33
 119. Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Delia D (1988) *Int J Cancer* **41**: 178-183
 120. Iwaya K, Tsuda H, Hiraide H, Tamaki K, Tamakuma S, Fukutomi T, Mukai K, Hirohashi S (1991) *Jpn J Cancer Res* **82**: 835-840
 121. Yamaguchi A, Nakagawara G, Kurosaka Y, Nishimura G, Yonemura Y, Miyazaki I (1993) *Br J Cancer* **68**: 399-402
 122. Wang L, Hong J, Qui S, Gao H, Yang CS (1993)

- Cancer Res* 53: 1783-1787
123. Eccles DM, Brett L, Lessel A, Gruber L, Lane D, Steel CM, Leonard RCF (1992) *Br J Cancer* 65: 40-44
 124. Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F (1992) *Int J Cancer* 50: 683-688
 125. Vojtasek B, Bartek J, Midgley CA, Lane DP (1992) *J Immunol Methods* 151: 237-244
 126. Legros Y, Lacabanne V, D'Agay MF, Larsen C, Pla M, Soussi T (1993) *Bull du Cancer* 80: 102-110
 127. Gusterson BA, Anbazhagan R, Warren W, Midgley C, Lane DP, Ohare M, Stamps A, Carter R, Jayatilake H (1991) *Oncogene* 6: 1785-1789
 128. Kress M, May E, Cassingena R, May P (1979) *J Virol* 31: 472-483
 129. Rotter V, Witte ON, Coffman R, Baltimore D (1980) *J Virol* 36: 547-555
 130. Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD (1982) *Int J Cancer* 30: 403-408
 131. Caron de Fromentel C, May-Levin F, Mouriesse H, Lemerle J, Chandrasekaran K, May P (1987) *Int J Cancer* 39: 185-189
 132. Schlichtholz B, Tredaniel J, Lubin R, Zalcman G, Hirsch A, Soussi T (1994) *Brit J Cancer* 69: 809-816
 133. Davidoff AM, Iglehart JD, Marks JR (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3439-3442
 134. Winter SF, Minna JD, Johnson BE, Takahashi T, Gazdar AF, Carbone DP (1992) *Cancer Res* 52: 4168-4174
 135. Schlichtholz B, Legros Y, Gillet D, Gaillard C, Marty M, Lane D, Calvo F, Soussi T (1992) *Cancer Res* 52: 6380-6384
 136. Lubin R, Schlichtholz B, Bengoufa D, Zalcman G, Tredaniel J, Hirsch A, Caron de Fromentel C, Preudhomme C, Fenaux P, Fournier G, Mangin P, Laurent-Puig P, Pelletier G, Schlumberger M, Desgrandchamps F, Leduc A, Peyrat JP, Janin N, Bressac B, Soussi T (1993) *Cancer Res* 53: 5872-5876
 137. Labrecque S, Naor N, Thomson D, Matlaszewski G (1993) *Cancer Res* 53: 3468-3471
 138. Volkmann M, Muller M, Hofmann WJ, Meyer M, Hagemstein J, Rath U, Kommerell B, Zentgraf H, Galle PR (1993) *Hepatology* 18: 559-565
 139. Nabel EG, Plautz G, Nabel GJ (1990) *Science* 249: 1285-1288
 140. Markowitz D, Goff S, Bank A (1988) *Virology* 167: 400-407
 141. Cornetta K, Morgan RA, Anderson WF (1991) *Hum Gene Ther* 2: 5-14
 142. Berkner KL (1988) *Biotechniques* 6: 616-629
 143. Takahashi T, Carbone D, Takahashi T, Nau MM, Hida T, Linnoila J, Ueda R, Minna JD (1992) *Cancer Res* 52: 2340-2343
 144. Matozaki T, Sakamoto C, Suzuki T, Matsuda K, Uchida T, Nakano O, Wada K, Nishisaki H, Konda Y, Nagao M, Kasuga M (1992) *Cancer Res* 52: 4335-4341
 145. Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, Cai DW, Owen-Schaub LB, Roth JA (1993) *Cancer Res* 53: 4129-4133
 146. Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, Zhang W, Owen-Schaub LB, Roth JA (1994) *Cancer Res* 54: 2287-2291
 147. Lowe SW, Ruley HR, Jacks T, Housman DE (1993) *Cell* 74: 957-967
 148. Hinds PW, Finlay CA, Frey AB, Levine AJ (1987) *Mol Cell Biol* 7: 2863-2869
 149. Sturzbecher WH, Chumakov P, Welch WJ, Jenkins JR (1987) *Oncogene* 1: 201-211
 150. Hainaut P, Milner J (1992) *EMBO J* 11: 3513-3520
 151. Ellis RJ, Hemmingsen SM (1989) *TIBS* 14: 339-342
 152. Bensaude O, Morange M (1983) *EMBO* 2: 173
 153. Young D, Lathigra R, Hendrix R, Sweetser D, Young RA (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4267-4270
 154. Luckacs K V, Lowrie DB, Stokes RW, Colston MJ (1993) *J Exp Med* 176: 343-348
 155. Melief CJM, Kast M (1993) *Curr Opin Immunol* 5: 709-713
 156. El-Deiry WS, Takino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) *Cell* 75: 817-825
 157. El-Deiry, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, Wiman KG, Mercer WE, Kastan MB, Kohn KW, Elledge SJ, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) *Cancer Res* 54: 1169-1174

4th International Congress on Amino Acids Vienna, Austria, August 7-11 th 1995

TOPICS

Chemistry Medicine Biology Nutrition Pharmaceutics

synthesis- biosynthesis-analysis-arginine-homocysteine-metabolism-food chemistry-glutamine-exercise-nephrology-basic chemistry-neurobiology-gastroenterology-plant chemistry and physiology-epilepsy-psychiatry- taurine-free radicals and radiation chemistry- inborn errors-molecular biology-neurochemistry-neurotoxicity-physiology-racemization-microbiology-genetics-pathology-pharmacology-toxicology-geochemistry-peptides-modelling-pharmaceutical chemistry-cardiology-carnitine-natural products-modification of amino acids (phosphorylation, glycosylation...) memory and learning etc.

Prof. Dr. G. Lubec, CChem, FRSC
University of Vienna, Dpt of Paediatrics
A-1090 Vienna, Währinger Gürtel 18, Austria
fax: x43.1.40 400 3238

Receptor estrogenowy: budowa i funkcja w normalnej i neoplastycznej tkance

Estrogen receptor: structure and function in normal and neoplastic tissue

ELŻBIETA KULIG*

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Budowa receptora estrogenowego
 - II-1. Domeny funkcjonalne receptora estrogenowego
 - II-1a. Domeny uczestniczące w transaktywacji
 - II-1b. Domena wiążąca DNA
 - II-1c. Domeny wiążące estrogeny i HSP90
 - II-1d. Domena uczestnicząca w transporcie receptora do jądra komórki
 - II-2. Struktura genu i mRNA receptora estrogenowego
- III. Znaczenie odmian receptora estrogenowego w nowotworach
- IV. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: AhR — receptor dioksyny, ATG — kodon metioniny, miejsce startu translacji, COUP-TF — białko z rodziny receptorów hormonów steroidowych wiążące się z regulatorowym obszarem genu ovalbuminy, DBSF — białko stymulujące wiązanie receptora estrogenowego z DNA, ER — receptor estrogenowy, ERE — sekwencja regulatorowa DNA wiążąca się z receptorem estrogenowym, ERR1 i ERR2 — białka z rodziny receptorów hormonów steroidowych o budowie zbliżonej do receptora estrogenowego, GR — receptor glukokortykoidów, GRE — sekwencja regulatorowa DNA wiążąca się z receptorem glukokortykoidów, HRE — ogólne określenie sekwencji regulatorowych DNA wiążących się z receptorami hormonów steroidowych, HSP90 — białko szoku cieplnego 90, NUR-77 — białko z rodziny receptorów hormonów steroidowych o nieznannej funkcji, PRE — sekwencja regulatorowa DNA wiążąca się z receptorem progesteronowym, RARE — sekwencja regulatorowa DNA wiążąca się z receptorem kwasu retinowego, TGA — kodon nonsensowny, sygnał zakończenia translacji, TRE — sekwencja regulatorowa DNA wiążąca się z receptorem tyroksyny.

I. Wstęp

Receptor estrogenowy (ER) jest białkowym czynnikiem transkrypcyjnym, indukowanym przez swój ligand. Wraz z receptorami innych steroidów, receptorami kwasu retinowego i tyroksyny, a także receptorami o podobnej strukturze lecz nieznanymi jeszcze ligandami (ang. *orphan receptors*) tworzy, jak mówimy,

Contents:

- I. Introduction
- II. Estrogen receptor structure
 - II-1. Functional domains of the estrogen receptor protein
 - II-1a. Transactivation domain
 - II-1b. DNA binding domain
 - II-1c. Estrogen and HSP90 binding domains
 - II-1d. Nuclear translocation signal
 - II-2. Estrogen receptor gene and messenger RNA
- III. The role of estrogen variants in neoplastic tissues
- IV. Final remarks

rodzinę białek wiążących DNA.

Badania nad cząsteczkami białek wchodzących w skład rodziny receptorów steroidowych [1-3] umożliwiają stworzenie ogólnego schematu ich budowy. Wyróżnia się domeny odpowiedzialne za trzy główne funkcje receptorów steroidowych tj. za 1. transaktywację genów, 2. przyłączanie do specyficznych sekwencji DNA-HRE (ang. *hormone responsive element*), 3. wiązanie ligandu, a także za oddziaływania regulujące transport do jądra komórkowego, z białkami szoku cieplnego i za inne oddziaływania międzybiałkowe. Receptory hormonów steroidowych są zlokalizowane w cytoplazmie lub jądrze komórkowym i tam wiążą się ze swoimi ligandami. Przyłączenie ligandu może aktywować różne funkcje receptorów. Na przykład receptor glukokortykoidów (GR) jest białkiem cytoplazmatycznym, którego wszystkie funkcje: transport do jądra, wiązanie DNA i transaktywacja, są zależne od wiązania hormonu. Receptor estrogenowy jest przenoszony do jądra komórki i związany z DNA bez udziału liganda. Przyłączenie estradiolu umożliwia transaktywację genu. Przyłączenie hormonu do receptora tyroksyny nie jest niezbędnym warunkiem translokacji receptora do jądra, związania z DNA ani też regulacji transkrypcji. Po związaniu hormonu zmienia się wpływ receptora na ekspresję odnośnych genów: zamiast hamowania transkrypcji, obserwuje się jej aktywację. Receptory tyroksyny i witaminy D₃, w przeciwieństwie do receptorów estrogenowego, progesteronowego i glukokortykoidów, nie wiążą się z HSP90 (ang. *heat shock protein 90*) [4].

* Dr, Katedra i Zakład Biochemii, Akademia Medyczna we Wrocławiu 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 10

Ten przykład wskazuje, że — mimo bardzo wielu podobieństw — receptory hormonów steroidowych istotnie różnią się sposobem funkcjonowania w komórce.

Jeszcze mniej wiadomo o działaniu receptorów o nieznanym ligandach — jak na przykład ERR1, ERR2 (ang. *estrogen receptor related 1* lub *2*) [5], COUP-TF (ang. *chicken ovalbumin upstream promoter — transcription factor*), NUR-77 (ang. *nuclear receptor-77*) [1]. Wszystkie zawierają palce cynkowe typu II, jako domenę wiążącą DNA. Mimo sklonowania i poznania sekwencji cDNA nie wiadomo niemal nic o ich funkcji biologicznej. Wstępne dane na temat COUP-TF sugerują jego udział w aktywacji transkrypcji genu insuliny i proopiomelanokortyny. Białka rodziny receptorów steroidów występujące u różnych gatunków zwierząt uczestniczą również w procesach różnicowania. Na przykład czynnik transkrypcyjny "seven-up" u *Drosophila melanogaster*, odpowiedzialny za różnicowanie komórek siatkówki, ma bardzo podobną sekwencję jak ludzki COUP-TF [1]. Znalezienie ligandów i przypisanie biologicznej funkcji tak wielu białkom o charakterze receptorów hormonów steroidowych wymaga jeszcze wielu badań.

Niniejszy artykuł jest poświęcony dość dobrze poznanemu receptorowi estrogenowemu, a szczególnie budowie i zaburzeniom funkcji różnych jego form w komórkach nowotworowych.

II. Budowa receptora estrogenowego

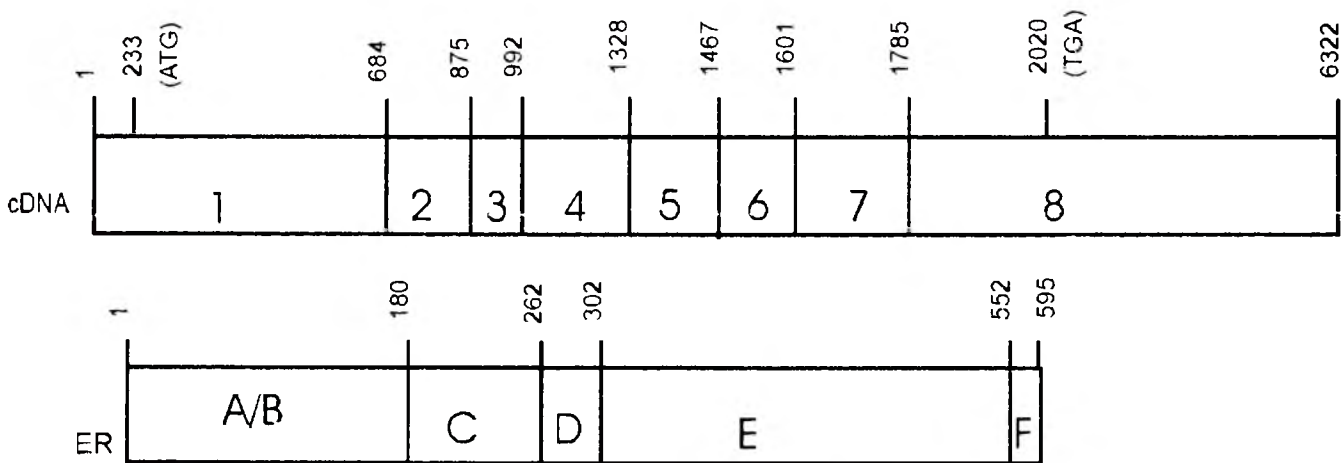
II-1 Domeny funkcjonalne receptora estrogenowego

Ludzki receptor estrogenowy [6] jest zbudowany z sześciu domen funkcjonalnych. N-końcowy fragment cząsteczki, kodowany przez eksony 1 i 2, zawiera domeny A i B, odpowiedzialne za transaktywację. Domeny C i D rozpoznają i wiążą sekwencję ERE (ang. *estrogen response element*) w regulatorowych

fragmentach genów. Są one kodowane przez część eksonu 2 i ekson 3. Domena D zawiera sekwencję odpowiedzialną za transport receptora do jądra komórki. C-końcowy fragment receptora estrogenowego kodowany przez eksony 4, 5, 6, 7, i 8 (domena E i F), jest miejscem wiązania hormonu i białka HSP90, oraz uczestniczy w tworzeniu dimerów receptora (Ryc. 1). W badaniach porównawczych stwierdzono dużą homologię sekwencji kodujących receptor estrogenowy w genomach człowieka i szczura. Sekwencje domen A, C i D są identyczne, a w pozostałych fragmentach genów receptora estrogenowego homologia wynosi od 73% do 96% [6-7].

II-1a. Domeny uczestniczące w transaktywacji

Doświadczenia przeprowadzone na mutantach delecyjnych receptora estrogenowego doprowadziły do wyodrębnienia fragmentów TAF1 i TAF2 (ang. *trans-activation function*), bezpośrednio zaangażowanych w aktywację transkrypcji. Białko receptora pozbawione C-końcowej domeny E aktywuje ekspresję genów, lecz ta aktywacja nie jest regulowana przez hormon. Dodatkowe delecje w N-końcowej części białka pozwoliły wykazać, że najmniejszy niezbędny do transaktywacji fragment białka to odcinek od 1 do 185 aminokwasu (TAF1). Stopień aktywacji transkrypcji przez opisane mutanty receptora waha się od kilku do stu procent wartości otrzymywanych w przypadku normalnego receptora estrogenowego i zależy od warunków eksperymentu oraz typu zastosowanego promotora. Na przykład w komórkach HeLa fragment TAF1 powoduje jedynie 5% transaktywacji, w fibroblastach zarodków kurzych — 58%, a w komórkach GC — blisko 100%, w porównaniu z aktywacją poprzez nie zmodyfikowany receptor w tym samym układzie modelowym [8-9]. Sugeruje to, że receptor estrogenowy osiąga pełną aktywność po interakcji z białkami specyficznymi dla niektórych promotorów



Ryc. 1. cDNA i białko ludzkiego receptora estrogenowego. W schemacie cDNA wyróżniono poszczególne eksony i miejsca startu (ATG) i końca translacji (TGA). Zaznaczono podział białka receptora estrogenowego na domeny. Domena A/B odpowiada za transaktywację, domena C — za wiązanie z DNA, domena D — za transport receptora do jądra, domena E/F — za wiązanie z estrogenami i HSP90. Przedstawione cDNA i białko odpowiada formie 1 mRNA (patrz Ryc. 3).

i obecnymi w wybranych tkankach [10]. Białka wiążące się z receptorem estrogenowym mogą też być inhibitorami jego aktywności. W komórkach drożdży zidentyfikowano białko o funkcji represora receptora estrogenowego [11], działające na fragment TAF1. Specyficzna tkankowo ekspresja represora mogłaby wyjaśnić zmienną aktywność receptora w różnych tkankach. W aktywacji transkrypcji uczestniczy też fragment TAF2, zlokalizowany w domenie wiążącej hormon [12]. W przeciwieństwie do domeny A/B aktywacja jest w tym przypadku zależna od przyłączenia liganda. Podobną strukturę zdolną do transaktywacji zlokalizowano też w domenie wiążącej ligand receptora glukokortykoidów [13]. W normalnej części receptora estrogenowego fragmenty TAF1 i TAF2 współpracują w procesie transaktywacji po przyłączeniu ligandu. Jest to prawdopodobnie uzależnione od zmiany konformacji wywołanej przyłączeniem estradiolu, która umożliwia reakcję z innymi białkami w kompleksie inicjacji transkrypcji [14]. Związki syntetyczne — jak hydroksytamoksyfen (agonista/antagonista) lub ICI 164 384, (antagonista, syntetyczny analog estradiolu z podstawnikiem w pozycji C7), po związaniu się z receptorem, prawdopodobnie uniemożliwiają przybranie całkowicie prawidłowej konformacji. Taka hipoteza może tłumaczyć np. odmienną wrażliwość genu katepsyny D na wymienione substancje. W odróżnieniu od ICI 164 384, hydroksytamoksyfen (podobnie jak estradiol), aktywuje transkrypcję mRNA katepsyny D [15].

II-1b. Domena wiążąca DNA

Domena C wiążąca DNA jest zbudowana z 84 aminokwasów [16]. Odcinek 66 aminokwasów w domenie C (pozycje 185-250) kształtuje dwa palce cynkowe typu II, w których atom cynku jest kompleksowany przez grupy tiolowe czterech cystein. Typ II palców cynkowych jest charakterystyczny dla całej rodziny receptorów hormonów steroidowych. Typ I palców cynkowych występuje w innych czynnikach transkrypcyjnych, podobnych do TFIIIA, w których atom cynku jest kompleksowany przez dwie reszty tiolowe cysteiny i dwie reszty imidazolowe histydyny [1]. Domena C zawiera też odcinek 12 aminokwasów zasadowych (pozycje 251-262), uczestniczących w oddziaływaniu z białkiem HSP90. Fragment domeny C bezpośrednio oddziałujący z DNA składa się z dwóch odcinków, odpowiadających dwóm palcom cynkowym. Odcinek CI określa specyficzność wiązania z DNA, a CII stabilizuje wiązanie receptora poprzez oddziaływanie z resztami fosforanowymi DNA [17]. Badania przy użyciu przeciwciał rozpoznających obszary CI lub CII wykazały, że receptor estrogenowy może wiązać się z sekwencją ERE zarówno jako monometr jak i jako dimer, a także niezależnie od przyłączenia HSP90 [18]. Wykazano, że kompleks ER/HSP90 jest rozpoznawany przez przeciwciała spe-

cyficzne z CI lub z CII. Wnioskuje się, że nawet w kompleksie z HSP90, palce cynkowe są odsłonięte, dostępne dla DNA. Natomiast po przyłączeniu DNA, kompleks ER/HSP90 nie był już rozpoznawany przez przeciwciała [18]. Analizując kinetykę tworzenia kompleksu ER/ERE można wnioskować, że receptor estrogenowy wiąże się z DNA w równomolowych ilościach [19-20]. Wiązanie to jest niezależne od obecności estradiolu, który stabilizuje powstały kompleks. Wyniki te popierają hipotezę, według której receptor estrogenowy wiąże się z DNA, albo jako monomer albo w formie heterodimeru.

Przedstawiona powyżej hipoteza jest sprzeczna z obowiązującym dotychczas poglądem, według którego receptor estrogenowy wiąże się z DNA jako homodimer. Zwraca się uwagę na odmienne warunki eksperymentów, których wyniki są podstawą do sformułowania obu hipotez. Dawniejsze doświadczenia prowadzono w warunkach dużego nadmiaru homogennej postaci receptora estrogenowego, otrzymanego w translacji *in vitro* [21]. W późniejszych eksperymentach [19] użyto niehomogennej postaci receptora izolowanego z naturalnych źródeł. Wiązanie receptora estrogenowego z DNA może wtedy przebiegać przy udziale niewielkich ilości innych białek obecnych w jądrze komórkowym. Obserwowano też, że wiązanie receptora z sekwencją ERE jest wzmocnione po dodaniu do reakcji ekstraktu z jąder komórek nie zawierających receptora [22]. W komórkach drożdży i komórkach linii HeLa zidentyfikowano białko o masie 45 kDa (DBSF-ang. *DNA binding stimulating factor*), ułatwiające wydajne tworzenie kompleksu ER/ERE [23]. Według wyników innych doświadczeń [19], receptor estrogenowy znacznie trudniej oddysocjuje od DNA w obecności estradiolu. Opisane obserwacje wspierają hipotezę, według której estrogeny uczestniczą w tworzeniu kompleksów receptora z innymi białkami jądra komórkowego, a nie jedynie z DNA. Wyniki doświadczeń nad tworzeniem heterodimerów receptora kwasu retinowego i tyroksyny i ich wiązaniem z DNA [1] pozwalają przypuszczać, że przedstawiona hipoteza może dotyczyć całej rodziny receptorów steroidowych. Stwierdzono też, że ekstrakty z jąder komórek stabilizują wiązanie receptorów progesteronu, kwasu retinowego i tyroksyny z DNA [24-26].

Sekwencje DNA rozpoznawane przez receptory hormonów steroidowych są niejednokrotnie bardzo podobne (Ryc. 2). Zlokalizowane są one najczęściej w rejonie wzmacniacza, rzadziej w promotorze — np. sekwencja ERE występująca w promotorze genu vitelogeniny. Mają one strukturę palindromu z różną liczbą nukleotydów oddzielających obie jego połowy [27]. Pośrodku palindromu ERE znajduje się reszta adeniny. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że receptor estrogenowy rozpoznaje i specyficznie wiąże pojedynczą nić DNA (komplementarną do przedstawionej na rycinie 2), z resztą tyminy pośrodku palindromu [28]. Receptor glukokortykoidów i progesteronowy rozpo-

GRE/PRE	5' PuGAACA/- - NNN - /TGTTCPy3'
ERE	5' AGGTCA/C- - A - G /TGACCT 3'
TRE	5' AGATCA/GGGACG/TGACCT3'
RARE	5' AGTTCA/GCGAGA/GTTCAG3'

Ryc. 2. Regulatorowe sekwencje DNA specyficznie wiążące się z następującymi receptorami hormonów steroidowych: GRE/PRE — z receptorami glukokortykoidów i progesteronów, ERE — z receptorem estrogenowym, TRE — z receptorem tyroksyny, RARE — z receptorem kwasu retinowego. Symbol (-) oznacza brak nukleotydu i został wprowadzony w celu uwidocznienia homologii sekwencji, N oznacza dowolny nukleotyd.

znają identyczną sekwencję DNA, a jednak regulują ekspresję różnych genów prowadząc do różnych efektów biologicznych. Jest to możliwe albo poprzez udział innych białek w tworzeniu kompleksów inicjacji transkrypcji, albo dzięki specyficznej tkankowo ekspresji obu receptorów.

II-1c. Domena wiążąca estrogeny i HSP90

Funkcja wiązania estradiolu jest zlokalizowana w domenie E receptora estrogenowego (aminokwasy 516-524), podobnie jak zdolność tworzenia dimerów (aminokwasy w pozycjach 500-520) [21] [29-30] i wiązania białka HSP90 [31]. Jak już wspomniano powyżej, w oddziaływaniu z HSP90 uczestniczy też fragment domeny C receptora, składający się z aminokwasów o charakterze zasadowym (pozycje 251-271). Usunięcie tego fragmentu białka uniemożliwia wiązanie HSP90 mimo nienaruszonej domeny wiążącej hormon. Prawdopodobnie fragment ten oddziałuje wiązaniem jonowymi z domeną A białka HSP90, zbudowaną z kwaśnych, ujemnie naładowanych, aminokwasów. Delecje małych fragmentów domeny E nie zaburzyły wiązania z HSP90, lecz jej całkowite usunięcie uniemożliwiło utworzenie kompleksu. Wypływa stąd wniosek, że natywna konformacja całej domeny E jak i obecność zasadowego odcinka domeny C receptora estrogenowego są niezbędne do prawidłowego oddziaływania z HSP90. Podobny mechanizm tworzenia kompleksu z HSP90 opisano w przypadku receptora progesteronowego [32]. W przypadku receptora glukokortykoidów istnienie natywnej domeny E wystarcza do utworzenia kompleksu z białkiem szoku cieplnego. Kompleks HSP90/GR może także powstać przy delecji obszaru z pogranicza domen C i D receptora glukokortykoidów [31] [33].

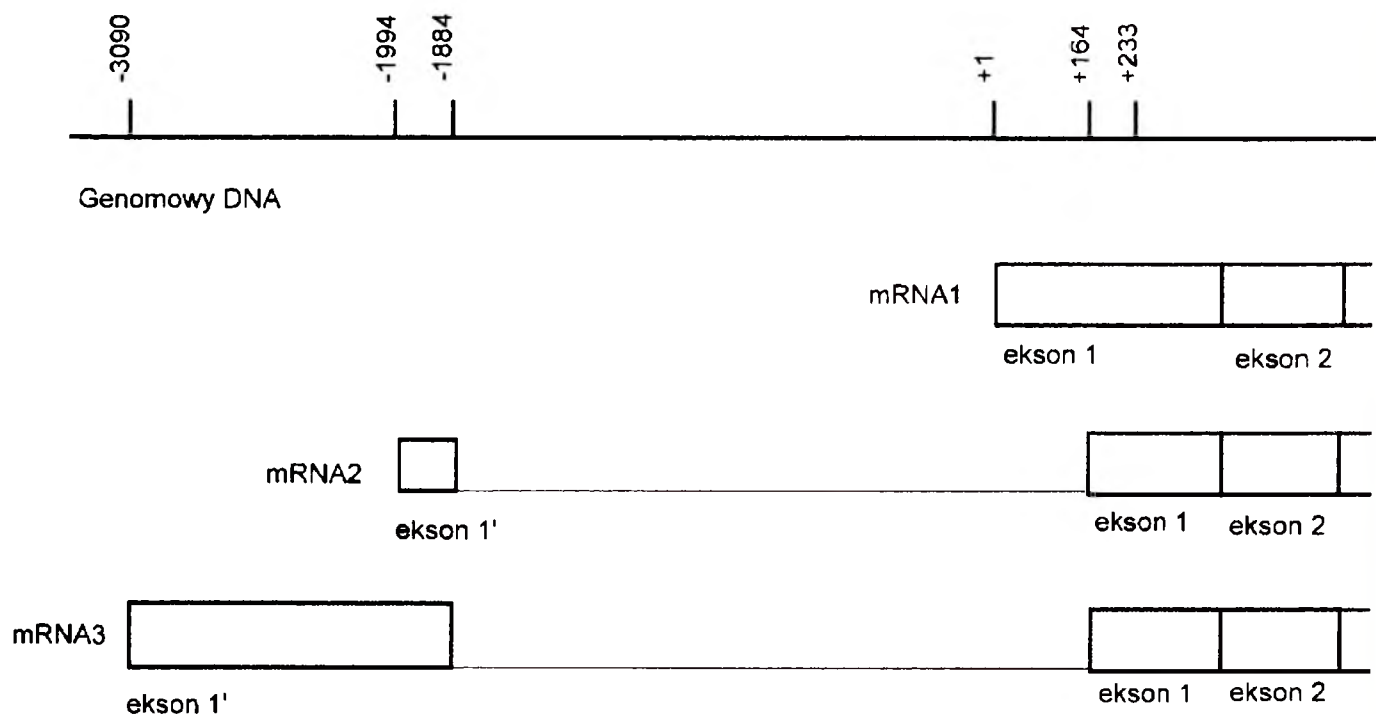
II-1d. Domena uczestnicząca w translokacji do jądra komórkowego

Domena D receptora estrogenu zawiera sygnał lokalizacji jądrowej (aminokwasy 256-303), nakładają-

cy się z rejonem wiązania HSP90. Sygnał lokalizacji jądrowej receptora estrogenowego jest zbudowany z trzech szeregów zasadowych amonokwasów [34] o sekwencji bardzo podobnej z sekwencją sygnału lokalizacji jądrowej antygeny T wirusa SV40. Wykazano znaczną homologię fragmentu receptora estrogenowego odpowiedzialnego za lokalizację w jądrze komórki u różnych gatunków zwierząt [31]. W przeciwieństwie do receptora glukokortykoidów [4], receptor estrogenowy nie zawiera w domenie E wiążącej hormon drugiej sekwencji odpowiedzialnej za transport do jądra. Prawdopodobnie dlatego receptor estrogenowy jest zawsze obecny w jądrze komórki, a receptor glukokortykoidów nagromadza się tam dopiero po przyłączeniu hormonu. Receptor progesteronowy jest także, jak estrogenowy, zawsze obecny w jądrze komórki [35].

II-2. Struktura genu i mRNA receptora estrogenu

Długość domeny genu receptora estrogenowego u człowieka wynosi około 140 kilozasad. Do niedawna sądzono, że gen estrogenowy u człowieka [6], podobnie jak u zwierząt innych gatunków [7] [36], jest zbudowany z 8 eksonów przedzielonych intronami. W genomie myszy [36] wykryto dodatkowy ekson w kierunku 5' od startu transkrypcji i nazwano go — ekson 1'. Dodatkowe miejsca startu transkrypcji wykryto też w genach innych receptorów hormonów steroidowych, jak w receptorze progesteronowym, witaminy D₃, tyroksyny i kwasu retinowego [37]. Dokładna analiza sekwencji ludzkiego genu estrogenowego, aż do 3 tysięcy nukleotydów w kierunku 5' od miejsca startu transkrypcji, wykazała także obecność dwóch dodatkowych miejsc startu transkrypcji i dodatkowego eksonu 1' [37-39] (Ryc. 3). Dla ułatwienia, umownie, zachowano uprzednią numerację nukleotydów w DNA przyjmując początek eksonu 1 w miejscu +1. Dodatkowy ekson 1' zaczyna się w pozycji -3090 i kończy w pozycji -1884, zawiera dwa miejsca startu transkrypcji — od nukleotydu -1994 i jeszcze dalej w kierunku 5', w pozycji -3090. Opisana struktura genu umożliwia powstanie trzech form mRNA. Forma 1 o długości 6322 nukleotydów rozpoczyna się w pozycji +1. Transkrypcja formy 2 mogłaby się rozpocząć w pozycji -1994 i długość cząsteczki wynosiłaby 6268 nukleotydów, zakładając podobny sposób składania RNA jak przy tworzeniu mRNA3. Tak niewielka różnica w długości mRNA nie jest możliwa do zauważenia w analizie *Northern blot*. Jedynie zastosowanie sekwencjonowania pozwoli z całkowitą pewnością potwierdzić istnienie mRNA2. Forma mRNA3, rozpoczynająca się w pozycji -3090, ma przewidywaną długość 7364 nukleotydów. Wycięcie intronu 1' odbywa się poprzez usunięcie sekwencji od -1884 do +164. W komórkach raka sutka MCF7 wykryto doświadczalnie dwie formy mRNA receptora estrogenu, o długości około 6,3 i 7,3 kilozasad, które od-



Ryc. 3. Struktura genu ludzkiego receptora estrogenowego w rejonie eksonów 1' i 1. Na schemacie wykazano trzy możliwe miejsca startu transkrypcji i składanie RNA.

powiadałyby formom 1 i 3 [37]. Także w normalnej i neoplastycznej przysadce szczura [40] wykryto w obu przypadkach dwie formy receptorowanego mRNA o długości około 6.5 i 7.5 kb. Występowanie dwóch różnych białkowych form receptora estrogenowego opisano w przysadce [41]. W laktotropach i somatotropach wykryto formę 50-55 kDa, a w gonadotropach -65 kDa. Można przypuszczać, że pojawienie się różnych transkryptów jest regulowane specyficznie w różnych typach komórek i powstałe na ich matrycy formy białka mogą mieć nieco odmienne funkcje biologiczne. Tym niemniej hipoteza ta wymaga dalszej weryfikacji eksperymentalnej, ponieważ obserwowane formy białkowe mogą także powstawać w wyniku zmian posttranslacyjnych jak np. proteoliza lub zmiana ładunku i ruchliwości elektroforetycznej poprzez fosforylację.

Bardzo niewiele wiadomo o strukturze promotora genu receptora estrogenowego i przez to o regulacji jego transkrypcji. Regulacja ekspresji genu receptora ma istotne znaczenie dla zrozumienia jego roli w biologii tkanek wrażliwych na estrogeny, a także patogeny ich nowotworów. Na przykład specyficzne hamowanie transkrypcji może doprowadzić do fenotypu ER(-), jak w przypadku komórek raka sutka, MDA-MB-231 [42], u których nie stwierdzono występowania mutacji genu ER. Po transfekcji tych komórek plazmidem, zawierającym gen ER pod kontrolą wczesnego promotora wirusa SV40 [43], obserwowano pojawienie się białka receptora i zmianę morfologii w kierunku bardziej zróżnicowanego fenotypu.

Stwierdzono hamowanie ekspresji genu receptora estrogenowego przez estradiol [40], ale nie wiadomo

czy jest to działanie bezpośrednie, czy sekwencja ERE jest obecna w promotorze lub wzmacniaczu genu ER. Analizując podobieństwo do typowych sekwencji w genetycznych bazach danych [39] [44], wykryto w niekodującym fragmencie 5' obecność elementów rozpoznawanych przez czynniki transkrypcyjne AP1, AP2 i Spl, a także receptor dioksyny AhR (ang. *aryl hydrocarbon receptor*). Dioksyna i jej pochodne są jednymi z najbardziej toksycznych związków z grupy halogenowych pochodnych węglowodorów aromatycznych, które zanieczyszczają środowisko. Działając poprzez receptor dioksyny zmieniają ekspresję genów cytochromów P-450 (P-450 1A1) [45] i receptora estrogenu [46]. Wykazano, że oprócz promowania wzrostu nowotworów, dioksyna zaburza przebieg cyklu miesięcznego u kobiet — prawdopodobnie poprzez obniżenie ekspresji receptora estrogenowego [46].

III. Znaczenie odmian receptora estrogenowego w biologii nowotworów

Estrogeny regulują proliferację komórek w tkankach wrażliwych na ten hormon oraz wpływają na ich różnicowanie. Estrogeny działają na komórki za pośrednictwem swojego receptora, wszelkie zatem zmiany jego składu i struktury, ilości w komórce oraz zaburzenia w działaniu, mogą być przyczyną zaburzenia prawidłowej funkcji tkanki. W nowotworach zależnych od estrogenów [47] bardzo często stwierdza się obecność różnych form receptora estrogenowego, powstałych na skutek mutacji punktowych lub przesunięcia ramki odczytu, delecji i błędów w dojrzewaniu RNA, albo też zmian posttranslacyjnych. Zmienione formy białka receptora często zachowują się w sposób

określany albo jako mutanty dominujące negatywnie, albo jako mutanty dominujące pozytywnie. Pod pojęciem mutantu dominującego negatywnego rozumie się białko, które samo nie ma zdolności do transaktywacji i co więcej, blokuje aktywność normalnego receptora, gdy są one równocześnie obecne w komórce. Forma dominująca pozytywna wykazuje aktywność nawet w nieobecności liganda.

Wrażliwość tkanek nowotworowych na estrogeny i zmiana mechanizmu działania receptora estrogenowego bardzo istotnie wpływa na wynik leczenia przy pomocy hormonoterapii. Poddają się jej jedynie nowotwory zawierające prawidłowy receptor estrogenowy. Jednak wraz z upływem czasu, większość nowotworów staje się odporna na estrogeny i substancje o działaniu antagonistycznym w stosunku do estrogenów, i w efekcie następuje stopniowa przemiana w mniej zróżnicowany, bardziej złośliwy fenotyp. Przypuszcza się, że mutacje genu receptora estrogenowego mogą przynajmniej w części odpowiadać za ten proces. Ponadto wykazano, że blisko 30% nowotworów sutka wykazujących obecność receptorów estrogenowego i progesteronowego i blisko 70% nowotworów sutka o fenotypie ER(+)/PR(-) nie jest wrażliwa na hormonoterapię [48]. Diagnostyczne testy, przy pomocy których stwierdza się obecność receptorów estrogenowego lub progesteronowego, są oparte na zasadzie wiązania ligandu. Wiele zmutowanych form receptorów zachowuje zdolność wiązania ligandu, lecz ich funkcjonowanie nie jest prawidłowe. Dodatkowe testy, analizujące obecność najczęściej spotykanych mutantów receptora estrogenowego w wycinku tkanki nowotworowej, pozwoliłyby szybciej zastosować w takich przypadkach inną metodę leczenia. Niektóre nowotwory estrogen, przeciwnie, pobudza do wzrostu. W takich przypadkach również korzystne byłoby wczesne stwierdzenie tego faktu i zastosowanie terapii prowadzącej do unieczynnienia receptora estrogenu. Pewne znaczenie dla stworzenia teoretycznych podstaw takiej terapii mogą mieć badania nad dominującymi negatywnymi mutantami receptora estrogenowego.

Większość opublikowanych badań nad mutantami receptora estrogenowego dotyczy nowotworów sutka [47] [49], a ostatnio doniesiono o identyfikacji mutantów receptora w oponiakach [50] i nowotworach endometrium [51].

Mutacje punktowe receptora estrogenowego zidentyfikowane podczas testowania wielu nowotworów [47], często mają charakter milczący, to znaczy nie powodują zmiany sekwencji aminokwasów. Mutacja punktowa wykryta w domenie B receptora estrogenowego w raku sutka u myszy [52], prowadząca do zamiany aminokwasu, utworzyła dodatkowe miejsce rozpoznawane przez endogenne proteazy. Jest to prawdopodobnie przyczyna pojawiania się białka o masie 50 kDa zamiast białka o masie 65 kDa. Obserwowano wzrost ilości skróconej postaci receptora estrogenowego w mysich komórkach nowotworowych w miarę

progresji do formy niezależnej od estrogenu. Mutacje punktowe wykryte w linii komórkowej raka sutka T47D powodują przesunięcie ramki odczytu i wprowadzenie kodonu terminacji. Powstałe białko jest krótsze i kończy się za domeną C lub w domenie E [52]. W komórkach T47D wykryto też zmutowaną postać receptora estrogenowego z delecją domeny D i dużej części domeny E. Linia komórkowa T47D jest niewrażliwa na obecność estrogenu i wykazuje fenotyp ER(-)/PR(+). Inna mutacja punktowa w ludzkim receptorze estrogenowym w kodonie 257 prowadzi do wymiany alaniny na walinę i powoduje osłabienie wiązania estradiolu [53].

Analiza mRNA receptora estrogenowego w tkankach nowotworowych ujawniła istnienie szeregu jego odmian, a co za tym idzie, zmodyfikowanych form białka, z brakującymi eksonami 3, 4, 5 lub 7 [54-57]. Delecje całych eksonów są najprawdopodobniej skutkiem nieprawidłowego składania RNA. Delecja eksonu 3 w mRNA [54] (kodującego drugi palec cynkowy) uniemożliwia przyłączanie się takiego białka do sekwencji ERE. Forma ta hamuje transaktywację przez normalny receptor, czyli zachowuje się jak mutant dominujący negatywny. Brak eksonu 4 [55] kodującego domenę D i fragment domeny E pozwala przypuszczać, że produkt białkowy genu może nagromadzać się w cytoplazmie ze względu na brak sygnału transportu do jądra komórki. Jednak, ponieważ taka postać receptora estrogenowego nie asocjuje z HSP90 w duże kompleksy 8-9 S, będzie prawdopodobnie także zdolna do biernej dyfuzji do jądra komórkowego i wiązania DNA. Oprócz raka sutka wykryto ostatnio taką formę w oponiakach [50]. Delecja eksonu 5 w genie ER [56] upośledza zdolność przyłączania hormonu do powstałego białka receptora. Taka odmiana receptora estrogenowego wykazuje zdolność do transaktywacji także w nieobecności ligandu (mutant dominujący pozytywny) w komórkach nowotworów sutka o fenotypie ER(-)/PR(+) [56]. Receptor taki nie będzie wykrywany w testach opartych na wiązaniu liganda. Umożliwia on tkance nowotworowej uzyskanie niezależności od regulacji hormonalnej i nabycie odporności na hormonoterapię polegającą na usunięciu jajników, hamowaniu aktywności aromatazy lub podawaniu antyestrogenów. Podobne zjawisko uzyskania niezależności hormonalnej przez nowotwory opisano też w innych tkankach, w których mutacji uległa domena wiążąca ligand w receptorze androgenów i receptorze tyroksyny [58, 59]. Białko receptora estrogenowego powstałe na matrycy transkryptu bez eksonu 7 [50] [57] nie wykazywało zdolności do transaktywacji, a jednocześnie hamowało działanie prawidłowej formy receptora — czyli zachowywało się jako mutant dominujący negatywny.

W badaniach modelowych indukowano mutacje w określonych regionach genu ER [60] i analizowano czy otrzymane mutanty są dominujące negatywne czy

dominujące pozytywne. Wykazano, że w mutantach dominujących negatywnych, hamujących aktywność normalnego receptora aż w 80% (przy równomolowym stosunku obu form), mutacje dotyczyły fragmentu TAF2 (aminokwasy 530-555). Wywołane mutacje polegały na zastąpieniu pojedynczych aminokwasów lub na przesunięciu ramki odczytu, albo była to delecja fragmentu TAF2. Dla porównania, formy receptora estrogenowego powstałe w wyniku delecji eksonu 3 lub 7 wyraźnie słabiej hamowały aktywność normalnego receptora (40-60%) w takich samych stosunkach moliowych. Mutacje, indukowane jedynie w regionie wiążącym hormon (aminokwasy 516-524) w domenie E, nie aktywowały transkrypcji, ale też nie blokowały aktywności prawidłowej formy receptora. Zjawisko blokowania aktywności natywnych receptorów przez ich mutanty dominujące negatywne opisano też w przypadku receptora tyroksyny [61] i kwasu retinowego [62].

Zaproponowano kilka możliwych wyjaśnień mechanizmu działania opisanych mutantów [60]. Zmienione formy receptorów mogą konkurować o miejsce wiązania z DNA z normalnym receptorem. Nie stwierdzono aby mutanty dominujące negatywne receptora estrogenowego miały większe powinowactwo do DNA, niż forma normalna. Konkurencja o sekwencję ERE mogłaby jedynie mieć miejsce przy znacznej przewadze zmodyfikowanej postaci receptora w komórce. Inny mechanizm, to uniemożliwienie syntezy RNA poprzez związanie normalnego receptora lub innych białek z kompleksu inicjującego transkrypcję, które występują w komórce w stężeniach mniejszych niż optymalne. Często w piśmiennictwie sugeruje się powstawanie nieaktywnych dimerów normalnej i zmienionej formy receptora [60]. Taki kompleks nie wiąże się z sekwencją HRE. Wreszcie ostatnim z możliwych mechanizmów działania dominujących negatywnych odmian receptorów może być nieprawidłowa interakcja z innymi czynnikami transkrypcyjnymi w już utworzonym kompleksie inicjacji syntezy mRNA. Wszystkie opisane hipotezy są prawdopodobne, ale wymagają potwierdzenia w wynikach doświadczeń.

IV. Podsumowanie

Estrogeny wpływają na podział komórek i różnicowanie tkanek. Działają za pośrednictwem białkowego receptora aktywując ekspresję genów zawierających sekwencję ERE w części regulatorowej. W procesie transaktywacji ekspresji genów współuczestniczą inne białka obecne w jądrze komórkowym. Dzięki temu działanie receptora estrogenowego podlega kontroli w różnych tkankach, a także w kompleksach inicjacji transkrypcji o różnym składzie białkowym.

Ze względu na kluczową rolę estrogenów w biologii wielu tkanek, wszelkie zmiany w ilości i strukturze receptora estrogenowego mogą prowadzić do zjawisk patologicznych jak np. choroba nowotworowa. Znajomość powiązania struktury i funkcji normalnego rece-

ptora, a także wyjaśnienie jak zmiany struktury zaburzają jego funkcję prowadząc do zmian chorobowych może być pomocne przy wyborze metod leczenia.

Artykuł otrzymano 23 marca 1994 r.

Zaakceptowano do druku 30 czerwca 1994 r.

Piśmiennictwo

- O'Malley B (1990) *Mol Endocrinol* **4**: 363-369
- O'Malley BW, Conneely OM (1992) *Mol Endocrinol* **6**: 1359-1361
- Sokół-Misiak W (1992) *Post Biochem* **38**: 12-23
- Picard D, Yamamoto KR (1987) *EMBO J* **6**: 3333-3340
- Gigverre V, Yang N, Segni P, Evans RM (1988) *Nature (London)* **331**: 91-94
- Ponglikitmongkol M, Green S, Chambon P (1988) *EMBO J* **7**: 3385-3388
- Koike S, Sakai M, Muramatsu M (1987) *Nucleic Acid Res* **15**: 2499-2513
- Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P (1989) *Cell* **59**: 477-487
- Adler S, Waterman ML, He X, Rosenfeld M (1988) *Cell* **52**: 685-695
- Tora L, Gaub MP, Mader S, Deierich A, Bellard M, Chambon P (1988) *EMBO J* **7**: 3771-3778
- McDonnell D, Vegeto E, O'Malley BW (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10563-10567
- Webster NJG, Green S, Tasset D, Ponglikitmongkol M, Chambon P (1989) *EMBO J* **8**: 1441-1446
- Hollenberg SM, Evans RM (1988) *Cell* **55**: 899-906
- Berry M, Metzger D, Chambon P (1990) *EMBO J* **9**: 2811-2818
- Chalbos D, Philips A, Galtier F, Rochefort H (1993) *Endocrinology* **133**: 571-576
- Mader S, Chambon P, White JH (1993) *Nucleic Acid Res* **21**: 1125-1132
- Schwabe JWR, Neuhaus D, Rhodes D (1990) *Nature (London)* **348**: 458-461
- Ikeda M, Ogata F, Curtis SW, Lubahn DB, French FS, Wilson EM, Korach KS (1993) *J Biol Chem* **268**: 10296-10302
- Furlow JD, Murdoch FE, Gorski J (1993) *J Biol Chem* **268**: 12519-12525
- Reese JC, Katzenellenbogen BS (1992) *Nucleic Acid Res* **19**: 6595-6602
- Kumar V, Chambon P (1988) *Cell* **55**: 145-156
- Kato S, Tora L, Yamauchi J, Masushige S, Bellard M, Chambon P (1992) *Cell* **68**: 731-742
- Mukherjee R, Chambon P (1990) *Nucleic Acid Res* **18**: 5713-5716
- Edwards DP, Kuhnel B, Estes PA, Nordeen SK (1989) *Mol Endocrinol* **3**: 381-391
- Glass CK, Lipkin SM, Devary OV, Rosenfeld MG (1989) *Cell* **59**: 697-708
- Burnside J, Darling DS, Chin WW (1990) *J Biol Chem* **265**: 2500-2504
- Mader S, Leroy P, Chen J-Y, Chambon P (1993) *J Biol Chem* **268**: 591-600
- Mukherjee R (1993) *Nucleic Acid Res* **21**: 2655-2661
- Fawell SE, Lees JA, White R, Parker MG (1990) *Cell* **60**: 953-962
- Sabbah M, Redeuilh G, Baulieu E-E (1989) *J Biol Chem* **264**: 2397-2400
- Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, Baulieu E-E (1990) *J Biol Chem* **265**: 20686-20691
- Carson-Jurica MA, Lee AT, Dobson AW, Conneely OM, Schrader WT, O'Malley B (1989) *J Steroid Biochem* **34**: 1-9
- Binart N, Chambraud B, Dumas B, Rowlands DA, Bigogne C, Levin JM, Garnier J, Baulieu EE, Catelli MG (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **159**: 140-147

34. Picard D, Kumar V, Chambon P, Yamamoto K R (1990) *Cell Regulation* 1: 291-299
35. Perrot-Appianat M, Groyer-Picard M-T, Lo-geat F, Milgrom E (1986) *J Cell Biol* 102: 1191-1199
36. White R, Lees JA, Needham M, Ham J, Parker M (1987) *Mol Endocrinol* 1: 735-744
37. Piva R, Bianchi N, Aguiari GL, Gambari R, del Senno L (1993) *J Steroid Biochem Molec Biol* 46: 531-538
38. Keaveney M, Klug J, Dawson MT, Nestor PV, Neilan JG, Forde RC, Gannon F (1991) *J Mol Endocrinol* 6: 111-115
39. Piva R, Gambari R, Zorzato F, Kumar L, del Senno L (1992) *Biochem Biophys Res Commun* 183: 996-1002
40. Kulig E, Lloyd RV (1992) *The Endocrine Society 74th Annual Meeting, Abstract* 1053, p. 315
41. Geffroy-Roisne S, Duval J, Thiculant M-L (1992) *Endocrinology* 131: 1503-1510
42. Weigel RJ, deConinck EC (1993) *Cancer Res* 53: 3472-3474
43. Garcia M, Derocq D, Freiss G, Rochefort H (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11538-11542
44. Kirwacki RW, Schultz SC, Steitz TA, Caradonna JP (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9759-9763
45. Gasiewicz TA, Elferink CJ, Henry EC (1991) *Biochemistry* 30: 2909-2916
46. White TEK, Gasiewicz TA (1993) *Biochem Biophys Res Commun* 193: 956-962
47. McGuire WL, Chamness GC, Fuqua SAW (1991) *Mol Endocrinol* 5: 1571-1577
48. Scott GK, Kushner P, Vigne J-L, Benz C (1991) *J Clin Invest* 88: 700-706
49. Sluyser M (1992) *Clin Biochem* 25: 407-414
50. Koehorst SGA, Jacobs HM, Thijssen JHH, Blankenstein MA (1993) *J Steroid Biochem Molec Biol* 45: 227-233
51. Kassan S, Mechanick JI, Gurspide E (1989) *J Steroid Biochem* 33: 327-333
52. Grahame ML, Krett NL, Miller LA, Leslie KK, Gorden DF, Wood WM, Wei LL, Horwitz KB (1990) *Cancer Res* 50: 6208-6217
53. Garcia T, Sanchez M, Cox JL, Shaw PA, Ross JBA, Lehrer S, Schachter B (1989) *Nucleic Acid Res* 17: 8364
54. Wang Y, Miksicek RJ (1991) *Mol Endocrinol* 5: 1707-1715
55. Pfeffer U, Fecarotta E, Castagnetta L, Vidali G (1993) *Cancer Res* 53: 741-743
56. Fuqua SAW, Fitzgerald SD, Chamness GC, Tandon AK, McDonnell DP, Nawaz Z, O'Malley BW, McGuire WL (1991) *Cancer Res* 51: 105-109
57. Fuqua SAW, Fitzgerald SD, Allred DG, Elledge RM, Nawaz Z, McDonnell DP, O'Malley BW, Greene GL, McGuire WL (1992) *Cancer Res* 52: 483-486
58. Brown TR, Lubahn DV, Wilson EM, Joseph DR, French FS, Migeon CJ (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8151-8155
59. Sukurai A, Takedo K, Ain K, Ceccarelli P, Nakai A, Seino S, Bell GI, Refetoff S, DeGroot LJ (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8977-8981
60. Ince BA, Zhuang Y, Wrenn CK, Shapiro DJ, Katzenellenbogen BS (1993) *J Biol Chem* 268: 14026-14032
61. Selmi S, Samuels HH (1991) *J Biol Chem* 266: 11589-11593
62. Pratt MAC, Kralova J, McBurney MW (1990) *Mol Cell Biol* 10: 6445-6453

KOMUNIKAT

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej uprzejmie informuje, że XII Zjazd Towarzystwa odbędzie się w Warszawie w dniach od 21 do 23 września 1995 roku.

Część naukowa Zjazdu poświęcona będzie wybranym zagadnieniom z zakresu chemii klinicznej, hematologii i immunologii oraz problemom szkolenia i organizacji pracy.

Szczegółowe informacje dotyczące Zjazdu można uzyskać w Zarządzie Głównym PTDL, 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1a, tel/fax 23 59 82.

Komitet Organizacyjny Zjazdu

Receptor ekdysteroidowy *Drosophila melanogaster* — jeden z czynników transkrypcyjnych kontrolujących metamorfozę

Ecdysteroid receptor from *Drosophila melanogaster* — one of the transcription factors controlling metamorphosis

ANDRZEJ OŻYHAR*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Molekularna kontrola metamorfozy
 - II-1. Model Ashburnera
 - II-2. Geny pufów „wczesnych”, ich struktura i produkty
 - II-3. Receptor ekdysteroidowy
 - II-3.1. Identyfikacja aktywności i genu receptora ekdysteroidowego
 - II-3.2. Oddziaływanie receptora ekdysteroidowego z DNA i czynnikami transkrypcji — ich znaczenie dla różnicowania kontroli ekspresji genów przez ekdyzon
 - II-3.2.1. Oddziaływanie receptora z DNA; pierwsze obserwacje
 - II-3.2.2. Receptor ekdysteroidowy wiąże się z sekwencjami regulatorowymi DNA
- III. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Molecular control of metamorphosis
 - II-1. Ashburner model
 - II-3. Genes of "early" puffs, their structure and products
 - II-3.1. Identification of the activity and the gene of ecdysteroid receptor
 - II-3.2. Interaction of ecdysteroid receptor with DNA and transcription factors -their importance for differentiation of gene expression control by ecdysone
 - II-3.2.1. Interaction of ecdysteroid receptor with DNA; preliminary observations
 - II-3.2.2. Ecdysteroid receptor binds to regulatory DNA sequences
- III. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: BR-C — „Broad-Complex” zespół genów odpowiedzialnych za powstawanie „wczesnego” pufu 2B5 w chromosomie X, ślinianek *Drosophila melanogaster*; c-Jun — białkowy produkt protoonkogenu *c-jun*; c-Fos — białkowy produkt protoonkogenu *c-fos*; E74 — białkowy produkt genu *E74*; E75 — białkowy produkt genu *E75*; EcR — receptor ekdysteroidowy; EcRE — regulatorowa sekwencja DNA wiążąca receptor ekdysteroidowy; ER — receptor estrogenowy; GR — receptor glukokortykoidowy; HRE — regulatorowa sekwencja DNA wiążąca receptor jądrowy; hsp 27 — białko szoku cieplnego *Drosophila melanogaster*, będące produktem genu *hsp 27*; MR — receptor mineralokortykoidowy; OTF 1 — czynnik transkrypcji wiążący sekwencję oktameryczną; ponasteron A — 25-dezoksy-20-hydroksyekdyzon; RAR — receptor kwasu retinowego; RXR — receptor retinowy X, (receptor kwasu 9-cis retinowego); Sgs — białkowy produkt genu *Sgs* („salivary gland secretion protein”); TR — receptor tyrooidowy; Usp — białkowy produkt genu *usp* („ultraspiracle”); VDR — receptor witaminy D₃.

receptory tyroksyny (TR), kwasu retinowego (RAR), witaminy D₃ (VDR), oraz receptory, których ligandy nie są do tej pory poznane (tzw. receptory „sieroce”). Białka te, o wyraźnie zdefiniowanej budowie domenowej, są zależnymi od swoich ligandów czynnikami regulującymi transkrypcję [1-3]¹

Białka nadrodziny receptorów jądrowych spełniają swoją fizjologiczną funkcję wiążąc się ze specyficznymi sekwencjami regulatorowymi DNA (HRE, „hormone responsive elements”), co prowadzi do zmiany szybkości transkrypcji genów będących pod ich kontrolą [3, 4]. W przypadku receptora glukokortykoidowego (GR) i receptora estrogenowego (ER) wykazano, że wiążą się one z HRE w postaci homodimerycznych kompleksów [5, 6-8]². Z drugiej zaś strony, ostatnie doniesienia wyraźnie dowodzą, iż RAR, TR, VDR wiążą się z niektórymi wariantami HRE z wysokim powinowactwem dopiero w obecności innych, dodatkowych czynników białkowych (patrz II-3.2.). Jednym

¹ Szereg podstawowych informacji odnośnie funkcji oraz struktury białek należących do rodziny receptorów jądrowych zostało przedstawionych w artykułach: „Jądrowe receptory jako czynniki regulujące transkrypcję”. W. Sokół-Misiak na łamach *Post. Biochem.*, **38** (1992) 12-22; „Receptor estrogenowy: budowa i funkcja w normalnej i neoplastycznej tkance” E. Kulig na łamach *Post. Biochem.*, **40** (1994).

I. Wstęp

Receptory hormonów sterydowych wchodzą w skład nadrodziny receptorów jądrowych, obejmującej również inne strukturalnie pokrewne białka, w tym

* Dr inż., Zakład Biochemii, Instytut Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii, Politechnika Wroclawska 50-70 Wrocław Wybrzeże Wyspiańskiego 27

z nich jest receptor X kwasu retinowego (RXR), który tworzy heterodimery zdolne do specyficznego oddziaływania z HRE nie tylko z pokrewnym RAR [8, 9], ale także z VDR, TR [8-10] oraz z białkiem PPAR ("peroxisome proliferator-activated receptor") [11, 12]. Znaczenie fizjologiczne powyższych oddziaływań nie jest na razie w pełni zrozumiałe, lecz zdolność receptorów do formowania heterodimerów wskazuje na istnienie złożonego systemu komunikacji pomiędzy tymi czynnikami („faktorami”) transkrypcji. System ten może być dodatkowo modulowany dzięki temu, iż niektóre z receptorów zdolnych do tworzenia heterodimerów regulują transkrypcję również jako homodimery. Co więcej, w niektórych przypadkach mogą one także działać jako niezależne od hormonu czynniki transkrypcji [13].

Synergistyczne oddziaływanie pomiędzy receptorami nadrodziny receptorów jądrowych i czynnikami regulującymi transkrypcję, nie należącymi do tej grupy białek, przyczynia się prawdopodobnie również do dodatkowego różnicowania tkankowej (rozwojowej) regulacji ekspresji genów [14]. Mechanizmy regulacyjne tego rodzaju obejmują na przykład: oddziaływania białko-białko z czynnikiem transkrypcji OTF 1, w wyniku, którego następuje wygięcie w pętlę DNA w obszarze pomiędzy elementami regulatorowymi [15]; oddziaływania będące skutkiem przyłączenia się do wspólnego elementu regulatorowego, zbudowanego z sąsiadujących lub zachodzących na siebie miejsc regulatorowych. Ilustracją ostatniego typu mechanizmu jest porozumiewanie się ("crosstalking") GR i białek c-Jun i c-Fos należących do grupy czynników transkrypcji zawierających element strukturalny odpowiedzialny za ich dimeryzację, zwany suwakiem leucynowym [16, 17].

Pytania dotyczące hierarchii oddziaływań międzybiałkowych, oraz mechanizmu, prowadzącego w konsekwencji do wysoce wyspecjalizowanych odpowiedzi na poziomie komórkowym, są dopiero stawiane. Zaprezentowane powyżej przykłady mogą być traktowane jedynie jako drogowskazy na drodze, jaką należy pokonać w celu zrozumienia mechanizmów regulacji transkrypcji genów.

W ostatnich latach zidentyfikowano u *Drosophila melanogaster* szereg białek należących do nadrodziny receptorów jądrowych [18, 19]. Stwarza to wyjątkową możliwość podjęcia próby odpowiedzi na szereg pytań w oparciu o obiekt bardzo dobrze scharakteryzowany, zarówno pod względem genetycznym jak i ontogenetycznym, pozwalający na molekularne modelowanie, niemożliwe ze względów etycznych, czy też praktycz-

nych u organizmów wyższych. Interesującym przykładem tej grupy białek jest receptor ekdyteroidowy (EcR), którego naturalnym ligandem jest ekdyzon³ — hormon linienia owadów i innych bezkręgowców. Właściwości EcR oraz jego udział w procesach molekularnej kontroli metamorfozy zostaną omówione poniżej (patrz II-3.). Inne białka należące do tej rodziny, to typowi przedstawiciele receptorów „sierocych”. Są one produktami następujących genów: *svp* ("sevenup"), biorącego udział w różnicowaniu komórek fotoreceptorowych oka [20]; *tll* ("tailles") koniecznego dla prawidłowego, osiowego rozwoju embrionalnego [21]; *usp* ("ultraspiracle") wymaganego dla prawidłowego embrionalnego i larwalnego rozwoju odwłoka [22, 23]; *FTZ-F1*, regulatora prawidłowego formowania segmentów podczas embriogenezy [24] i wreszcie *E74* [25, 26], *E75* [27, 28] i *BR-C* [29], genów, których produkty są czynnikami transkrypcji odpowiedzialnymi za indukcję drugorzędowej odpowiedzi na ekdyzon (patrz II-1, II-2.). Trzy pozostałe geny kodują białka, posiadające domeny wiążące DNA strukturalnie pokrewne do rodziny receptorów sterydowych. Brak w nich jednak fragmentów homologicznych do domeny wiążącej ligand. Są to: *kni* ("knirps"), wymagany podczas embriogenezy dla prawidłowej segmentacji odwłoka [30] oraz dwa blisko strukturalnie spokrewnione geny o nieznanym funkcjach: *knrl* ("knirps-related") [31] i *egon* ("embryonic gonad") [32].

II. Molekularna kontrola metamorfozy

Ekdyzon koordynuje tkankowo-specyficzne zmiany morfologiczne i fizjologiczne u stawonogów. W przypadku najlepiej poznanych obiektów, jakimi są owady, wiadomo, że stymuluje on metamorfozę w kierunku następnego okresu życia, podczas gdy, ściśle współdziałający z nim w procesach regulacyjnych, hormon juwenilny wywiera efekt antagonistyczny „zezwalając” na działanie programów realizowanych przez tkanki w poprzednich etapach rozwoju [33, 34]. U *D. melanogaster* można zaobserwować co najmniej jeden szczyt stężenia ekdyzonu podczas każdego z sześciu stadiów rozwoju: embrionalnego, trzech larwalnych, przedpoczwarki i poczwarki [35]. Podczas pierwszego i drugiego okresu larwalnego ekdyzon jest przede wszystkim odpowiedzialny za indukcję linienia starej kutikuli [36]. W drugiej połowie trzeciego okresu larwalnego larwa przestaje się odżywiać i rozpoczyna wędrówkę w poszukiwaniu odpowiedniego miejsca do przepoczwarczenia. Pojawienie się podwyższonego poziomu ekdyzonu jest sygnałem do zakończenia okresu wędrowania, a także do sporządzenia przez larwę kokonu i rozpoczęcia metamorfozy. Dwanaście godzin później

² Wydaje się, że także i te receptory, o których sędzono powszechnie, iż działają jako homodimery, mogą w niektórych warunkach funkcjonować w postaci heterodimericznych kompleksów. Więcej informacji na ten temat znajdzie Czytelnik w zamieszczonym w tym samym zeszycie *Post. Biochem.* artykule „Receptor estrogenowy: budowa i funkcja w normalnej i neoplastycznej tkance” autorstwa E. Kuli-g.

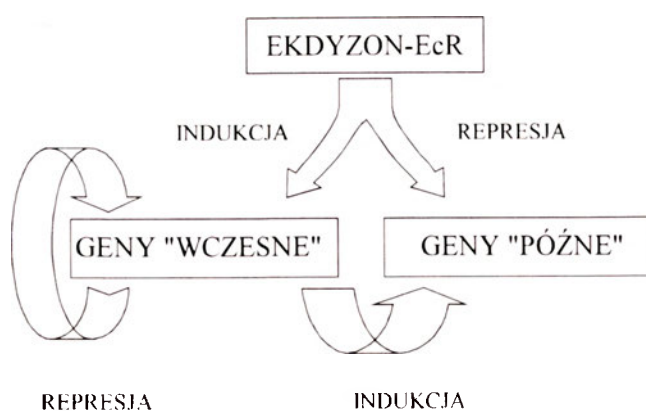
³ Informacje na temat ekdyzonu, w szczególności zaś fizjologicznych efektów jego działania zostały omówione w artykule „Ekdysteroidy owadzie — biosynteza, metabolizm, funkcja”. K. Grzełak 1994 *Post. Biochem.* 40 181-190.

kolejny wzrost stężenia jest sygnałem do przemiany przedpoczwarki w poczwarkę, po czym następuje szeroki szczyt stężenia ekdyzonu podczas stadium poczwarki. Podczas metamorfozy następuje przemodelowanie organizmu — tkanki charakterystyczne dla larw ulegają histolizie, rozwijają się natomiast tkanki imaginalne tworząc struktury właściwe dla owada dorosłego [36, 37].

II-1. Model Ashburnera

Szczególnie interesującym i owocnym dla poznania molekularnego mechanizmu działania ekdyzonu okazał się krótki okres pomiędzy rozpoczęciem przez larwę wędrówki, a zakończeniem stadium przedpoczwarki. W tym czasie politeniczne chromosomy ślinianek larwy stają się na tyle duże, że mogą być bezpośrednio obserwowane pod mikroskopem [38]. Na krótko przed wzrostem stężenia ekdyzonu — będącym sygnałem do tworzenia puparium — niektóre z chromosomów zlokalizowanych na chromosomach powiększają się, osiągając rozmiary, wyraźnie odbiegające od normalnych. Powiększone chromosomy, zwane pufami, w tym przypadku pufami międzylinkowymi ("intermoult puffs"), zanikają w trakcie następującego wzrostu stężenia ekdyzonu. Jednocześnie pojawia się zespół kilku nowych pufów, noszących nazwę pufów wczesnych ("early puffs"). Zanikają one po kilku godzinach, a następnie pojawia się w powtarzalnej sekwencji przez okres 10 godzin ok. 100 pufów „późnych” ("late puffs") [39].

Ashburner [39] opracował system eksperymentalny, który pozwolił na obserwację powstawania pufów *in vitro*, w odpowiedzi na umieszczenie ślinianek larw trzeciego okresu *D. melanogaster* w medium zawierającym ekdyzon. Przy jego pomocy wykonał, wspólnie z kolegami, szereg doświadczeń, które stały się podstawą do skonstruowania prostego modelu kontroli powstawania pufów zwanego dziś powszechnie modelem Ashburnera. Według niego (Ryc. 1.), ekdyzon, będący w kompleksie ze swoim receptorem (EcR),



Ryc. 1. Model Ashburnera przedstawiający genetyczną kontrolę powstawania pufów w chromosomach politenicznych *Drosophila melanogaster* [19, 39]. Dokładny opis modelu znajduje się w tekście pracy (II-1).

odpowiedzialny jest za dwa regulatorowe efekty: indukcję pufów „wczesnych” i represję pufów „późnych”. Indukcja pufów „wczesnych” zachodzi także w obecności inhibitorów syntezy białek, z czego można wnioskować, że powyższe efekty są bezpośrednią odpowiedzią na ekdyzon, a czynniki dodatkowe biorące udział w regulacji są obecne w komórkach w momencie poddania ich działaniu hormonu. Wysłunięto także hipotezę, iż produkty białkowe „wczesnych” pufów działają jako czynniki regulatorowe, indukujące drugorzędową odpowiedź na ekdyzon, której przejawem jest pojawienie się pufów „późnych” i zanik pufów „wczesnych”. W konsekwencji: zarówno EcR jak i produkty pufów „wczesnych” powinny być białkami regulatorowymi specyficznymi oddziaływującymi z DNA [39]. Model Ashburnera wytyczył kierunki poszukiwań dla badaczy zainteresowanych molekularnym mechanizmem regulacji ekspresji genów przez ekdyzon, w szczególności zaś genów odpowiedzialnych za metamorfozę. Dzięki niemu szybko określono dwie podstawowe grupy celów badawczych. Pierwsza z nich obejmowała identyfikację i charakterystykę EcR, druga identyfikację i charakterystykę produktów genów odpowiedzialnych za powstawanie pufów „wczesnych”.

II-2. Geny pufów „wczesnych”, ich struktura i produkty

Do tej pory, scharakteryzowano na poziomie molekularnym dziewięć pufów zależnych od ekdyzonu (Tab. 1.) [40-45]. Trzy z nich należą do klasy „wczesnych”, jeden „późnych”, a pozostałe do grupy pufów „międzylinkowych”. W kontekście przedstawionego powyżej modelu hierarchicznej regulacji jest oczywistym, że kluczową rolę w jego realizacji powinny odgrywać produkty pufów „wczesnych”. W ostatnim czasie zidentyfikowano i scharakteryzowano geny zlokalizowane w tej grupie pufów, a także rozpoczęto badania nad regulacją ich ekspresji i funkcją produktów. W pufie 2B5 zdefiniowano tzw. „Broad Complex” (BR-C) [29, 46], w obszarze 74EF gen *E74* [25, 26], a gen *E75* w obrębie pufu 75B [27, 28]. Geny te jak dla *D. melanogaster* są wyjątkowo długie, 60-100 kpz. i mają podobną strukturę. *E74* obejmuje dwie jednostki transkrypcji, *E74A* i *E74B*, o różnych promotorach lecz wspólnym 3'-końcu, w wyniku czego powstające dwa pokrewne produkty białkowe posiadają identyczne domeny wiążące DNA [25]. Struktura *E75* jest podobna, obejmuje ok. 50 kpz, w tym trzy promotory zależne od ekdyzonu, które pozwalają na syntezę spokrewnionych mRNA: t.j. *E75A*, *E75B* i *E75C*. Także i w tym przypadku produkty genów posiadają identyczne C-końce i różne N-końce. Analiza ich sekwencji aminokwasowej pozwoliła na wyróżnienie domen odpowiedzialnych za wiązanie DNA oraz niezidentyfikowanego jak dotąd liganda. Wyjątkowym w tej grupie jest białko *E75B*, którego domena wiążąca DNA posiada tylko jeden palec cynkowy.

Tabela 1Geny pufów ślinianek *Drosophila melanogaster* (według [103])

Typ pufu	Symbol pufu ¹	Gen(y)	Funkcja	Odnosnik lit.
międzylinkowy	3C	<i>Sgs4</i> ²	białko klejowe	[40]
międzylinkowy	25B	<i>Sgs1</i>	białko klejowe	[41]
międzylinkowy	68C	<i>Sgs3</i>	białko klejowe	[42]
międzylinkowy	68C	<i>Sgs7</i>	białko klejowe	[42]
międzylinkowy	68C	<i>Sgs8</i>	białko klejowe	[42]
międzylinkowy	90BC	<i>Sgs5</i>	białko klejowe	[43]
międzylinkowy	71CE	<i>Sgs6</i>	białko klejowe	[44]
wczesny	2B5	<i>BR-C</i>	regulatorowa	[29, 27]
wczesny	74EF	<i>E74</i>	regulatorowa	[25, 26]
wczesny	75B	<i>E75</i>	regulatorowa	[27, 28]
późny	71CE	<i>Geny I-IV</i>	nieznana	[45]

¹ Symbole pufów według konwencji podanej przez Beckera [106] i Ashburnera [107].

² Ważnymi funkcjami ślinianek *Drosophila melanogaster* są synteza i sekrecja śluzowatego kleju, który pozwala owadowi na przytwierdzenie się do podłoża podczas metamorfozy. Głównym jego składnikiem są białka sekrecyjne ślinianek ("salivary gland secretion proteins", Sgs), powstające na matrycy odpowiednich mRNA pod koniec trzeciego okresu larwalnego.

Świadczyć to może, iż realizuje ono swą prawdopodobną funkcję czynnika transkrypcji, wiążąc się z DNA w odmienny sposób niż znane receptory nadrodziny, bądź też, że działa ono w kompleksie z innymi białkami [18]. *BR-C* ma najbardziej złożoną strukturę. Obejmuje obszar 100 kpz, w obrębie którego położone są co najmniej trzy promotory kontrolujące syntezę dwóch pierwotnych transkryptów (~ 50 kpz i 100 kpz), przekształcanych w wyniku składania w kilkanaście transkryptów pochodnych. Wszystkie one zawierają wspólny ekson zwany „rdzeniowym”, natomiast podzielić je można na trzy klasy, definiowane przez ekson kodujący różniące się między sobą pary palców cynkowych typu C_2H_2 [29].

Jak wynika więc z przytoczonych powyżej informacji, zgodnie z postulatami modelu Ashburnera, białka kodowane przez poznane do tej pory geny pufów „wczesnych” zawierają elementy strukturalne umożliwiające im specyficzne oddziaływanie z DNA, a co za tym idzie potencjalne funkcjonowanie jako czynniki transkrypcji.

II-3. Receptor ekdysteroidowy

II-3.1. Identyfikacja aktywności i genu receptora ekdysteroidowego

Przeciwnie niż inne receptory hormonów sterydowych receptor ekdysteroidowy (EcR) został zidentyfikowany bardzo późno, bo dopiero w 1978 r. [47, 48]. Opracowanie syntezy 25-dezoksy-20-hydroksyekdyzonu, (ponasteronu A), o wysokiej aktywności specyficznej (122 Ci/mmol) umożliwiło po raz pierwszy zaobserwowanie wysycalnej aktywności wiążącej ten ligand ze stałą dysocjacji ~ 3 nM w ekstraktach linii komórek K_C [47] oraz w dyskach imaginalnych skrzydeł *D. melanogaster* [48]. Kolejne eksperymenty mające na celu dokładną charakterystykę EcR wykonywane były głównie na tym samym obiekcie, przy

czym EcR badano w ekstraktach z embrionów, poczwarek, dorosłych samic jak również z wybranych tkanek — dysków imaginalnych i ślinianek [49, 50]. Analiza wykresów Scatcharda wiązania ponasteronu A do preparatów EcR z komórek K_C , dysków imaginalnych oraz embrionów wykazała, że ligand wiązany jest przez jedną klasę miejsc wiążących [47, 48, 51-54]. Badania przeprowadzone na ekstraktach otrzymanych z komórek linii BII oraz z dorosłych samic *D. melanogaster* doprowadziły natomiast do zaobserwowania heterogenności miejsc wiążących. W ekstraktach BII wykazano istnienie dwóch klas miejsc wiążących o stałych dysocjacji 0.3 nM i 2.0 nM [55], zaś w preparatach z samic wyznaczono stałe równe 0.9 nM i 3 nM [56]. Aktywność EcR badano również u przedstawicieli innych gatunków owadów wyznaczając bardzo zbliżone wartości stałych dysocjacji [50].

Właściwości hydrodynamiczne EcR zostały najlepiej zbadane dla *D. melanogaster*. Wyznaczone wartości masy cząsteczkowej są dla różnych preparatów zbliżone i wynoszą 120-130 kDa [50, 54]. Wyraźne zróżnicowanie obserwowane jest natomiast dla wartości współczynników sedymentacji. Dla świeżych preparatów komórek K_C stwierdzono na przykład, że zarówno cytoplazmatyczna, jak i jądrowa aktywność wiążąca ponasteron A posiadają współczynnik sedymentacji 6S, natomiast dla EcR z mrożonych preparatów komórek K_C wyznaczono współczynnik sedymentacji równy 4S [50]. EcR w ekstraktach embrionów był charakteryzowany wartościami współczynnika sedymentacji 8.5S i 4.5S w buforach odpowiednio o niskiej i wysokiej sile jonowej [57]. Najwyższą wartość (9S) zaobserwowano jednak, po kowalencyjnym związaniu hormonu z EcR, w wyniku naświetlenia preparatu bezpośrednio przed wirowaniem promieniowaniem ultrafioletowym [58].

Zróżnicowane wartości współczynników sedymentacji, w szczególności zaś ich zależność od siły jonowej, były wyraźną wskazówką, iż EcR jest białkiem o włas-

ciwościach podobnych do receptorów steroidowych, zidentyfikowanych i scharakteryzowanych u kręgowców. Eksperymentalne potwierdzenie przypuszczenia można było uzyskać jedynie po określeniu sekwencji aminokwasowej EcR. Podejmowano więc próby oczyszczenia EcR w celu otrzymania informacji, które pozwoliłyby na zaprojektowanie strategii klonowania genu. Procedury oparte o klasyczne metody chromatograficzne nie doprowadziły ostatecznie do celu, prawdopodobnie ze względu na niestabilność kompleksów EcR-ponasteron A [53]. Niemniej jednak, osiągnięto znaczny postęp oczyszczając EcR z komórek K_C 500-700-krotnie [59] oraz 5000-krotnie z poczwerek *D. melanogaster* [59]. Ostatni wynik był w dużej mierze skutkiem oparcia procedury izolacji o specyficzne oddziaływanie receptora z immobilizowanym DNA z grasicy cielęcej. Wskazywał on kierunek badań zmierzających do oczyszczenia EcR, a także podkreślał konieczność otrzymania danych dotyczących oddziaływania EcR z DNA.

Identyfikacja sekwencji regulatorowej rozpoznawanej przez EcR (EcRE), a także scharakteryzowanie oddziaływań pomiędzy nią a receptorem (patrz II-3.2.) pozwoliły na zaprojektowanie oczyszczania tego białka metodą chromatografii powinowactwa w oparciu o immobilizowane oligonukleotydy zawierające sekwencję *hsp 27* [60]. Jakkolwiek osiągnięto wysoki stopień oczyszczenia, bo aż 29 000-krotny, to jednak nie udało się otrzymać białka w ilości wystarczającej do przeprowadzenia analizy struktury pierwszorzędowej, a co za tym idzie do zaprojektowania sondy DNA pozwalającej na izolację genu EcR. W tym samym czasie K o e l l e i w s p. [61] scharakteryzowali produkt genu, nazwanego przez nich *EcR*, zlokalizowanego w obrębie pufu 42A *D. melanogaster*. Gen zidentyfikowano stosując sondę hybrydacyjną obejmującą fragment genu *E75* kodujący domenę wiążącą DNA wraz z przyległymi aminokwasami. W pierwszym rzędzie sonda posłużyła do zidentyfikowania genomowych klonów *EcR*, które następnie zostały użyte do analizy biblioteki cDNA z larw ostatniego okresu.

Główny transkrypt genu *EcR* (ok. 6 kpz) z otwartą ramką odczytu obejmującą 879 kodonów, koduje białko należące do nadrodziny receptorów jądrowych. Zawiera ono co najmniej dwie wyraźnie zdefiniowane domeny: domenę wiążącą DNA i domenę wiążącą hormon. Domena wiążąca DNA, kodowana w odróżnieniu od innych receptorów przez jeden a nie dwa eksony, zawiera 19 konserwowanych aminokwasów. Wykazuje ona największe podobieństwo do formy β ludzkiego TR [61]. Produkt genu *EcR* posiada, identycznie jak TR, VDR i RAR w obrębie C-końcowego palca aminokwasu Glu-Gly-Gly, odpowiedzialne prawdopodobnie i w tym przypadku za specyficzne wiązanie do sekwencji regulatorowej [62]. Spokrewniony z nimi strukturalnie ER posiada odpowiednio Glu-Gly-Ala [63].

II-3.2. Oddziaływanie receptora ekdysteroidowego z DNA i czynnikami transkrypcji — ich znaczenie dla różnicowania kontroli ekspresji genów przez ekdyzon

II-3.2.1. Oddziaływanie receptora ekdysteroidowego z DNA; pierwsze obserwacje

Pierwsze wyniki wskazujące na to, że EcR wiąże się z DNA zostały zaprezentowane w krótkim czasie po identyfikacji aktywności EcR. Było to możliwe dzięki otrzymaniu przeciwciał do 20-hydroksyekdyzonu [64, 65] oraz opracowaniu metody aktywowanego promieniami ultrafioletowymi kowalencyjnego wiązania 20-hydroksyekdyzonu do EcR [66]. Przy pomocy tej ostatniej techniki, połączonej z radioimmunologiczną detekcją związanych ekdysteroidów stwierdzono, że 20-hydroksyekdyzon jest kompleksowany przez białko komórkowe *D. melanogaster* o masie 130 kDa [58]. Dodatkowe badania pufów chromosomów ślinianek poddanych działaniu 20-hydroksyekdyzonu, a następnie promieniowania ultrafioletowego, wykazały obecność w nich antygeny 20-hydroksyekdyzonu w kompleksie z receptorem. Był to pierwszy dowód na asocjację EcR w kompleksie ze steroidowym ligandem, z chromatyną [66, 67]. Wyniki te przedstawiono w czasie, gdy nie były jeszcze znane sekwencje DNA wiążące specyficznie receptory steroidowe. Przewidywano wprawdzie ich istnienie, lecz badania oddziaływania receptorów z DNA były prowadzone z użyciem niefrakcjonowanego DNA genomowego. Pomimo szeregu niedostatków pozwoliły one na zaobserwowanie, między innymi, procesu aktywacji (transformacji) receptorów, polegającego na przejściu receptora ze stanu charakteryzującego się brakiem powinowactwa do DNA do stanu, w którym receptor wiąże się do DNA. Oprócz tego zidentyfikowano czynniki wpływające na interakcję receptorów z DNA [68]. Badania przeprowadzone dla PR, ER i GR pokazały, na przykład, że fosforan 5-pirydoksalu specyficznie hamuje wiązanie tych białek do DNA, nie zmieniając przy tym w sposób istotny ich powinowactwa do steroidu [69-73]. Dodatkowo związek ten zmieniał właściwości hydrodynamiczne receptorów, co objawiało się zmniejszeniem ich współczynnika sedymentacji. Jakkolwiek nie było jasne, jakie jest fizjologiczne znaczenie powyższych obserwacji, nie ulegało wątpliwości, że są one charakterystyczne dla receptorów steroidowych. Analiza wpływu fosforanu 5'-pirydoksalu została wykonana również dla EcR z ekstraktów embrionów *D. melanogaster* [63]. Stwierdzono, że wiązanie receptora do DNA z grasicy cielęcej immobilizowanego na celulozie jest hamowane również w przypadku tego białka. Modyfikacja ta jest specyficzna, gdyż inne związki, pochodne do fosforanu 5'-pirydoksalu (pirydoksal, fosforan 5'-pirydoksaminy, pirydoksamina), praktycznie nie mają wpływu na interakcję EcR z DNA. Towarzyszy jej zmiana własności hydrodyna-

micznych objawiająca się zmniejszeniem współczynnika sedymentacji z wartości 8.5 S do 4.5-5.0 S. Powyższe wyniki były bardzo podobne do opublikowanych wcześniej dla receptorów steroidowych kręgowców. Dodatkowo stwierdzenie, iż w przypadku EcR modyfikacja dotyczy prawdopodobnie, jak u innych receptorów, reszt lizyny ważnych dla interakcji z DNA [57], wyraźnie sugerowało istnienie podobieństwa strukturalnego pomiędzy EcR a receptorami kręgowców w obrębie domeny odpowiedzialnej za wiązanie DNA (potwierzonego ostatecznie po izolacji genu EcR, patrz II-3.1.). Pozwalało to także na wysunięcie przypuszczenia o istnieniu podobieństwa strukturalnego, a co za tym idzie także funkcjonalnego, pomiędzy sekwencjami regulatorowymi rozpoznawanymi przez EcR i innych członków nadrodziny.

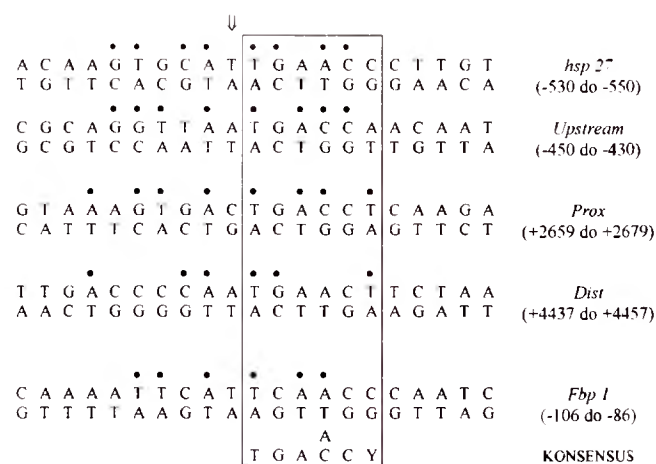
II-3.2.2. Receptor ekdyteroidowy wiąże się specyficznie z sekwencjami regulatorowymi

Jak podkreślono to wcześniej, receptory steroidowe kontrolują ekspresję genów przez interakcję z sekwencjami HRE funkcjonującymi jako klasyczne wzmacniacze transkrypcji. Pierwsze HRE zidentyfikowano dla GR [74], a w dalszej kolejności dla pozostałych receptorów hormonów steroidowych [4]. Po zebraniu dostatecznej ilości informacji, HRE tej podklasy receptorów nadrodziny podzielono na dwie grupy [75, 76, 3]. Klasyczną, konsensusową sekwencją grupy pierwszej jest palindrom GGTCAnnnTGTYCY⁴, rozpoznawany przez GR, PR, AR i receptor mineralokortykoidowy (MR). Konsensusową sekwencją grupy drugiej jest GGTCAnnnTGACC, palindrom rozpoznawany przez ER, TR, VDR, RAR. Coraz więcej danych eksperymentalnych wskazuje jednak na to, że powyższa klasyfikacja jest uproszczona. Jak stwierdzono ostatnio TR [77], VDR [78], RAR [79], ale także RXR [80] zdolne są do wiązania nie tylko funkcjonalnych sekwencji palindromowych, lecz także sekwencji, będących bezpośrednimi powtórzeniami („direct repeats”) sekwencji AGGTCA. Obecność 2, 3, 4 lub 5 pz rozdzielających powtórzone sekwencje określa przy tym, który z receptorów będzie preferencyjnie wiązany [81-83].

W pierwszym etapie, badania nad oddziaływaniem EcR ze specyficznymi sekwencjami regulatorowymi, były poważnie ograniczone ze względu na brak metody pozwalającej na wykazanie w sposób bezpośredni z jaką sekwencją EcR tworzy specyficzny kompleks. Zmierzano więc do zdefiniowania elementów regulatorowych na drodze funkcjonalnej analizy sekwencji promotorowych genów regulowanych przez ekdyzon. W praktyce sprowadzało się to do identyfikacji krótkich fragmentów wystarczających do regulacji transkrypcji genów przez ten hormon. Analiza została przeprowadzona najpełniej w przypadku genów kodujących białka szoku

ciepłego (*hsp*). Najbardziej znaczące wyniki otrzymano dla rejonu promotorowego genu *hsp 27* kodującego białko o masie 27 kDa, którego ekspresja jest stymulowana zarówno przez ekdyzon jak też i przez szok cieplny [84]. W pierwszej kolejności wykazano, że obszar pomiędzy pozycjami -579 i -455 jest odpowiedzialny za kontrolowaną przez ekdyzon indukcję syntezy mRNA [85]. Dodatkowe eksperymenty pozwoliły na zidentyfikowanie w jego obrębie sekwencji 23 pz rozpoznawanej specyficznie przez białka ekstraktu jądrowego komórek Schneidera. Opierając się na spostrzeżeniu, iż ten krótki fragment wystarcza dla kontroli ekspresji heterologicznego genu przez ekdyzon, wysunięto przypuszczenie, że łatwy do identyfikacji w obrębie sekwencji palindrom, może być sekwencją regulatorową rozpoznawaną przez EcR (Ryc. 2. i 3.) [86].

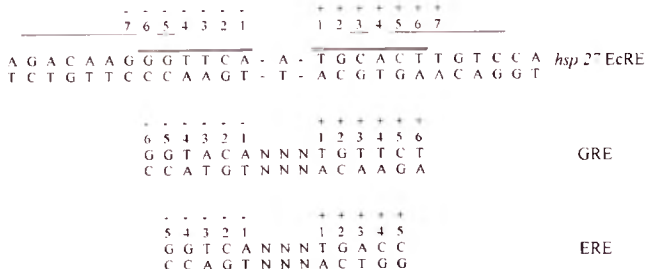
Sugestia wymagała bezpośredniego dowodu eksperymentalnego. Został on dostarczony przez dwie pracownie, które posłużyły się w tym celu różnymi metodami. Metoda pierwsza była oparta na identyfikacji i analizie sekwencji fragmentów DNA wiążących EcR skompleksowany ze znakowanym 26-[¹²⁵I] ponasteronem A [87]. Postępowanie takie, możliwe dzięki bardzo wysokiej aktywności specyficznej sterydu, pozwoliło na śledzenie EcR związanego z DNA pomimo tego, że receptor nie był oczyszczony. Potwierdzono nie tylko wiązanie się receptora z sekwencją 23 pz promotora *hsp 27*, ale także zidentyfikowano trzy nowe sekwencje wiążące EcR w obrębie promotora genu *Eip 28/29* (Ryc. 2.). Metoda druga, oparta na



Ryc. 2. Sekwencje fragmentów DNA zawierających elementy regulatorowe wiązane przez EcR.

Na rysunku pokazano pięć znanych obecnie EcRE (wraz z sekwencjami sąsiadującymi) pochodzących z następujących genów: *hsp 27* [85, 86, 88], *Fbp 1* [104, 105] oraz *Eip 28/29* (*Prox*, *Dist*, *Upstream*) [87]. Lokalizacja sekwencji w poszczególnych genach została określona przez podanie numerów odpowiednich nukleotydów w odniesieniu do miejsca startu transkrypcji (+1). Sekwencja zawierająca *hsp 27* EcRE została odwrócona o 180° w celu łatwiejszego wykazania istnienia we wszystkich EcRE wspólnych elementów (ramka) składających się na sekwencję konsensusową, obejmującą sześć par nukleotydów [87]. Strzałka wskazuje położenie lokalnego centrum symetrii, a kropki — symetrycznych par nukleotydów.

⁴Y = C lub T.



Ryc. 3. Porównanie *hsp 27* EcRE z konsensusowymi sekwencjami regulatorowymi rozpoznawanymi przez receptor glukokortykoidowy (GRE) i estrogenowy (ERE). W obrębie sekwencji obejmującej pary zasad od pozycji -552 do -527 obszaru promotorowego genu *hsp 27* wyróżniono palindrom centralny (podwójna linia), który jest odpowiedzialny za wiązanie funkcjonalnego EcR [87, 89, 91], a także palindrom zewnętrzny (linia pojedyncza), który jak pierwotnie sądzono powinien być sekwencją rozpoznawaną przez EcR [86]. Pary zasad palindromu centralnego zostały ponumerowane zgodnie z konwencją zastosowaną przez Trussa i wsp. [75] dla pokazanych niżej GRE i ERE. Dla uproszczenia pokazano tylko jedną z „wersji” sekwencji GRE. Zdaniem Trussa i Beato [3] sekwencja konsensusowa GRE zapisana jako pojedyncza nić DNA ma bowiem następującą postać: GGTACAnnnTGTYCY, gdzie Y = C lub T. Sekwencję *hsp 27* przedstawiono z dwoma „odstępami” pomiędzy ramionami palindromu, tak aby można ją było łatwiej porównać z GRE i ERE; „N” — oznacza dowolny nukleotyd.

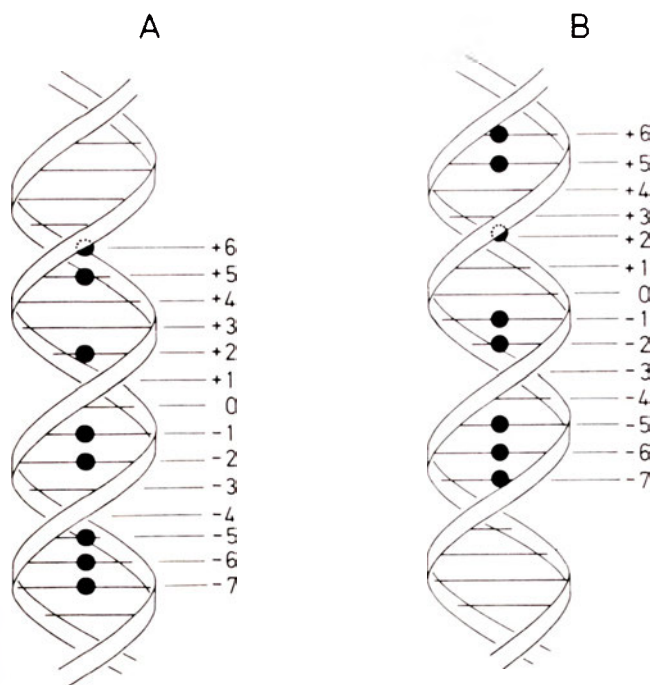
filtracji żelowej, umożliwiła analizę kompleksów powstających w wyniku specyficznej interakcji EcR z DNA [88, 89]. Również i w tym przypadku pokazano, że nieoczyszczony EcR z embrionów *D. melanogaster* jest specyficznie wiązany przez 23 pz z sekwencji *hsp 27*. Stwierdzono ponadto, że po związaniu DNA EcR dimeryzuje, zwiększając swą obserwowaną w filtracji żelowej masę z 130 kDa do 290 kDa. Dodatkowe eksperymenty kompetycyjne pozwoliły na dalsze scharakteryzowanie oddziaływania i na stwierdzenie, że za wiązanie EcR odpowiedzialny jest centralny palindrom sekwencji *hsp 27* [88], a nie, jak uprzednio sądzili *Rid d i h o u g h i P e l h a m* [85], palindrom „zewnętrzny” (Ryc. 3). Porównanie jego sekwencji z opisanymi powyżej sekwencjami regulatorowymi rozpoznawanymi przez receptory nadrodziny receptorów steroidowych kręgowców (Ryc. 3) sugeruje, że jest ona blisko spokrewniona z HRE rozpoznawanymi przez ER, a także TR, VDR, RAR. Istotnie, przeprowadzone przez *M a r t i n e z a i w s p.* [90] testy funkcjonalne oparte o użycie genów reporterowych wykazały, że zmiana długości sekwencji oddzielającej odcinki połówkowe centralnego palindromu *hsp 27* z 1 pz do 3 pz powoduje uwrażliwienie go na estradiol, przy jednoczesnym odczuleniu na ekdyzon. Odwrotnie, skrócenie sekwencji oddzielającej z 3 pz do 1 pz w ERE rozpoznawanym przez ER czyni go wrażliwym na ekdyzon, co sugeruje, że podstawową różnicą pomiędzy tymi elementami regulatorowymi jest długość sekwencji oddzielającej [90].

Sugestia ta znalazła bezpośrednie potwierdzenie w elektroforetycznej analizie tworzenia się kompleksów pomiędzy EcR a oligonukleotydami, zawierającymi element *hsp 27* ze zmodyfikowaną sekwencją od-

dzielającą [91]. Mutacja centralnej pary A/T do C/G nie miała praktycznie wpływu na tworzenie się specyficznych kompleksów DNA-EcR, natomiast zmiana odstępów pomiędzy odcinkami połówkowymi palindromu prowadziła do zmniejszenia powinowactwa DNA do EcR, w porównaniu do DNA zawierającego niezmienną sekwencję *hsp 27*. Efekt był silniejszy w przypadku gdy usunięto centralną parę zasad, niż gdy długość sekwencji oddzielającej zwiększono z 1 pz do 2 pz.

Dokładna analiza oddziaływania EcR z sekwencją regulatorową *hsp 27* wykazuje jednak, że sposób w jaki EcR specyficznie tworzy kompleks z DNA różni się od opisanego w przypadku ER, GR. Podstawowa różnica zawiera się w tym, iż pary zasad występujące w pozycjach -3, -4 i +1, +3, +4 *hsp 27* EcRE (Ryc. 3) mogą być mutowane bez istotnego wpływu na wiązanie receptora. Dodatkowo, pary zasad odpowiedzialne za tworzenie kompleksu z EcR obejmują nawet pozycje -7, -6, +6 [91] podczas gdy ER, a także GR, kontaktują się z parami zlokalizowanymi najdalej w pozycjach +5 i -5 [3]. Dwie teoretycznie możliwe lokalizacje par zasad *hsp 27* odpowiedzialnych za wiązanie EcR pokazano na rycinie 4. Bez względu na to, która z nich jest realizowana w rzeczywistości, można się spodziewać, że struktura kompleksu EcRE-EcR różni się znacząco od kompleksów GR-GRE i ER-ERE, które charakteryzują się obecnością miejsc kontaktowych w bruzdzie dużej i ich brakiem w bruzdzie małej [3] (patrz legenda do Ryc. 4). Prawdopodobnie, różnica ta wynika przede wszystkim z faktu, iż sekwencja oddzielająca EcRE wynosi 1 pz a ERE i GRE 3 pz [3, 4], chociaż wydaje się, że długość sekwencji oddzielającej nie jest jedynym czynnikiem, określającym specyficzność oddziaływania. Na przykład, oddziaływanie heterodimeru RXR/TR z elementem regulatorowym, będącym bezpośrednim powtórzeniem o sekwencji oddzielającej 4 pz, wymagać może istnienia kontaktów pomiędzy aminokwasami domeny wiążącej DNA TR, a parami zasad zlokalizowanymi w obrębie bruzdy mniejszej [92].

Przynajmniej w przypadku sekwencji *hsp 27*, EcR jest wiązany z DNA prawdopodobnie w postaci heterodimeru — w tym przypadku w kompleksie z produktem białkowym genu *ultraspiracle* (Usp) [93, 94]. Ekspresja samego EcR w komórkach ssaczych nie pozwala bowiem na zaobserwowanie w nich aktywności wiązania ponasteronu A, ani też powstania specyficznych kompleksów z oligonukleotydami zawierającymi sekwencję *hsp 27*. Obie aktywności, oraz towarzysząca im zdolność komórek ssaczych do aktywowania heterologicznych promotorów zawierających sekwencję *hsp 27*, pojawiają się dopiero w przypadku koekspresji Usp bądź bardzo blisko strukturalnie z nim spokrewnionego (86% homologii sekwencji aminokwasowej) ssaczego odpowiednika — RXR α [93]. Funkcjonalne oddziaływanie EcRE *hsp 27* z EcR wymaga więc obecności Usp [94], lecz nie można wy-



Ryc. 4. Hipotetyczna lokalizacja par zasad *hsp 27* EcRE odpowiedzialnych za wiązanie funkcjonalnego EcR.

Na schematycznie przedstawionej na rysunku podwójnej spirali DNA zaznaczono (●) pary zasad centralnego palindromu *hsp 27* (porównaj Ryc. 3.), zidentyfikowane jako istotne dla oddziaływania z EcR [89, 91]. Lokalizacja przedstawiona na rycinie A zakłada, iż białka tworzące funkcjonalny EcR umieszczone są w sąsiadujących bruzdach dużych, gdzie tworzą w przeważającej mierze kontakty z *hsp 27* EcRE. Dodatkowe miejsca kontaktu położone są w obrębie bruzdy małej, gdzie powinny być też zlokalizowane reszty aminokwasów odpowiedzialnych za tworzenie dimeru białek, będących składnikami funkcjonalnego EcR. Na skutek lokalizacji przedstawionej na rycinie B, obie cząsteczki białkowe powinny być umieszczone w obrębie bruzd małych, gdzie realizują one większość oddziaływań z *hsp 27* EcRE; dodatkowe miejsca oddziaływania (białko-białko i białko-DNA) położone są w bruzdzie dużej. Dyskusja dotycząca tego, jakie białka składają się na funkcjonalny EcR znajduje się w tekście pracy (II-3.2.2.).

kluczyć istnienia niezidentyfikowanych jeszcze EcRE zdolnych do wiązania homodimerów EcR. Jak wykazano bowiem dla pokrewnego VDR, elementy regulatorowe rozpoznawane przez to białko można podzielić na dwie grupy [95]. Pierwsza obejmuje sekwencje zdolne do funkcjonalnego wiązania homodimerów VDR. Zawierają one element GGGTGA zorganizowany w formie bezpośrednio powtórzonych sekwencji z sekwencją oddzielającą 6 pz, lub też jako palindrom bez sekwencji oddzielającej, czy wreszcie jako palindrom z sekwencją oddzielającą 12 pz. Druga klasa obejmuje bezpośrednie powtórzenia sekwencji GGTCCA, AGGTCA lub GGGTGA oddzielone 3 pz, które funkcjonalnie wiążą heterodimery utworzone z VDR i RXR. Występowanie elementów regulatorowych należących do obu klas jest, zdaniem C a r l s b e r g a w s p . [95], świadectwem istnienia co najmniej dwóch dróg przenoszenia i różnicowania odpowiedzi dla witaminy D₃, a także prawdopodobnie również innych ligandów rozpoznawanych przez receptory jądrowe. Pozostaje otwartym pytanie, czy

i w przypadku EcR ten sposób różnicowania sygnału biologicznego jest możliwy. Element *hsp 27* wydaje się być, w tym kontekście, bardzo interesującym obiektem, gdyż wiąże on heterodimery Usp/EcR, co jak wspomniano powyżej, w przypadku VDR, jest cechą sekwencji będących bezpośrednimi powtórzeniami. Sekwencja *hsp 27* nie należy jednak do tej grupy; jest ona raczej zdegenerowanym palindromem (Ryc. 3.).

Dodatkowe możliwości regulacji otwierają się także dzięki temu, iż gen *EcR* zorganizowany w podobny sposób jak geny *E74* i *E75*, koduje więcej niż jedną izoformę receptora [96]. Opisany poprzednio jako jedyny transkrypt *EcR* może być alternatywnie składany, w wyniku czego obok opisanego już wcześniej produktu białkowego o obserwowanej w elektroforezie masie 105 kDa [61], oznaczanego teraz jako EcR-B1, powstać może izoforma EcR-B2 o masie 80 kDa. Odkryto także nową jednostkę transkrypcji, zachodzącą na obszar jednostki transkrypcji *EcR-B*, która koduje trzecią izoformę receptora: EcR-A. Białka EcR-A, EcR-B1 i EcR-B2 charakteryzują się identycznymi domenami wiążącymi DNA (66 aminokwasów), steryd (221 aminokwasów) lecz podobnie jak białka *E75* i *E74* różnią się one N-końcowymi segmentami. Jak stwierdzono, wszystkie trzy formy wiążą z podobnym powinowactwem steryd, a także rozpoznają specyficznie sekwencję *hsp 27*, co sugeruje, że aktywności zlokalizowane w domenach odpowiedzialnych za wiązanie DNA są „nieczułe” na różnice w obrębie N-końcowego fragmentu białka [96]. Zbadano również zmiany stężenia poszczególnych izoform i odpowiednich mRNA w całych owadach podczas ich rozwoju. Profile zmian ich stężenia są różne, przy czym dominacja poszczególnych form jest przynajmniej częściowo synchronizowana przez pojawiające się kolejne szczyty stężenia ekdyzonu. Zdaniem T a l b o t a i w s p . [96] powyższe wyniki wskazują, iż poszczególne formy EcR, lub ich kombinacje są wymagane dla różnych etapów metamorfozy.

Zróżnicowane czasowo i tkankowo występowanie różnych izoform nie jest ograniczone tylko dla EcR. Podobne zależności zaobserwowano dla produktów genów pufów „wczesnych” *E74A*, *E75A* i *E75B*, w owadach o ściśle określonym wieku oraz w kulturach tkankowych [97].

III. Uwagi końcowe

Jak wspomniano we Wstępie, najnowsze wyniki dotyczące receptora glukokortykoidowego wskazują wyraźnie na to, że czynniki transkrypcji nie należące do nadrodziny receptorów jądrowych mogą tworzyć kompleksy z receptorami sterydowymi, modyfikując ich aktywność [14]. Do grupy tych białek należą: czynnik OTF 1, białka zawierające homeodomenę, a także AP-1: heterodimer białek c-Fos i c-Jun posiadających w swej strukturze motyw suwaka leucynowego. Jak wydaje się AP-1 antagonizuje w analogiczny

sposób również działanie RAR, TR i ER [98-100] a więc receptorów filogenetycznie pokrewnych EcR [101]. Można więc się spodziewać, iż białka *D. melanogaster* zawierające motyw homeodomeny, zamka leucynowego, a także inne o nieznanym do tej pory elementach strukturalnych odpowiedzialnych za wiązanie z DNA, są potencjalnymi kandydatami zdolnymi do tworzenia kompleksów z różnymi izoformami EcR.

Wykazanie istnienia tego typu oddziaływań, jak również poszerzenie wiedzy dotyczącej regulacji aktywności EcR przez białka należące do nadrodziny receptorów jądrowych, należą obecnie do najbardziej interesujących zadań badawczych. Ich realizacja, w której centralnym punkcie znajdzie się analiza zależności pomiędzy strukturą a funkcją kompleksów tworzonych przez EcR z DNA (przy ewentualnym udziale innych partnerów białkowych), przyczyni się niewątpliwie do zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za zróżnicowaną metamorfozę poszczególnych tkanek owada. Powyższe eksperymenty mogą także doprowadzić do identyfikacji receptora (receptorów?) hormonu juvenilnego [102], drugiego obok ekdyzonu hormonu o kluczowym znaczeniu dla metamorfozy.

Podziękowanie

Przed wszystkim pragnę podziękować Panu prof. Olafowi Pongsowi za stworzenie mi w swoim laboratorium wspaniałych warunków, dzięki którym mogłem wykonać eksperymenty cytowane w niniejszej pracy przeglądowej. Niektóre z cytowanych doświadczeń były finansowane z grantu KBN 0592/P2/92/02, a także ze środków Politechniki Wrocławskiej.

Panu prof. Marianowi Kochmanowi dziękuję za krytyczną korektę manuskryptu, a Pani mgr Anicie Niedzieli-Majka za pomoc w przygotowaniu rycin.

Dziękuję także Pani dr Elżbiecie Kulig za udostępnienie przed publikacją manuskryptu pracy „Receptor estrogenowy: budowa i funkcja w normalnej i nieoplastycznej tkance”.

*Artykuł otrzymano 25 lutego 1994 r.
Zaakceptowano do druku 25 lipca 1994 r.*

Piśmiennictwo

1. Evans RM (1988) *Science* **240**: 889-895
2. Green S, Chambon P (1988) *Trends Genet Sci* **4**: 309-314
3. Truss H, Beato M (1993) *Endocrine Reviews* **14**: 459-479
4. Martinez E, Wahli W (1991) W: Parker MG (red) *Nuclear Hormone Receptors*. Academic Press Limited, London, str. 125-153
5. Kumar V, Chambon P (1988) *Cell* **55**: 145-156
6. Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Siegler PB (1991) *Nature (London)* **352**: 497-505
7. Tsai SY, Carlstedt-Duke J, Weigelm NL, Dahlman K, Gustafsson J-A, Tsai MJ, O'Malley BW (1988) *Cell* **55**: 361-369
8. Yu VC, Delsert C, Andersen B, Holloway JM, Devary OV, Näär AM, Kim SY, Boutin JM, Glass CK, Rosenfeld MG (1991) *Cell* **67**: 1251-1266
9. Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM (1992) *Nature (London)* **355**: 446-449
10. Bugge TH, Pohl J, Lonnoy O, Stunnenberg HG (1992) *EMBO J* **11**: 1409-1418
11. Issemann I, Green S (1990) *Nature (London)* **347**: 645-650
12. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM (1992) *Nature* **358**: 771-774
13. Willmann T, Beato M (1986) *Nature (London)* **324**: 688-691
14. Beato M (1991) *FASEB J* **5**: 2044-2051
15. Kutoh E, Strömstedt PE, Poellinger L (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 4960-4969
16. Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato ACB, Gebel S, Ponta H, Herrlich P (1990) *Cell* **62**: 1189-1204
17. Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J, Karin M (1990) *Cell* **62**: 1205-1215
18. Segraves WA (1991) *Cell* **67**: 225-228
19. Oro AE, McKeown M, Evans RM (1992) *Curr Opin Genet Dev* **2**: 269-274
20. Młodzik M, Hiroimi Y, Weber U, Goodman CS, Rubin GM (1990) *Cell* **60**: 211-214
21. Pignoni F, Baldarelli RM, Steingrimsson E, Diaz RJ, Patapoutian A, Merriam JR, Lengyel JA (1990) *Cell* **62**: 151-163
22. Henrich VC, Sliter TJ, Lubahn DB, MacIntyre A, Gilbert LI (1990) *Nucl Acids Res* **18**: 4143-4148
23. Oro AE, McKeown M, Evans RM (1990) *Nature (London)* **347**: 298-301
24. Lavorgna G, Ueda H, Clos J, Wu C (1991) *Science* **252**: 848-851
25. Burtis KC, Thummel CS, Jones CW, Karim FD, Hogness DS (1990) *Cell* **61**: 85-89
26. Janknecht R, Taube W, Lüdecke H-J, Pongs O (1989) *Nucl Acids Res* **17**: 4455-4464
27. Feigl G, Gram M, Pongs O (1989) *Nucl Acid Res* **17**: 7167-7178
28. Segraves WA, Hogness DS (1990) *Genes Dev* **4**: 204-219
29. DiBello PR, Withers DA, Bayer CA, Fristrom JW, Guild GM (1991) *Genetics* **129**: 385-397
30. Nauber U, Pankratz M, Kienlin A, Seifert E, Klemm U, Jäckle H (1988) *Nature (London)* **336**: 489-492
31. Oro AE, Ong ES, Margolis JS, Posakony JW, McKeown M, Evans RM (1988) *Nature (London)* **336**: 493-496
32. Rothe M, Nauber U, Jäckle H (1989) *EMBO J* **8**: 3087-3094
33. Riddiford LM (1993) *Receptor* **3**: 203-209
34. Kumaran AK (1990) W: Gupta AP (red) *Recent Advances in Comparative Arthropod Morphology, Physiology and Development* I. Rutgers University Press, New Brunswick, str 182-227
35. Richards G (1981) *Mol Cell Endocrinol* **21**: 181-197
36. Richards G (1981) *Biol Rev* **56**: 501-549
37. Handler AM (1982) *Dev Biol* **93**: 73-82
38. Becker HJ (1962) *Chromosoma* **13**: 341-384
39. Ashburner M, Chihara C, Meltzer P, Richards G (1974) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **38**: 655-662
40. Shermoen AW, Jongens J, Barnett S, Flynn K, Beckendorf SK (1987) *EMBO J* **6**: 207-214
41. Velissariou V, Ashburner M (1980) *Chromosoma* **77**: 13-27
42. Garfinkel MD, Pruitt RE, Meyrowitz EM (1983) *J Mol Biol* **168**: 765-789
43. Guild GM (1984) *Dev Biol* **102**: 462-470
44. Velissariou V, Ashburner M (1981) *Chromosoma* **84**: 173-185
45. Resliff LL, Guild GM (1986) *J Mol Biol* **188**: 517-528
46. Chao AT, Guild GM (1986) *EMBO J* **5**: 143-150
47. Maroy P, Dennis R, Beckers C, Sage BA, O'Connor JD (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 6035-6038
48. Yund MA, King DS, Fristrom JW (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 6039-6043
49. Yund MA, Osterbur DL (1985) W: Kerkut GA, Gilbert LI (red) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford, 1985, str 473-490
50. Bidmon HJ, Sliter TJ (1990) *Invert Reprod Develop* **18**: 13-27
51. Osterbur D, Yund MA (1982) *J Cell Biochem* **20**: 277-282
52. Deak P, Zavorsky P, Maroy P (1988) *Insect Biochem* **18**: 847-852

53. Landon TM, Sage BA, Seeler BJ, O'Connor JD (1988) *J Biol Chem* **263**: 4693-4697
54. Strangmann-Diekmann M, Klöne A, Ozyhar A, Kreklau F, Kiltz H-H, Hedtmann U, Welzel P, Pongs O (1990) *Eur J Biochem* **189**: 137-143
55. Dinan L (1985) *Arch Insect Biochem Physiol* **2**: 295-317
56. Handler AM, Maroy P (1989) *Mol Cell Endocrinol* **63**: 103-109
57. Ozyhar A, Kiltz H-H, Pongs O (1990) *Eur J Biochem* **192**: 167-174
58. Schaltmann K, Pongs O (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 6-10
59. Pongs O (1989) W: Koolman J (red) Ecdysone. From Chemistry to Mode of Action. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/ New York, str 338-344
60. Ozyhar A, Gries M, Kiltz H-H, Pongs O (1992) *J Steroid Biochem Molec Biol* **43**: 629-634
61. Koelle MR, Talbot WS, Segraves WA, Bender MT, Cherbas P, Hogness DS (1991) *Cell* **67**: 59-77
62. Umesono K, Evans RM (1989) *Cell* **57**: 1139-1146
63. Mader S, Kumar V, de Verneuil, Chambon P (1989) *Nature (London)* **338**: 271-274
64. Glass H, Emmerich H, Spindler KD (1978) *Cell Tissue Res* **194**: 237-244
65. Birkenbeil H, Eckert M, Gersch M (1979) *Cell Tissue Res* **200**: 285-290
66. Gronemeyer H, Pongs O (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 2108-2112
67. Dworniczak B, Seidel R, Pongs O (1983) *EMBO J* **2**: 1323-1330
68. Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW, DeSombre ER (1968) *Proc Natl Acad Sci USA* **59**: 632-638
69. Cake MH, DiSorbo DM, Litwack G (1978) *J Biol Chem* **253**: 4886-4891
70. Nishigori H, Toft D (1979) *J Biol Chem* **254**: 9155-9161
71. Muldoon TG, Cidlowski JA (1980) *J Biol Chem* **255**: 3100-3107
72. Hiipakka RA, Liao S (1980) *J Steroid Biochem* **13**: 841-846
73. Silva CM, Tully DB, Petch LA, Jewell CM, Cidlowski JA (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 1744-1748
74. Geisse S, Scheiderei C, Westphal HM, Hynes NE, Groner B, Beato M (1982) *EMBO J* **1**: 1613-1619
75. Truss M, Chalepakis G, Slater EP, Mader S, Beato M (1991) *Molec Cell Biol* **11**: 3247-3258
76. Beato M (1991) *FASEB J* **5**: 2044-2051
77. Glass CK, Holloway JM, Devary OV, Rosenfeld MG (1988) *Cell* **54**: 313-323
78. Näär AM, Boutin JM, Lipkin SM, Yu VC, Holloway JM, Glass CK, Rosenfeld MG (1991) *Cell* **65**: 1267-1279
79. Umesono K, Giguere V, Glass CK, Rosenfeld MG, Evans RM (1988) *Nature (London)* **336**: 262-265
80. Mangelsdorf DJ, Umesono K, Kliewer SA, Borgmeyer U, Ong ES, Evans RM (1991) *Cell* **66**: 555-561
81. Rottman JN, Widom RL, Nadel-Ginard B, Mahdavi V, Karathanasis SK (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 3814-3820
82. Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM (1991) *Cell* **65**: 1255-1266
83. Durand B, Saunders M, Leroy P, Leid M, Chambon P (1992) *Cell* **71**: 73-85
84. Segraves WA, Richards G (1990) *Invert Reprod Devel* **18**: 67-76
85. Riddihough G, Pelham HRB (1986) *EMBO J* **5**: 1653-1658
86. Riddihough G, Pelham HRB (1987) *EMBO J* **6**: 3729-3734
87. Cherbas L, Lee K, Cherbas P (1991) *Genes Dev* **5**: 120-131
88. Ozyhar A, Kiltz H-H (1991) *J Chromatogr* **587**: 11-17
89. Ozyhar A, Strangmann-Diekmann M, Kiltz H-H, Pongs O (1991) *Eur J Biochem* **200**: 329-335
90. Martinez E, Givel F, Wahli W. (1991) *EMBO J* **10**: 263-268
91. Ozyhar A, Pongs O (1993) *J Steroid Biochem Molec Biol* **46**: 135-145
92. Perlmann T, Rangarajan PN, Umesono K, Evans RM (1993) *Genes & Dev* **7**: 1411-1422
93. Yao T-P, Segraves WA, Oro AE, McKown M, Evans RM (1992) *Cell* **71**: 63-72
94. Yao T-P, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen J-P, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993) *Nature (London)* **366**: 476-479
95. Carlsberg C, Bendink I, Wyss A, Meier E, Sturzbecker LJ, Grippo JF, Hunziker W (1993) *Nature (London)* **361**: 657-660
96. Talbot WS, Swryd EA, Hogness DS (1993) *Cell* **73**: 1323-1337
97. Karim FD, Thummel CS (1992) *EMBO J* **11**: 4083-4093
98. Debois C, Aubert D, Legrand C, Pain B, Samarut J (1991) *Cell* **67**: 731-740
99. Doucas V, Spyron G, Yaniv M (1991) *EMBO J* **10**: 2237-2245
100. Zhang X-K, Wills KN, Husmann M, Pfahl M (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 6016-6025
101. Laudet V, Hänni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D (1992) *EMBO J* **11**: 1003-1013
102. Riddiford LM, Truman JW (1993) *Amer Zool* **33**: 340-347
103. Andres A, Thummel CS (1992) *Trends Genet Sci* **8**: 132-138
104. Antoniewski C, Laval M, Lepesant J-A (1993) *Insect Biochem Molec Biol* **23**: 105-114
105. Maschat F, Dubertret ML, Theronod P, Claverie J M, Lepesant J-A (1990) *J Mol Biol* **214**: 359-372
106. Becker HJ (1959) *Chromosoma* **10**: 654-678
107. Ashburner M (1972) W: Beermann W (red) Results and Problems in Cell Differentiation, t IV, Springer, Berlin, str 102-151

Wydawca prosi o kontakt tych, którzy chcieliby wykorzystać łamy „Postępy Biochemii” do reklamowania swych produktów i usług związanych z biochemią, biologią molekularną i biologią komórki.

Please contact the Editors if you wish to advertise in „Postępy Biochemii” the products and services related to biochemistry, molecular biology and cell biology.

Udział transkrypcji genu cytochromu P450_{scc} w regulacji syntezy hormonów sterydowych w korze nadnerczy

The contribution of cytochrome P450_{scc} gene transcription in the regulation of steroid hormone synthesis in the adrenal cortex

DARIUSZ KMIĘCIAK¹,
WIESŁAW H. TRZECIAK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Regulacja hormonalna syntezy kortykoidów
 - II-1. Kortykotropina, ACTH
 - II-2. Receptor kortykotropiny
 - II-3. Wewnątrzkomórkowe mechanizmy kontrolne
- III. Indukcja syntezy cytochromu P450_{scc}
 - III-1. Gen cytochromu P450_{scc}
 - III-2. Regulacja ekspresji genu cytochromu P450_{scc}
- IV. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Hormonal regulation of corticoid synthesis
 - II-1. Corticotropin, ACTH
 - II-2. Corticotropin receptor
 - II-3. Intracellular control mechanisms
- III. Induction of cytochrome P450_{scc} synthesis
 - III-1. Cytochrome P450_{scc} gene
 - III-2. Regulation of cytochrome P450_{scc} gene expression
- IV. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: A II — angiotensyna II, ACAT — acylotransferaza acylo-CoA:cholesterol (2.3.1.26), ACTH — kortykotropina, Adr — adrenodoksyna, cAMP — cykliczny 3',5'-monofosforan adenozyne, CAT — acetylotransferaza chloramfenikolu (2.3.1.28), CRE — element odpowiedzi na cAMP, CREBP — białko wiążące się do CRE, CYP11A — podrodzina genu cytochromów P450, do której należy gen cytochromu P450_{scc} (1.14.15.6), CYP11B — podrodzina genu cytochromów P450, do której należy gen cytochromu P450_{11β} (1.14.15.4), CYP21B — podrodzina genu cytochromów P450, do której należy gen cytochromu P450_{C21} (1.14.99.10), Da — dalton, DAG — 1,2-dwuaacyloglicerol, GRP78 — „mniejsze” białko szoku termicznego, HDL — lipoproteiny o dużej gęstości, 3βHSD — dehydrogenaza 3-β-hydroksysterydowa (1.1.1.51), kDa — kilodalton, LDL — lipoproteiny o małej gęstości, P450_{17α} — cytochrom P450_{17α} (1.14.99.9), PKA — kinaza białkowa A, PKC — kinaza białkowa C, pz — pary zasad, Red Adr — reduktaza adrenodoksyny (1.18.1.2), reduktaza HMG-CoA — reduktaza 3-hydrokso-3-metyloglutarylo-CoA (1.1.1.34), SAP — polipeptydowy aktywator sterydogenezy, SCP₂ — białko przenoszące steroły, SEH — hydrolaza estrów sterolowych (3.1.1.13), TPA — ester forbolu (12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetate), TRE — element odpowiedzi na estry forbolu.

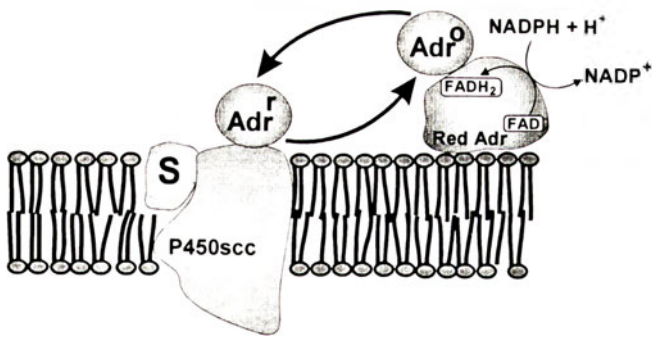
I. Wstęp

Hormony sterydowe, syntetyzowane z cholesterolu w korze nadnerczy, gonadach i w łożysku regulują

transkrypcję genów, które kontrolują szereg ważnych procesów fizjologicznych. U człowieka oraz u zwierząt wielu gatunków formą transportową cholesterolu w osoczu krwi są lipoproteiny o małej gęstości (LDL) [1]. Wyjątkiem są niektóre gryzonie, u których funkcję tę pełnią lipoproteiny o dużej gęstości (HDL) [2]. Cholesterol lipoprotein jest głównym substratem syntezy hormonów sterydowych [1, 2]. Cholesterol jest także syntetyzowany *in situ* z acetylo-CoA [3], lub może pochodzić z hydrolizy estrów cholesterolu zawartych w kroplach lipidowych [4,5].

Początkową reakcją w syntezie wszystkich hormonów sterydowych jest przemiana cholesterolu w pregnenolon [6-8], katalizowana przez kompleks enzymatyczny desmolazy cholesterolowej, zawierający cytochrom P450_{scc} (*side-chain cleavage cytochrome P450*). Cytochrom P450_{scc} przenosi elektrony z NADPH na cholesterol, dając w rezultacie jego hydroksylację w pozycjach 22R i 20α, i rozerwanie wiązania pomiędzy C₂₀ i C₂₂ [9]. Produktem pośrednim jest 20α, 22R-dihydroksycholesterol [7,9]. Cytochrom P450_{scc} nie pobiera bezpośrednio elektronów z NADPH. Reakcję tę przeprowadza flawoproteina — reduktaza adrenodoksyny. Przenosi ona elektrony na białko żelazowo-siarkowe, zwane adrenodoksyną, która gra rolę donora elektronów dla cytochromu P450_{scc} [7,9]. Reduktaza adrenodoksyny i adrenodoksyna są zlokalizowane w matriksie, a P450_{scc} w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [7,9] (Ryc. 1). Usunięcie fragmentu łańcucha bocznego cholesterolu jest

¹Mgr, ²prof. dr hab., Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej AM, ul. Świecickiego 6, 60-781 Poznań; Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań.



Ryc. 1. Kompleks enzymatyczny desmolazy cholesterolowej. W mitochondrialnej matryks, elektrony pochodzące z NADPH ulegają przeniesieniu na reduktazę adrenodoksyny (Red Adr), a następnie na adrenodoksynę. Zredukowana adrenodoksyna (Adr^{\bullet}) łączy się z cytochromem P450scc, zlokalizowanym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, oddaje elektron i ponownie przechodzi w formę utlenioną (Adr^o). Na cytochromie P450scc zachodzi reakcja przemiany substratu (S), — cholesterolu w pregnenolon.

procesem ograniczającym wielkość biosyntezy hormonów sterydowych [10], która na tym etapie jest kontrolowana przez kortykotropinę (ACTH). Dlatego zrozumienie regulacji ekspresji genu cytochromu P450scc ma ważne znaczenie poznawcze.

W artykule przedstawiono mechanizm hormonalnej regulacji ekspresji genu P450scc w strefach: pasmowej i siatkowej kory nadnerczy. W porównaniu z innymi gruczołami wewnętrznego wydzielenia, w których przebiega synteza hormonów sterydowych, kora nadnerczy zawiera najwięcej metabolitów (Ryc. 2). U zwierząt wielu gatunków funkcjonują w niej bowiem cztery specyficzne substratowo cytochromy P450, które umożliwiają syntezę glukokortykoidów, mineralokortykoidów, androgenów nadnerczowych i gestagenów. Dwa z tych cytochromów (P450scc

i P450_{11 β}) zlokalizowane są w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, a dwa pozostałe (P450_{17 α} i P450_{C21}) w retikulum endoplazmatycznym [6,7]. Syntezę glukokortykoidów i androgenów w komórkach stref pasmowej i siatkowej kory nadnerczy pobudza kortykotropina, która działa za pośrednictwem cAMP i kinazy białkowej A [5,11], natomiast produkcję mineralokortykoidu — aldosteronu w strefie kłębkowej kory nadnerczy stymuluje angiotensyna II (A II) [12,13]. Hormon ten, działając za pośrednictwem inozytofosfatydów jako przekaźników drugiego rzędu, powoduje zmiany w wewnątrzkomórkowym rozmieszczeniu jonów wapnia oraz aktywację kinazy C [14-16]. Zatem, biosynteza hormonów sterydowych w korze nadnerczy jest regulowana przez co najmniej dwa hormony i zachodzi poprzez dwa różne systemy przekaźników drugiego rzędu. Systemy te oddziałują na siebie i wzajemnie się uzupełniają.

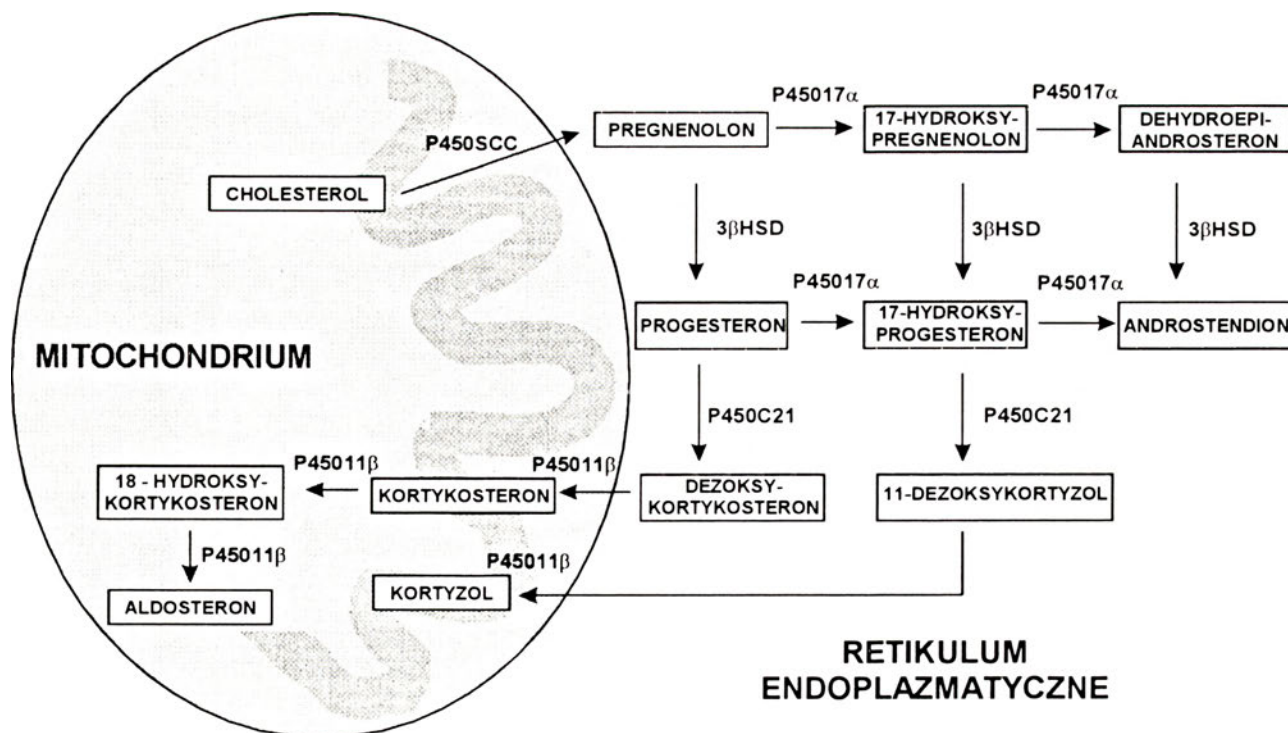
Celem pracy jest przedstawienie i przedyskutowanie danych z piśmiennictwa dotyczących regulacji ekspresji genu cytochromu P450scc (CYP11A) w korze nadnerczy przez kortykotropinę.

II. Regulacja hormonalna syntezy kortykoidów

II-1. Kortykotropina, ACTH

Kortykotropina jest hormonem peptydowym wywodzącym się z prekursora (proopiomelanokortyny) syntetyzowanego w przednim płacie przysadki mózgowej [17,18].

Łańcuch kortykotropiny ludzkiej zawiera 39 reszt aminokwasowych, przy czym sądzi się, iż sekwencja



Ryc. 2. Szlak biosyntezy hormonów sterydowych w korze nadnerczy większości ssaków. Pełne nazwy enzymów znajdują się w wykazie skrótów.

Lys-Lys-Arg-Arg w pozycji 15-18 warunkuje wiązanie ACTH z receptorem [19]. U ssaków ujawniono prawie kompletną homologię odcinka zawierającego pierwsze 24 reszty aminokwasowe. Jak się przypuszcza, pozostała część peptydu chroni cząsteczkę hormonu przed proteolizą [20].

II-2. Receptory kortykotropiny

Kortykotropina wiąże się ze specyficznym receptorem o masie cząsteczkowej 225 kDa, zlokalizowanym w błonie cytoplazmatycznej komórek stref pasmowej i siatkowatej kory nadnerczy [21]. Receptor ACTH zawiera przynajmniej trzy wiązania dwusiarczkowe i pod wpływem mocznika oraz merkaptoetanolu ulega rozpadowi na fragmenty o masach cząsteczkowych: 22, 52, 64, i 83 kDa [21]. Miejsce wiązania hormonu znajduje się we fragmencie 83 kDa [21].

Badania przyłączenia ACTH, znakowanego [^{125}I], do frakcji błon cytoplazmatycznych komórek stref pasmowej i siatkowatej wykazały obecność miejsc wiążących specyficznie, lecz o różnym powinowactwie: $3,4 \times 10^{-9}/\text{mol}$ i $1,0 \times 10^{-9}/\text{mol}$ [22]. Liczbę miejsc wiążących hormon przypadających na jedną komórkę, ocenia się na 3500 do 7200 [23,24]. Również błony cytoplazmatyczne komórek strefy kłębkowatej, produkujących głównie aldosteron, zawierają obok receptorów angiotensyny II, receptory ACTH o właściwościach podobnych do receptorów występujących w komórkach stref pasmowej i siatkowatej [24].

Przypuszcza się, że receptory o wysokim powinowactwie do ACTH, powodują wejście jonów Ca^{2+} do komórki, a receptory o niskim powinowactwie odpowiadają za zwiększoną akumulację cAMP w komórce [25]. Koncepcja ta jest zgodna z obserwacją, że w interakcji hormon-receptor biorą udział jony wapnia [26,27], współdziałając w syntezie cAMP [28].

Zajęcie niewielkiej nawet liczby receptorów przez ACTH powoduje maksymalny efekt stymulacji i wydzielania hormonów sterydowych [22]. W hodowlach komórek kory nadnerczy wołu, w wyniku dodania do pożywki ACTH o stężeniu $1 \mu\text{M}$, po przejściowym obniżeniu liczby receptorów, spowodowanym ich internalizacją, obserwowano silną odpowiedź na hormon, mierzoną ilością mRNA P450_{sc} [29]. Sugeruje to, że ACTH oddziałuje nie tylko na ekspresję genów kodujących enzymy uczestniczące w syntezie hormonów sterydowych, lecz także na gen własnego receptora i być może także cyklazy adenylowej.

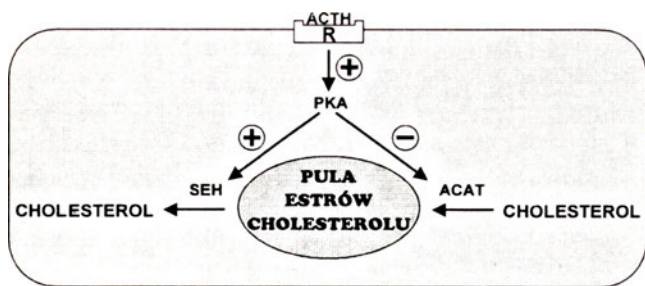
II-3. Wewnątrzkomórkowe mechanizmy kontrolne

Związanie się ACTH z receptorem prowadzi do stymulacji aktywności cyklazy adenylowej, co pociąga za sobą wzrost stężenia cyklicznego AMP wewnątrz komórki [30]. W interakcji hormon-receptor uczestniczą jony wapnia z puli zewnątrzkomórkowej, „pomagając” niejako w zajęciu receptora przez hormon

[26,27]. Wejście jonów Ca^{2+} do komórki, towarzyszące związaniu się ACTH z receptorem, konieczne jest, jak się wydaje dla syntezy cAMP, która wymaga uaktywnienia cyklazy adenylowej [28]. W wyniku związania się ACTH z receptorem następuje nagły wzrost syntezy cAMP. Pośredniczy w tym białko G, składające się z podjednostek: α , β , i γ [31,32]. W stanie nieaktywnym łańcuchy α , β i γ tworzą kompleks, w którym do podjednostki α przyłączony jest GDP. Po związaniu kortykotropiny z receptorem następuje zmiana jego konformacji i w efekcie przyłączenie go do białka G. Wtedy GDP odłącza się od podjednostki α . Na jego miejsce wchodzi GTP, który zmienia konformację tej podjednostki, co z kolei powoduje odłączenie podjednostek β i γ , a w konsekwencji dyfuzję podjednostki α wzdłuż wewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej aż do połączenia się z cyklazą adenylową [31,32]. Dopóki do podjednostki α przyłączony jest GTP, dopóty zachowuje ona aktywujące oddziaływanie na cyklazę. Trwa to nawet do kilku sekund. Kiedy nastąpi hydroliza GTP do GDP, podjednostka α traci zdolność stymulacji cyklazy adenylowej i ponownie wiąże się z β i γ [31,32]. Nieznane są jeszcze miejsca wiązania z receptorem, ani też sposób wzajemnego kontaktu podjednostek białka G. Wiadomo natomiast, w którym miejscu cząsteczki wiążą się GTP i GDP. Podjednostki β i γ spełniają przypuszczalnie rolę modulatora działania białka G oraz odpowiadają za jego „zakotwiczenie” w błonie cytoplazmatycznej [31,32].

W wyniku uaktywnienia cyklazy adenylowej następuje natychmiastowy wzrost produkcji cAMP, pełniącego funkcję przekaźnika drugiego rzędu [33-35]. Świadczą o tym eksperymenty z użyciem jego analogów: dibutyrylo-cAMP i 8-bromo-cAMP [34] oraz z użyciem forskoliny — diterpenu, który aktywuje cyklazę adenylową [35]. Związki te naśladują działanie ACTH oraz cAMP wywołując wzrost syntezy hormonów sterydowych. Cykliczny AMP przyłącza się do podjednostki regulatorowej kinazy białkowej A powodując uwolnienie podjednostki katalitycznej [33], która fosforyluje szereg cytosolowych i mikrosomalnych białek potrzebnych do produkcji hormonów sterydowych [36]. Jednym z efektów działania kinazy A jest indukcja syntezy cytochromu P450_{sc}, adrenodoksyny i reduktazy adrenodoksyny, poprzez wpływ na zwiększenie poziomu specyficznych mRNA [34,37].

Wśród białek z kory nadnerczy fosforylowanych przez kinazę A znajduje się hydrolaza estrów sterolowych [38], której działanie pozwala zwiększyć pulę wolnego cholesterolu [39]. Rozważa się także możliwość udziału kinazy zależnej od jonów wapnia i kalmoduliny w aktywacji hydrolazy estrów sterolowych [40]. Jednocześnie, wraz ze wzrostem aktywności tego enzymu zauważono obniżenie aktywności acylotransferazy acylo-CoA: cholesterol, spowodowane fosforylacją aktywnej formy tego enzymu [41] (Ryc. 3).



Ryc. 3. Udział kinazy białkowej A (PKA) w regulacji wewnętrznej komórkowej pułki estrów cholesterolu.
R — receptor kortykotropiny (ACTH), SEH — hydrolaza estrów sterolowych, ACAT — acylotransferaza acylo-CoA:cholesterol, znak (+) oznacza aktywację, (-) — hamowanie.

Wzrost stężenia wolnego cholesterolu we wnętrzu komórki powoduje wysycenie nim błony wewnętrznej mitochondriów, a nadwyżka wolnego cholesterolu zostaje reestryfikowana [41].

Doniesiono także o fosforylacji, przez kinazę A, białka rybosomów kory nadnerczy [42] co sugeruje, że regulacja syntezy hormonów sterydowych zachodzi także na poziomie translacji. Eksperymenty z użyciem inhibitorów syntezy białek: cykloheksimidu i puromycyny [41,43] potwierdziły to przypuszczenie i doprowadziły do wniosku, iż na wczesnym etapie odpowiedzi na ACTH wymagana jest synteza białka o krótkim okresie półtrwania [43]. Po stymulacji kortykotropiną, w obecności cykloheksimidu zauważono gromadzenie się wolnego cholesterolu w błonie zewnętrznej mitochondriów [44], co sugerowało, że synteza białka jest niezbędna do transportu cholesterolu z zewnętrznej do wewnętrznej błony mitochondriów [45]. W korze nadnerczy wykryto białko przenoszące sterole (*sterol carrier protein* — 2, SCP₂) [46, 47]. Sądzi się, że białko to ułatwia przeniesienie cholesterolu z kropli lipidowych do mitochondriów oraz z zewnętrznej do wewnętrznej błony mitochondrialnej [46]. Ponadto wykazano, że jego syntezę indukuje ACTH [48]. Wydaje się więc możliwe, że cykloheksimid ogranicza syntezę właśnie tego białka [49]. Poszukiwania innych czynników wrażliwych na cykloheksimid doprowadziły do wykrycia labilnego białka o masie cząsteczkowej 3215 Da, nazwanego polipeptydowym aktywatorem sterydogenezy, (*steroidogenesis activator polypeptide*, SAP) [50], który miałby przenosić cholesterol przez błonę mitochondrialną. Białko to powstaje z prekursora o masie cząsteczkowej 82 kDa (p82) w wyniku proteolitycznego odłączenia aminokwasów C-końcowych. Jak sugerowano, p82 jest blisko spokrewnione lub nawet tożsame, z występującym w różnych tkankach „mniejszym” białkiem szoku termicznego, (*glucose regulated protein 78*, GRP78) [50]. Pozwala to przypuszczać, że GRP78 ulega tkankowo-specyficznej proteolizie, ponieważ SAP występuje tylko w tkankach syntetyzujących hormony sterydowe. Odłączenie aminokwasów C-końcowych z cząsteczki GRP78 zachodzi, jak się wydaje, podczas translacji [50]. Mogłoby to tłumaczyć wrażliwość

syntezy hormonów sterydowych na cykloheksimid, gdyż w wyniku zahamowania translacji zabrakłoby SAP niezbędnego do przemieszczenia cholesterolu do wewnętrznej błony mitochondrialnej. W związku z tym powstaje pytanie, czy proteaza odcinająca SAP od GRP78 jest zależna od kinazy A? Wreszcie interesujące wydaje się powiązanie pomiędzy ewolucyjnie starymi białkami szoku termicznego, chroniącymi komórkę przed niesprzyjającymi warunkami środowiska, a ewolucyjnie młodszymi białkami warunkującymi odpowiedź na stres, prowadzącą do syntezy glukokortykoidów [50].

W korze nadnerczy ACTH zwiększa stężenie mRNA receptora LDL i reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (reduktaza HMG-CoA) [51]. U zwierząt, dla których głównym źródłem cholesterolu do syntezy hormonów sterydowych są lipoproteiny osocza krwi, ACTH wpływa silniej na poziom stężenia receptorów LDL, natomiast np. u chomika, wykorzystującego do syntezy hormonów sterydowych przede wszystkim cholesterol endogeny, ACTH stymuluje głównie syntezę reduktazy HMG-CoA [51]. Działanie ACTH na transkrypcję obu genów można zahamować podaniem inhibitora desmolazy cholesterolowej (aminoglutetimidu), co sugeruje, że za efekt zahamowania jest odpowiedzialny wolny cholesterol [51]. Można by wnioskować, że poziom ekspresji tych genów zależy od stężenia wolnego cholesterolu, które obniża się pod wpływem ACTH. Wydaje się to uzasadnione, gdyż w regionach promotorowych genu receptora lipoprotein i reduktazy HMG-CoA, wykryto sekwencje SRE (*sterol regulatory elements*) za pośrednictwem których cholesterol moduluje ich aktywność transkrypcyjną [52, 53].

III. Indukcja syntezy cytochromu P450_{scc}

III-1. Gen cytochromu P450_{scc}

Geny cytochromów P450 tworzą nadrodzinę [54], w której, w oparciu o liczbę eksonów, wyróżniono rodziny genowe. Gen cytochromu P450_{scc} razem z genem P450_{11β} tworzy rodzinę CYP11 z dwiema podrodzinami: CYP11A i CYP11B. Podrodzina CYP11A zawiera wyłącznie gen P450_{scc}, natomiast w podrodzinie CYP11B występuje gen cytochromu P450_{11β} wraz z innymi ściśle spokrewnionymi genami [54].

Gen cytochromu P450_{scc} (CYP11A) człowieka ma długość ok. 20 tysięcy pz i zawiera dziewięć eksonów [55]. W procesie transkrypcji powstaje specyficzny mRNA o długości ok. 2 tysiące pz [56]. Jego występowanie wykazano w tkankach syntetyzujących hormony sterydowe, natomiast nie stwierdzono w mózgu, nerce, wątrobie, płucach i sercu [57]. Badania z zastosowaniem hybrydyzacji *in situ* pozwoliły zlokalizować gen CYP11A człowieka na ramieniu q, w prążku 23 do 24, chromosomu 15 (15q23-q24) [58]. W literaturze nie znaleziono danych dotyczących

chromosomowej lokalizacji genu CYP11A u innych gatunków. Geny pozostałych składników desmolazy cholesterolu człowieka: reduktazy adrenodoksyny i adrenodoksyny położone są na innych chromosomach, odpowiednio: 17q24-q25 i 11q22 [58].

Wykazano, że komplementarny DNA (cDNA) szczurzego CYP11A posiada 77% homologii z cDNA bydłęcym i 80% homologii z cDNA człowieka [57].

Z mitochondriów nadnerczy wołu wyizolowano produkt białkowy genu CYP11A [59]. Białko to, o ciężarze cząsteczkowym 49 kDa, powstaje z prekursora o ciężarze 54,5 kDa w wyniku modyfikacji potranslacyjnej [59]. W układzie *in vitro* oczyszczony P450_{scc} uległ fosforylacji katalizowanej przez kinazę C na grupach -OH seryny i treoniny [60]. Wyniki te oraz spostrzeżenie, że z wewnętrzną błoną mitochondrialną związana jest aktywność kinazy białkowej C, wskazuje na znaczenie fosforylacji P450_{scc} w uaktywnieniu syntezy hormonów steroidowych w odpowiedzi na sygnał zewnętrzny [60].

III-2. Regulacja ekspresji genu cytochromu P450_{scc}

Aby zlokalizować elementy *cis*, działające w regionie regulatorowym genu P450_{scc} człowieka i określić ich rolę w procesie transkrypcji podstawowej (*basic transcription*) i stymulowanej (*stimulated transcription*), wykonano transfekcję komórek nowotworowych kory nadnerczy myszy (linia Y1), za pomocą serii konstrukcji zawierających różnej długości fragmenty regionu regulatorowego genu CYP11A związane z genem acetylotransferazy chloramfenikolu (CAT) jako reporterem [61]. Stwierdzono, że sekwencja o długości 2327 pz, oskrzydłająca gen CYP11A od strony 5', jest odpowiedzialna zarówno za transkrypcję podstawową, jak i indukowaną cAMP, przy czym najkrótszy z badanych fragmentów (od +1 do -88), w którym znajdują się sekwencja TATA i motyw CAAT, odpowiada wyłącznie za transkrypcję podstawową [61]. Elementy *cis*, warunkujące ekspresję podstawową w genie człowieka zlokalizowano we fragmencie od -56 do -44 [61, 62], podczas gdy w genie bydłęcym od -49 do -26 [63]. Przypuszczalny motyw TATA (TTATTA) w regionie promotorowym bydłeciego genu CYP11A zajmuje pozycję od -31 do -26 [63, 64]. Podobną pozycję zajmuje on też w genach: człowieka [65], myszy [66] i szczura [67].

Konstrukcje o długości 152, 267, 343 i 605 pz, zawierające fragmenty regionu oskrzydłającego gen ludzki od końca 5', począwszy od pozycji +1, odznaczały się 5-krotnie wyższą aktywnością transkrypcyjną w obecności ACTH w porównaniu z transkrypcją podstawową [61]. W miejscu od -108 do -117 stwierdzono sekwencję: GGGGAGGAGC, w której tylko jedna zasada różni ją od miejsca wiązania faktuora transkrypcyjnego SP-1 (*stimulatory protein* -1), o sekwencji: $\frac{G}{T}GGGGCGG\frac{GGC}{AAT}$ [61, 62]. SP-1 jest *trans-*

działającym białkiem odgrywającym rolę w transkrypcji genów wirusowych i eukariotycznych, związanych z utrzymaniem podstawowych funkcji komórki [62]. Badania aktywności transkrypcyjnej konstrukcji zawierających fragment promotora związany z genem reporterem sugerują, że wiązanie faktuora SP-1 w tym miejscu zwiększa poziom transkrypcji [62]. Podobna sekwencja w genie bydłęcym znajduje się w pozycjach od -68 do -63 (CCGCCC) oraz od -109 do -100 (TGGGAGGAGC) [62, 64]. Ponieważ SP-1 występuje w komórkach różnych typów, zatem chociaż wydaje się on niezbędny dla transkrypcji genu P450_{scc}, to jednak nie jest on przypuszczalnie czynnikiem odpowiadającym za specyficzną-tkankowo ekspresję tego genu. W badaniach regionu promotorowego genu CYP11A myszy, przy użyciu ekstraktów jądrowych z komórek linii Y1, zauważono także, że w obszarze od -126 do -33, oprócz SP-1, istnieją miejsca wiązania innych czynników białkowych: SF-1, SF-2 i SF-3 (*steroidogenesis factor* 1, 2 and 3) [66]. Jak się sądzi, mają one znaczenie w transkrypcji podstawowej [66].

Transkrypcję genu CYP11A silnie wzmacnia cAMP, oddziałując na białko(a) wiążące się z sekwencją DNA w rejonie regulatorowym tego genu, zwaną elementem odpowiedzi na cAMP (*cAMP response element*; CRE) [61, 62, 64]. Jednakże białko wiążące się z CRE, (*cAMP response element binding protein*, CREBP), podobnie jak faktor SP-1, nie jest przypuszczalnie czynnikiem odpowiadającym za specyficzną tkankowo ekspresję tego genu, gdyż występuje także w innych tkankach [62, 68]. Regiony odpowiedzialne za indukowaną cAMP transkrypcję genu P450_{scc} u bydła i myszy nie zawierają sekwencji homologicznej do CRE i stąd przypuszczalnie mogą współdziałać z innymi specyficznymi tkankowo białkami, które warunkują odpowiedź na cAMP [63, 66]. Możliwe, że CREBP wiąże się nie tylko z sekwencją kanoniczną dla CRE: TGACGTCA, ale również i ze zbliżonymi sekwencjami. CREBP, jak wiadomo, ulega fosforylacji przy pomocy kinazy A i w takiej postaci wpływa na zwiększenie transkrypcji genów klasy II [62, 68]. Mechanizm pobudzenia transkrypcji pozostaje jednak niewyjaśniony. W obszarze regulatorowym genu CYP11A człowieka, począwszy od pozycji -1633 do -1625, znajduje się sekwencja TGATGTCA, która różni się od klasycznego CRE tylko jedną zasadą. Przypuszcza się, że sekwencja ta może być odpowiedzialna za indukowaną cAMP transkrypcję genu CYP11A u człowieka [61, 62]. W odniesieniu do regionu promotorowego bydłeciego genu CYP11A doniesiono najpierw, że podobną rolę może grać sekwencja TTGATC w pozycji od -166 do -161, znajdującą się w obszarze odpowiedzi na cAMP: od -183 do -83 pz [62, 64]. Dalsze eksperymenty przeprowadzane technikami *footprinting* i *gel retardation*, z użyciem ekstraktu jądrowego z komórek Y1, pozwoliły na zlokalizowanie sekwencji odpowiedzi na cAMP w odcinku od -118 do -83 [63]. Co ciekawe,

w miejscu tym znajduje się, jak już wspomniano, sekwencja, z którą wiąże się czynnik SP-1 (od -109 do -100 wg [64], a od -110 do -101 wg [63]). Tak więc wydaje się bardzo prawdopodobne, że SP-1 lub jakieś inne, spokrewnione z nim białko, jest konieczne do indukowanej cAMP transkrypcji bydlęcego genu CYP11A. Drugim czynnikiem pobudzającym transkrypcję mógłby być czynnik ASP (*adrenal-specific protein*), specyficzne białko występujące tylko w jądrach komórek nadnerczy, dla którego przypuszczalne miejsce wiązania wykryto w regionie od -101 do -89 [63]. Miejsce to jest prawie identyczne (11 na 13 pz) z odpowiednią sekwencją w genie cytochromu P450_{C21} człowieka (CYP21B), która również odpowiada za transkrypcję indukowaną przez cAMP [69].

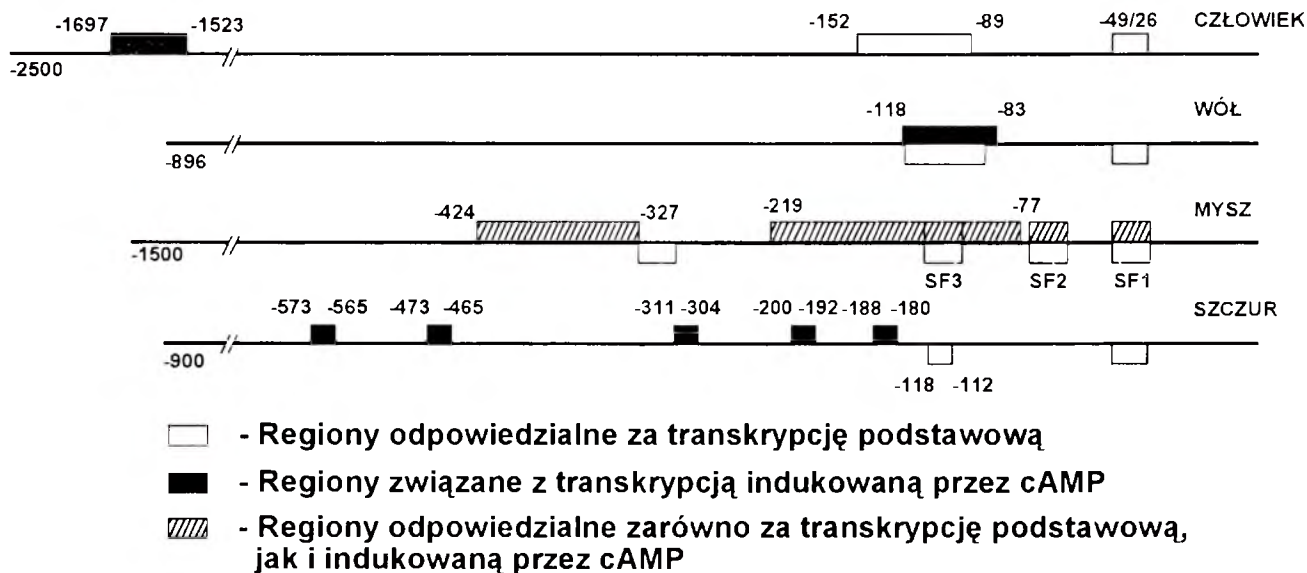
Sukcesywne delecje regionu regulatorowego genu CYP11A człowieka, zawierającego sekwencje homologiczne (od -152 do -89) do regionu odpowiedzi na cAMP w bydlęcym genie CYP11A, powodowały zmniejszenie podstawowej aktywności transkrypcyjnej zamiast oczekiwanego zmniejszenia aktywności indukowanej przez cAMP [62, 63]. Mogłoby z tego wynikać, że u zwierząt różnych gatunków regiony odpowiadające za aktywność podstawową i indukowaną przez cAMP znajdują się w różnych odległościach od miejsca startu transkrypcji. Schemat regionów promotorowych CYP11A najlepiej dotychczas poznanych gatunków zwierząt przedstawia rycina 4.

Inny element, za pomocą którego cAMP mógłby indukować transkrypcję genu CYP11A, to element odpowiedzi na aktywujące kinazę C estry forbolu, (*TRA response element: TRE*). Region odpowiedzi na cAMP w genie CYP11A człowieka zawiera w pozycji od -611 do -605 sekwencję: TGAGTCA, identyczną z sekwencją kanoniczną dla TRE: TGAG/CTCA [61, 62]. Taki sam region znajduje się w genie CYP11A myszy, w pozycji od -318 do -311 [66]. Wykazano, że z TRE wiąże się czynnik transkrypcyjny AP-1, będący

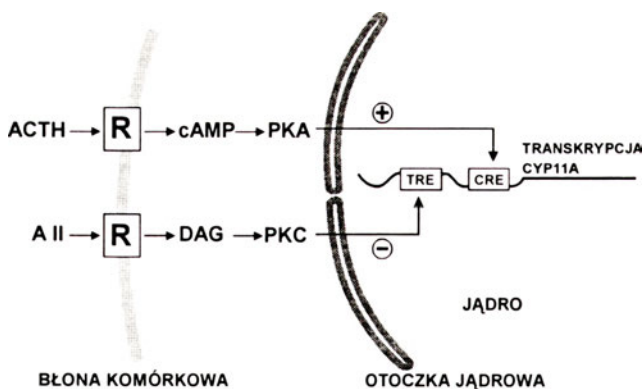
heterodimerem białek *c-fos* i *c-jun* [62, 70]. Ze względu na podobieństwo sekwencji CRE i TRE jest możliwe, że TRE odznacza się także wrażliwością na cAMP [61, 62, 70].

Badania transfekcji komórek Y1 za pomocą konstrukcji zawierających region regulatorowy o różnej długości związany z genem reporterem, wykazały, że w obszarze promotora genu CYP11A człowieka, sekwencje odpowiedzialne za aktywność podstawową indukowaną nie zachodzą na siebie [61]. Natomiast w genie myszy wydają się one zachodzić na siebie, co sugeruje obserwacja, że w komórkach Y1, w których wprowadzono mutację w genie kinazy białkowej A, zniesieniu uległ nie tylko indukowany, lecz także podstawowy poziom transkrypcji [71].

W badaniach promotora genu CYP11A człowieka użyto też związków, działających za pośrednictwem kinazy C, a więc naśladujących działanie angiotensyny II w komórkach kory nadnerczy [65]. Działanie na komórki Y1 jonoforem wapniowym A23187 i estrem forbolu TPA (*tetradecanoyl phorbol acetate*) znacznie obniża ilość mRNA P450_{scc} już po 12 godz. inkubacji, a po transfekcji konstrukcjami promotora z genem reporterem te same czynniki hamują ekspresję genu reportera [65]. Sekwencje nadające właściwości supresyjne zlokalizowano w obszarze od -89 do -343 i zauważono, że supresja ta jest wywołana zahamowaniem transkrypcji. W regionie tym nie wykryto jednak żadnych znanych sekwencji regulatorowych, tak więc mechanizm supresji pozostaje nadal niewyjaśniony [65]. Miejsca odpowiedzialne za supresję znajdują się w innych regionach niż elementy odpowiedzialne za ekspresję podstawową i regulowaną przez cAMP [65]. Stąd, nie wyjaśnia mechanizmu represji model zakładający współzawodnictwo białek inhibitorów transkrypcji, ze znanymi czynnikami transkrypcyjnymi o te same elementy *cis*. Rezultaty badań wskazują raczej, że w regulacji transkrypcji dochodzi do wzajem-



Ryc. 4. Lokalizacja sekwencji odpowiedzialnych za transkrypcję podstawową oraz indukowaną przez cAMP w regionach promotorowych genu CYP11A



Ryc. 5. Schemat regulacji hormonalnej transkrypcji genu CYP11A. Kortykotropina (ACTH), poprzez cAMP i kinazę białkową A (PKA), aktywuje białka jądrowe, które wiążąc się do elementu odpowiedzi na cAMP (CRE), regulują pozytywnie (+) transkrypcję genu CYP11A. Angiotensyna II (A II) inicjuje w komórce rozpad fosfatydyloinozytolu-4,5-bisfosforanu, doprowadzając m.in. do powstania 1,2-dwuacyloglicerolu (DAG), który aktywuje kinazę białkową C (PKC). Kinaza białkowa C fosforyluje białko(a) wiążące się do elementu odpowiedzi na estry forbolu (TRE) wpływając hamująco (-) na ekspresję CYP11A.

nej interakcji pomiędzy białkami regulującymi ekspresję genu pozytywnie i negatywnie [65] (Ryc. 5).

Jednym z czynników negatywnie regulujących ekspresję genu CYP11A jest przypuszczalnie receptor glukokortykoidów, którego obecność wykazano w korze nadnerczy [72]. Okazało się, że syntetyczny glukokortykoid, deksametazon, wiążąc się z receptorem glukokortykoidów obniża poziom mRNA 450sc w komórkach kory nadnerczy hodowanych *in vitro* [73]. Towarzyszy temu obniżenie wydzielania kortyzolu. Wyniki badań sugerują, że działanie deksametazonu zachodzi na poziomie transkrypcji. Co więcej, dowiedziono, że deksametazon hamuje stymulowaną forskoliną ekspresję genu reportera w komórkach nadnerczy, do których wprowadzono zrekombinowane plazmidy zawierające promotor genu CYP11A związany z genem CAT [73]. Dokładnej lokalizacji miejsca działania kompleksu deksametazon-receptor w regionie regulatorowym genu jednak nie ustalono; wiadomo, że znajduje się ono blisko elementu odpowiedzi na cAMP [73, 74], usytuowanego w genie bydlęcym w pozycji od -166 do -161 [62]. Tak więc możliwe są dwa sposoby wyjaśnienia mechanizmu represji wywołanej deksametazonem. Albo kompleks: receptor glukokortykoidów-deksametazon oddziałuje ze specyficzną sekwencją w obszarze promotorowym genu, albo też łączy się ze specyficznym czynnikiem transkrypcyjnym powodując jego unieczynnienie. Ze względu na to, że niskie (nie farmakologiczne) dawki deksametazonu powodowały 60% redukcję wydzielania kortyzolu [73, 74], wydaje się prawdopodobne, że glukokortykoidy przyłączając się do specyficznych receptorów hamują ekspresję genów enzymów uczestniczących w syntezie hormonów sterydowych (w tym CYP11A), co może mieć ważne znaczenie fizjologiczne.

IV. Uwagi końcowe

Na zakończenie trzeba podkreślić, że badania zmierzające do zrozumienia molekularnych mechanizmów regulacji transkrypcji genu CYP11A, jak też i innych genów, których produkty białkowe uczestniczą w procesie syntezy hormonów sterydowych wychodzą dopiero z fazy początkowej. Poznanie mechanizmu transkrypcji tych genów będzie wymagało nie tylko szczegółowej analizy specyficznych sekwencji w regionach promotorowych lecz także wnikliwych badań czynników białkowych, wiążących się z nimi. Z kolei pełniejsze zrozumienie oddziaływań białko:DNA i białko:białko w procesie transkrypcji przyczyni się być może do wyjaśnienia, na poziomie molekularnym, zjawiska zintegrowanej regulacji ekspresji genów obserwowanej w specyficznej tkankowo regulacji syntezy hormonów sterydowych.

Podziękowanie

Autorzy dziękują pani Aleksandrze Jakubowskiej-Pawłowskiej za pomoc w przepisywaniu i poprawianiu tekstu. Pracę finansowano z dotacji KBN Nr 662649203.

Artykuł otrzymano 23 marca 1994.

Zaakceptowano do druku 25 lipca 1994 r.

Piśmiennictwo:

- Gwynne JT, Strauss III JF (1982) *Endocr Rev* 3: 299-329
- Gwynne JT, Hess B (1980) *J Biol Chem* 255: 10875-10883
- Werbin H, Chaikoff IL (1961) *Arch Biochem* 93: 476-482
- Moses HL, Davis WW, Rosental AS, Garren LD (1969) *Science* 163: 1203-1205
- Garren LD, Gill GN, Masui H, Walton GM, (1971) *Rec Progr Hormone Res* 27: 433-478
- Kimuta T, Nakamura S, Huang JJ, Chu JW, Wang HP, Tsernoglou D (1973) *Ann NY Acad Sci* 212: 94-106
- Waterman MR, Simpson ER (1985) *Mol Cell Endocrinol* 39: 81-89
- Simpson ER (1979) *Mol Cell Endocrinol* 13: 213-227
- Lambeth JD, Seybert DW, Lancaster JR, Saleerno JC, Kamin H (1982) *Mol Cell Biochem* 45: 13-31
- Stone D, Hechter O (1954) *Arch Biochem* 51: 457-469
- Saez JM, Morera AM, Dazord A (1981) *Adv Cyclic Nucleotide Res* 14: 563-579
- Laragh JH, Augers M, Kelly WG, Lieberman S (1960) *J Am Med Ass* 174: 234-240
- Coleman TG, McCaa RE, McCaa CS (1974) *J Endocrinol* 60: 421-427
- Ganong BR, Loomis CR, Hannun YA, Bell RM (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1184-1188
- Kojima I, Kojima K, Rasmussen H (1985) *J Biol Chem* 260: 9177-9184
- Schibata H, Kojima I (1991) *Endocrinol Japon* 38: 611-617
- Herbert E, Uhler M (1982) *Cell* 30: 1-2
- Cathiard AM, Durand PH, Seidah MG, Chretien M, Saez JM (1985) *J Steroid Biochem* 23: 185-190
- Hofmann K, Wingender W, Finn FM (1970) *Proc Natl Acad Sci USA* 67: 829-836
- Baumann G, Felber JP (1976) *J Clin Endocrinol Metab* 42: 160-163
- Bost KL, Blalock JE (1986) *Mol Cell Endocrinol* 44: 1-9
- Ramachandran J (1985) *Endocr Res* 10: 347-363

23. Catalano RD, Stuve L, Ramachandran J (1986) *J Clin Endocrinol Metab* **62**: 300-304
24. Gallo-Payet N, Escher E (1985) *Endocrinol* **117**: 38-46
25. Yanagibashi K, Kamiya N, Lin F, Matsuba M (1978) *Endocrinol Japon* **25**: 545-551
26. Haksar A, Peron FG (1972) *Biochem Biophys Res Commun* **47**: 445-450
27. Cheitlin R, Buckley DI, Ramachandran J (1985) *J Biol Chem* **260**: 5323-5327
28. Kojima I, Ogata E (1986) *J Biol Chem* **261**: 9832-9838
29. Penhoat A, Jaillard C, Saez JM (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 4978-4981
30. Taunton OD, Roth J, Pastan I (1967) *Biochem Biophys Res Commun* **29**: 1-7
31. Kwiatkowska J (1988) *Post Biochem* **34**: 123-130
32. Linder ME, Gilnan AG (1992) *Świat Nauki* **9(13)**: 42-50
33. Podesta EJ, Milani A, Steffen H, Neher R (1979) *Biochem J* **180**: 355-363
34. Kramer RE, Rainey WE, Funkenstein B, Dee A, Simpson ER, Waterman MR (1984) *J Biol Chem* **259**: 707-713
35. Moriwaki K, Itoh Y, Iida S, Ichihara K (1982) *Life Sciences* **30**: 2235-2240
36. Boyd GS, McNamara B, Suckling KE, Tocher DR (1983) *J Steroid Biochem* **19**: 1017-1027
37. Boggaram V, John ME, Simpson ER, Waterman MR (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **160**: 1227-1232
38. Trzeciak WH, Boyd GS (1974) *Eur J Biochem* **46**: 201-207
39. Boyd GS, Trzeciak WH (1973) *Ann NY Acad Sci* **212**: 361-377
40. Obata I, Pisanuvong Y, Matsuba M (1981) *Jikeikai Med* **28**: 121-125
41. Jamal Z, Suffolk RA, Boyd GS, Suckling KE (1985) *Bioch Bioph Acta* **834**: 230-237
42. Walton GM, Gill GN, Abrass IB, Garren LD (1971) *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 880-884
43. Schulster D, Richardson MC, Palfreyman JW (1974) *Mol Cell Endocrinol* **2**: 17-29
44. Gwynne JT, Mahaffee D, Brewer Jr HB, Ney RL (1976) *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 4329-4333
45. Privalle CT, McNamara BC, Dhariwal MS, Jefcoate CR (1987) *Mol Cell Endocrinol* **53**: 87-101
46. Conneely OM, Headon DR, Olson CD, Ungar F, Dempsey ME (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 2970-2974
47. Vahouny GV, Chanderbhan R, Noland BJ, Irvin D, Dennis P, Lambeth JD, Scallen TJ (1983) *J Biol Chem* **258**: 11731-11737
48. Trzeciak WH, Simpson ER, Scallen TJ, Vahouny GV, Waterman MR (1987) *J Biol Chem* **262**: 3713-3717
49. Nakamura M, Watanuki M, Tilley BE, Hall PF (1980) *J Endocrinol* **84**: 179-188
50. Mertz LM, Pedersen RC (1989) *Endocr Res* **15**: 101-115
51. LeHoux J-G, Lefebvre A (1991) *J Mol Endocrinol* **6**: 223-230
52. Smith JR, Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS (1990) *J Biol Chem* **265**: 2306-2310
53. Osborne TF, Gil G, Goldstein JL, Brown MS (1988) *J Biol Chem* **263**: 3380-3387
54. Neher DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Gonzales FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Laper JC, Waterman MR, Waxman DJ (1991) *DNA Cell Biol* **10**: 1-14
55. Morohashi K, Sogawa K, Omura T, Fujii-Kuriyama Y (1987) *J Biochem* **101**: 879-887
56. Chung BC, Matteson KJ, Voutilainen R, Mohandas TK, Miller WL (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8962-8966
57. McMasters KM, Dickson LA, Shamy RV, Robischon K, Macdonald GJ, Moyle WR (1987) *Gene* **57**: 1-9
58. Sparkes RS, Klisak I, Miller WL (1991) *DNA Cell Biol* **10**: 359-365
59. DuBois RN, Simpson ER, Tuckey J, Lambeth JD, Waterman MR (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 1028-1032
60. Vilgrain I, Defaye G, Chambaz EM (1984) *Biochem Res Commun* **125**: 554-561
61. Hum DW, Miller WL (1993) *Clin Chem* **39**: 333-340
62. Moore CCD, Miller WL (1991) *J Steroid Biochem Mol Biol* **40**: 517-525
63. Momoi K, Waterman MR, Simpson ER, Zanger UM (1992) *Mol Endocrinol* **6**: 1682-1690
64. Ahlgreen R, Simpson ER, Waterman MR, Lund J (1990) *J Biol Chem* **265**: 3313-3319
65. Moore CCD, Brentano ST, Miller WL (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 6013-6023 (cyt. wg [62] i [63])
66. Rice DA, Kirkman SM, Aitkens LD, Mouw AR, Schimmer BP, Parker KL (1990) *J Biol Chem* **265**: 11713-11720 (cyt. wg [62] i [63])
67. Oonk RB, Parker KL, Gibson JL, Richards JS (1990) *J Biol Chem* **265**: 22392-22401
68. Hunter T, Karin M (1992) *Cell* **10**: 375-382
69. Kagawa N, Waterman MR (1991) *J Biol Chem* **266**: 11199-11204
70. Lamph WW, Dwarki VJ, Ofir R, Montminy M, Verma IM (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4320-4324
71. Wong M, Rice DA, Parker KL, Schimmer BP (1989) *J Biol Chem* **264**: 12867-12871
72. Kalinyak JE, Dorin RI, Hoffman AR, Perlman J (1987) *J Biol Chem* **262**: 10441-10444
73. Trzeciak WH, LeHoux J-G, Waterman MR, Simpson ER (1993) *Mol Endocrinol* **7**: 206-213
74. Trzeciak WH, Siemieniako B, Wiland E, Kmiecik D (1993) *Bull Pol Acad Sci* **41**: 180-181

Do członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Zarząd P.T.Bioch. uprzejmie prosi wszystkich członków o wpłatę zaległych i bieżących składek członkowskich.

Jednocześnie informujemy, że w dniu 14 września 1993 roku, na zebraniu Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego ustalono podwyższenie od roku 1994 rocznej opłaty składek członkowskich do sumy 100 000 zł. Natomiast koledzy będący członkami PTBioch mający status studenta winni wносить roczną opłatę w wysokości 50 000 zł.

Zachęcamy także do zaprenumerowania „Postępów Biochemii”.

Formy molekularne cytochromu P-450 wątroby szczura

Molecular forms of cytochrome P-450 in rat liver

KAMILA KOBYLIŃSKA*

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Formy molekularne cytochromu P-450
 - II-1. Nomenklatura genów form molekularnych cytochromu P-450
 - II-2. Właściwości fizyko-chemiczne form molekularnych cytochromu P-450
- III. Regulacja zawartości cytochromów P-450 w komórce
- IV. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: ACTH — hormon adrenokortykotropowy; DEX — deksametazon; 3-MC — 3-metylocholanren; 16 α PCN — 16 α -karbonitryl pregnenolonu TAO — triacetyloleandomycyna; TCDD — 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyn

I. Wstęp

Cytochromy P-450 stanowią grupę hemoprotein biorących udział w metabolizmie wielu związków egzogennych (leki, trucizny, środki ochrony roślin, zanieczyszczenia przemysłowe, używki), jak również w syntezie i biotransformacji ważnych fizjologicznie związków endogennych (hormony sterydowe, kwasy tłuszczowe, kwasy żółciowe, pochodne witaminy D₃, prostaglandyny, leukotrieny, aminy biogenne). Podstawową funkcją cytochromów P-450 jest przekształcanie związków niepolarnych w metabolity bardziej polarne, które mogą ulegać procesom sprzęgania (detoksykacji) i wydalania (patrz artykuł B. Bartłomowicz w *Postęпах Biochemii* [1]). Niestety, w niektórych przypadkach, procesy te mogą prowadzić do powstania pochodnych bardziej toksycznych, mutagennych lub karcinogennych [2].

II. Formy molekularne cytochromu P-450

II-1. Nomenklatura genów form molekularnych cytochromu P-450

Przeprowadzone w ostatnich latach badania spektrofotometryczne, immunologiczne, elektroforetycz-

Content:

- I. Introduction
- II. Molecular forms of cytochrome P-450
 - II-1. Nomenclature for genes of the cytochrome P-450 forms
 - II-2. Physicochemical properties of P-450 forms
- III. Regulation of amount of the cytochrome P-450 forms
- IV. Summary

ne i chromatograficzne wykazały obecność w tkankach wielu form molekularnych cytochromu P-450. Różni autorzy izolując cytochromy P-450 nadawali im własne nazwy, w konsekwencji te same formy nosiły różne oznaczenia (Tabela 1). Dopiero Nebert i wsp. [3] zaproponowali nową, spójną nomenklaturę dla genów i białek cytochromu P-450 opartą na podobieństwach sekwencji aminokwasów poszczególnych form molekularnych (Tabela 1).

Tabela 1

Formy molekularne cytochromu P-450 wątroby szczura

Rodzina/ Podrodzina genów	Geny	Nomenklatura cytochromów P-450			
		Nebert [3]	Ryan [4-9]	Guengerich [10-12]	Waxman [13-16]
CYP1	CYP1A1	1A1	c	BNF-B	BNF-B
	CYP1A2	1A2	d	BNF/ISF-G	ISF-G
CYP2	CYP2A1	2A1	a	UT-F	3
	CYP2A2	2A2	—	—	—
CYP2B	CYP2B1	2B1	b	PB-B	PB-4
	CYP2B2	2B2	c	PB-D	PB-5
	CYP2B3	2B3	—	—	—
CYP2C	CYP2C6	2C6	k	PB-C	PB-1
	CYP2C7	2C7	f	—	—
	CYP2C11	2C11	h	UT-A	2c
	CYP2C12	2C12	i	UT-I	2d
	CYP2C13	2C13	g	—	—
CYP2D	CYP2D1	2D1	—	UT-H	—
	CYP2D2	2D2	—	—	—
	CYP2D3	2D3	—	—	—
	CYP2D4	2D4	—	—	—
	CYP2D5	2D5	—	—	—
CYP2E	CYP2E1	2E1	j	—	—
	CYP3	CYP3A1	3A1	—	—
CYP4	CYP3A2	3A2	p	PB PCN-E	PB-2a
	CYP4A1	4A1	—	—	—
	CYP4A2	4A2	—	—	—
	CYP4A3	4A3	—	—	—

* Dr n. farm.; Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej, Akademia Medyczna, 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1

Zgodnie z kryteriami przyjętymi przez Nebera i wsp., w wielogenowej superrodzinie cytochromów P-450 wyróżniono 27 odrębnych rodzin genów, z których tylko 10 występuje u wszystkich ssaków. Do tej samej rodziny genów kodujących cytochromy P-450 zakwalifikowano te geny, których produkty wykazują co najmniej 40% podobieństwa sekwencji aminokwasów w porównaniu z produktami genów zaliczonych do innych rodzin. Rodziny genów oznaczono cyframi arabskimi: 1, 2, 3 itd. Cytochromy P-450, które cechowała analogia strukturalna wyższa niż 55-60% zgrupowano w podrodziny. Podrodziny oznaczono dużymi literami A, B, C itd. Formy molekularne w ramach tej samej podrodziny numerowano kolejno np. P-450 2B1, 2B2, 2B3.

Geny kodujące cytochromy P-450 oznaczono symbolem *CYP*, pisanym kursywą, natomiast na oznaczenie mRNA i białek P-450 stosuje się taki sam symbol pisany standardową czcionką. Białka P-450 można więc oznaczać np. CYP1A2, P-450 1A2 lub prościej 1A2.

Cytochromy P-450 wątroby i niektórych innych tkanek są kodowane przez geny 4 rodzin oznaczone *CYP1-CYP4* (Tabela 1). Gen kodujący mikrosomalny cytochrom P-450, który bierze udział w 7α -hydroksylacji cholesterolu zaliczono do rodziny *CYP7*. Mitochondrialne cytochromy P-450 wykorzystujące adrenodoksynę i reduktazę adrenodoksyny w syntezie sterydów, są kodowane przez geny z rodziny *CYP11* (P-450 11A1 — odpowiada za rozerwanie łańcucha bocznego cholesterolu; P-450 11B1 — bierze udział w 11β -hydroksylacji). Inne cytochromy P-450, które

biorą również udział w syntezie sterydów, są kodowane przez geny z rodziny *CYP17* (P-450 17 — aktywność 17α -hydroksylazy), *CYP19* (P-450 19 — aromataza), *CYP21* (P-450 21 — aktywność 21-hydroksylazy) oraz *CYP27* (P-450 27 — aktywność 27/25 hydroksylazy) [3, 17, 18].

II-2. Właściwości fizyko-chemiczne form molekularnych cytochromu P-450

Podstawowe właściwości fizyko-chemiczne form molekularnych cytochromu P-450 przedstawiono w tabeli 2.

Formy molekularne cytochromu P-450 mają względną masę cząsteczkową w zakresie od 47000 do 56000. Kompleksy zredukowanych cytochromów P-450 z tlenkiem węgla wykazują maksimum absorbancji w zakresie od 447 do 452 nm. Większość cytochromów P-450 występuje w formie niskospinowej, tylko cytochromy P-450 1A2 i 2E1 występują w formie wysokospinowej [10, 8].

Cytochromy P-450 charakteryzują się różną, chociaż częściowo nakładającą się, specyficznością substratową. Badania z użyciem różnych substratów (m.in. aniliny, amidopiryny, benzfetaminy, benzo[a]pirenu, etylomorfiny, etoksyrezorufiny, etoksykumaryny) wykazały, że tylko niektóre z tych związków są metabolizowane przez jedną formę molekularną cytochromu P-450 (Tabela 3). Na przykład N-demetylacja benzfetaminy jest katalizowana głównie przez cytochrom P-450 2B1, O-deetylacja etoksyrezorufiny przez cyto-

Tabela 2
Właściwości fizyko-chemiczne cytochromów P-450

Cytochromy P-450	Względna masa cząsteczkowa	Fe ⁺²	Fe ⁺³	Fe ⁺² CO	Sekwencja N-końcowa
1A1	56000	409	417	447	PSVYGFPAFTSATE
1A2	52000	410	392	447	AFSQYISLAPELLL
2A1	48000	411	417	452	MLDTGLLLVLASL
2A2	49000	413	416	449	MLDTGLLLVLASL
2B1	52000	410	417	450	MEPSILLLLALLVGF
2B2	52500	413	415(395)	450.6	MEPSILLLLALLVGF
2C6	50000	414	417	451	MDLVMLLVLTLSLI
2C7	51000	414	394(417)	448	MDLVTFVLVTLSSLI
2C11	51000	415	417	450	MDPVLVLVTLSSLL
2C12	50500	414	417	449	MDPFVVLVLSLFFLL
2C13	50000	414	417	448	MDPVVLLLLSLFFLL
2D1	52000	—	417	449.2	MELLNGTGLWSMAIF
2E1	51600	412	395	451.5	AVLGITIALLVVVA
3A1	51000	418	420	450	MDLLSALTLETWVLL
3A2	52000	410	417	449	MDLIFMLETSSLLLA
4A1	51500	418	410(396)	451.8	MSVSALSSTRFTGSI

Fe⁺² — maksymalna długość fali absorbancji zredukowanego cytochromu P-450

Fe⁺³ — maksymalna długość fali absorbancji utlenionego cytochromu P-450

Fe⁺²CO — spektrum różnicowe kompleksu zredukowanego cytochromu P-450 z tlenkiem węgla

Oznaczenia aminokwasów: A — alanina, D — kwas asparaginowy, E — kwas glutaminowy, F — fenyloalanina, G — glicyna, I — izoleucyna, L — leucyna, M — metionina, P — prolina, Q — glutamina, S — seryna, T — treonina, V — walina, W — tryptofan, Y — tyrozyna

Wyniki analizy sekwencji cDNA wskazują, że cytochromy P-450 1A1, 1A2 i 2E1 mają na N-końcu metioninę, która jest odcinana w wyniku modyfikacji posttranslacyjnych [19-21]

Piśmiennictwo: cytochromy P-450 2A2, 4A1 [22-25], pozostałe cytochromy P-450 [4-16]

Tabela 3

Specyficzność substratowa oczyszczonych form molekularnych cytochromu P-450

Reakcja/substrat	Cytochromy P-450 (nmole/min/nmole cytochromu P-450)															
	1A1	1A2	2A1	2A2	2B1	2B2	2C6	2C7	2C11	2C12	2C13	2D1	2E1	3A1	3A2	4A1
Hydroksylacja aniliny	1.0	9.6	< 0.5	< 0.5	1.8	< 0.5	< 0.1	< 0.5	1.5	< 0.5	< 0.5	2.4	12.7	—	0.2	—
N-demetylacja benzofetaminy	6.7	3.9	2.3	3.6	132.5	19.8	14.1	1.3	52.1	2.8	4.9	19.0	5.5	6.0	2.0	—
3/9-hydroksylacja benzo[a]pirenu	23.4	0.3	0.2	—	0.4	0.1	0.4	< 0.1	1.8	< 0.1	< 0.1	0.02	< 0.1	—	1.3	—
O-deetylacja 7-etoksykumaryny	97.1	0.6	0.6	0.2	9.6	2.0	0.5	< 0.5	0.9	0.7	1.1	5.2	1.2	0.05	0.8	—
O-demetylacja p-nitroanizolu	21.6	0.7	< 0.5	—	1.8	< 0.5	1.3	< 0.5	1.5	< 0.5	< 0.5	< 0.1	1.6	—	< 0.5	—
ω -hydroksylacja kwasu laurynowego	2.2	—	—	—	6.7	—	< 0.1	< 0.1	4.3	—	< 0.1	—	2.3	—	—	43.0

Piśmiennictwo: cytochromy P-450 2A2, 2D1, 3A1, 3A2 [25, 12, 40, 11], pozostałe cytochromy P-450 [4-9], ω -hydroksylacja kwasu laurynowego [31, 22]

chrom P-450 1A1, etoksykumaryna i benzo[a]piren są metabolizowane przez cytochrom P-450 1A1, anilina przez cytochrom P-450 2E1 i 1A2 [6, 9-11]. Cytochromy P-450 wykazują również regio- i stereoselektywność katalizowanych reakcji w metabolizmie takich związków jak testosteron, progesteron, czy warfaryna (Tabela 4) [9, 16, 26, 27, 10, 11].

Tabela 4

Regio- i stereospecyficzność hydroksylacji warfaryny, testosteronu i progesteronu przez oczyszczone formy molekularne cytochromu P-450

Preferencyjne pozycje hydroksylacji			
Cytochromy P-450	Warfaryna [10, 11, 27]	Testosteron [9, 16, 25-27]	Progesteron [9, 16]
1A1	R: 8, 6, 7 S: 6, 8, 7	6 β	6 β ; 16 α
1A2	—	6 β	6 β ; 16 α
2A1	— S: 4, 6	7 α	7 α
2A2	—	15 α , 7 α	6 β , 15 β
2B1	R: 4	16 α , 16 β	16 α
2B2	R: 4	16 α , 16 β	16 α
2C6	R: 7, 6, 4 S: 7, 6, 4	2 α , 16 α	16 α ; 21
2C7	—	16 α	16 α ; 2 α
2C11	R: 6, 4 S: 4, 6	2 α , 16 α	2 α ; 16 α
2C12	—	1 α , 15 α	15 α
2C13	—	6 β	6 β ; 16 α
2D1	R: 4 S: 4	—	—
2E1	—	—	—
3A1	R: 10 S: 10	6 β	—
3A2	R: 10; 4 S: 10	6 β	—
4A1	—	—	—

R, S — izomery warfaryny

Zawartość poszczególnych form molekularnych cytochromu P-450 w siateczce śródplazmatycznej zależy od stanu fizjologicznego i patologicznego zwierząt. Wyższe stężenia cytochromów P-450 (formy 2B1, 2B2, 2E1) obserwowano w warunkach głodzenia zwierząt [28, 29], w cukrzycy wywołanej alloxanem lub streptozotocyną (formy 2A1, 2C7, 2C12, 2E1, 3A2, 4A2, 4A3

[30-33]) oraz w genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniu tętniczym (formy 2A1, 2C11, 3A2 [30]).

Cytochromy P-450 wykazują specyficzność narządową, np. formy 2A1, 2A2 i 2B3 występują tylko w wątrobie [34, 35], a 2A3 w płucach [36].

Ekspresja wielu form molekularnych cytochromu P-450 zależy od płci oraz od wieku zwierząt. Na przykład cytochromy P-450 2A2, 2C11, 2C13 i 3A2 występują tylko u samców [34, 15, 37, 38], natomiast cytochrom P-450 2C12 u dojrzałych płciowo samic [15].

Wiele związków chemicznych podwyższa stężenie różnych form molekularnych cytochromu P-450. Ze względu na strukturę chemiczną oraz rodzaj indukowanej formy molekularnej związku te podzielono na następujące grupy:

1. policykliczne węglowodory aromatyczne (3-metylocholanantren, β -naftoflawon, 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyn)
2. pochodne kwasu barbiturowego (np. fenobarbital)
3. sterydy (16 α -karbonitryl pregnenolonu, deksametazon)
4. etanol i aceton
5. leki hipolipidemiczne (klofibrat, bezafibrat)
6. antybiotyki makrolidowe (triacyloleandomycyna, erytromycyna, gryzeofulwina)

Policykliczne węglowodory aromatyczne indukują przede wszystkim cytochromy P-450 1A1 i 1A2 [5, 12, 39], fenobarbital — cytochromy P-450 2B1 i 2B2 [7, 12, 13], 16 α -karbonitryl pregnenolonu i deksametazon — cytochromy P-450 3A1 i 3A2 [40-43], etanol i aceton — cytochrom P-450 2E1 [28, 44], klofibrat — cytochromy P-450 4A1-3 [22-24, 18], triacyloleandomycyna — cytochromy P-450 3A1 i 3A2 [42, 43].

Działanie indukcyjne ksenobiotyków przejawia się nie tylko przez wzrost stężenia form molekularnych cytochromu P-450 obecnych u zwierząt kontrolnych (formy konstytutywne), ale również przez indukcję nowych form. Podawanie takich związków jak DEX, 16 α PCN czy TAO powoduje indukcję syntezy cyto-

chromu P-450 3A1, który nie występuje u zwierząt kontrolnych niezależnie od płci i wieku [43].

III. Regulacja zawartości cytochromów P-450 w komórce

Wzrost stężenia cytochromów P-450 w komórce może być wynikiem aktywacji transkrypcji genów, zwiększenia stabilności mRNA oraz obniżenia szybkości degradacji białek P-450.

Liczne dane eksperymentalne wskazują, że zjawisku indukcji cytochromów P-450 towarzyszy przede wszystkim wzrost szybkości transkrypcji. Policykliczne węglowodory aromatyczne (TCDD, 3-MC, β -naftoflawon) aktywują transkrypcję genów *CYP1A1* i *CYP1A2* [17, 18, 45, 46]. Ekspresja tych genów znajduje się pod kontrolą *locus* genetycznego, oznaczonego symbolem Ah (*Aryl hydrocarbons*). Produktem genu Ah jest białko receptorowe, które wykazuje duże powinowactwo do policyklicznych węglowodórów aromatycznych. Induktory łączą się w cytoplazmie z receptorem Ah; powstały kompleks receptor-induktor jest transportowany do jądra komórkowego, gdzie aktywuje proces transkrypcji genów *CYP1A1* i *CYP1A2*. Tworzenie kompleksu induktor-receptor jest warunkiem koniecznym, ale nie wystarczającym do aktywacji receptora Ah. Kompleks induktor-receptor ulega zależnym od temperatury modyfikacjom zwiększającym jego powinowactwo do DNA [47]. W procesie aktywacji receptora Ah ważną rolę odgrywa białko szoku cieplnego Hsp90, które występuje w kompleksie z nieaktywną formą receptora. Przyłączenie induktora do tego kompleksu powoduje dysocjację białka Hsp90, co prowadzi do odsłonięcia domeny receptora wiążącej się z DNA [48]. Aktywny kompleks receptor-induktor rozpoznaje specyficzne sekwencje DNA tzw. sekwencje AhRD (*Ah-responsive domain*) [46]. Interakcja białko — DNA wywołuje zmianę konformacji chromatyny w tym regionie, która powoduje, że DNA staje się bardziej dostępny dla czynników transkrypcji. Aktywacja transkrypcji genów *CYP1A1* i *CYP1A2* jest więc bezpośrednią odpowiedzią na przyłączenie do DNA kompleksu induktor-receptor. Prowadzi to do zwiększenia stężenia *CYP1A1* i *CYP1A2* mRNA oraz odpowiadających im białek.

Inne geny cytochromów P-450 są również aktywowane za pośrednictwem odpowiednich receptorów. Sterydy (DEX i 16 α PCN) aktywują transkrypcję genu *CYP3A1* w sposób niezależny od klasycznych receptorów glikokortykosteroidów [49]. Natomiast klofibrat aktywuje transkrypcję genów z rodziny *CYP4A*, prawdopodobnie poprzez ten sam receptor, który jest odpowiedzialny za aktywację proliferacji peroksyso-mów [50].

Molekularny mechanizm indukcyjnego działania fenobarbitalu nie jest znany. Dotychczas nie znalazio-

no specyficznego komórkowego receptora fenobarbitalu. Badania z użyciem znakowanego radioaktywnie fenobarbitalu nie wykazały obecności kompleksu fenobarbital-specyficzne białko. Przyczyną tego może być brak receptora, jego niskie stężenie lub też małe powinowactwo receptora do tego leku. Wiadomo, że fenobarbital zwiększa szybkość transkrypcji genów z podrodzin: *CYP2B* (geny *CYP2B1*, *CYP2B2*) [51-53], *CYP2C* (geny *CYP2C6*, *CYP2C7*, *CYP2C11*) [54-56], oraz z rodziny *CYP3* (geny *CYP3A1* i *CYP3A2*) [35]. Stwierdzono, że cytochrom P-450 2C7 jest indukowany przez fenobarbital tylko u niedojrzałych płciowo samców [55]. Lek ten zwiększa także około 2-krotnie poziom *CYP2C11* mRNA, nie towarzyszy temu jednak wzrost stężenia białka P-450 2C11 [56].

Hormon adrenokortykotropowy (ACTH) aktywuje transkrypcję genów kodujących cytochromy P-450, które biorą udział w syntezie steroidów (formy 11A1, 11B1, 17 i 21A1) poprzez stymulację syntezy cAMP [57, 58]. W konsekwencji wzrost stężenia cAMP prowadzi do fosforylacji specyficznych białek, np. czynników transkrypcji, które następnie oddziałują z sekwencjami DNA oznaczanymi CRS (CRS — cAMP responsive sequence) [58].

Zwiększoną stabilność mRNA obserwowano w wyniku indukcji przez 3-MC i TCDD cytochromu P-450 1A2 [59-61], przez deksametazon cytochromów P-450 2B1/2B2 [62] oraz przez streptozotocynę i allosan cytochromu P-450 2E1 [63].

Etanol, aceton, izoniazyd, 4-metylopyrazol powodują około 5-krotny wzrost zawartości cytochromu P-450 2E1 nie wpływając na poziom jego mRNA. Wskazuje to na zwiększenie stabilności białka 2E1 poprzez obniżenie szybkości jego degradacji [21, 64, 65]. Antybiotyki makrolidowe np. triacetyloleandomycyna indukują cytochromy P-450 3A1 i 3A2 poprzez zwiększenie stabilności tych form [66].

IV. Podsumowanie

Z wątroby szczura wyizolowano, oczyszczono i scharakteryzowano ponad 20 różnych form molekularnych cytochromu P-450. Różnią się one masą cząsteczkową, maksimum absorpcji zredukowanego kompleksu z tlenkiem węgla, stanem spinowym, składem i sekwencją aminokwasów, specyficznością substratową, typem katalizowanej reakcji oraz wrażliwością na działanie induktorów. Formy te wykazują również specyficzność narządową, gatunkową oraz zależność od płci i wieku. Stężenie poszczególnych cytochromów P-450 zależy od stanu fizjologicznego i patologicznego zwierząt.

Artykuł otrzymano 17 stycznia 1994 r.
Zaakceptowano do druku 1 lipca 1994 r.

1. Bartłomowicz B (1986) *Postępy Biochemii* **32**: 459-467
2. Pelkonen O, Nebert DW (1982) *Pharmacol Rev* **34**: 189-222
3. Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Gonzales FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Loper JC, Sato R, Waterman MR, Waxman DJ (1991) *DNA Cell Biol* **1**: 1-14
4. Ryan DE, Thomas PE, Korzeniowski D, Levin W (1979) *J Biol Chem* **254**: 1365-1374
5. Ryan DE, Thomas PE, Levin W (1982) *Arch Biochem Biophys* **216**: 272-288
6. Ryan DE, Thomas PE, Reik LM, Levin W (1982) *Xenobiotica* **12**: 727-744
7. Ryan DE, Iida S, Wood AW, Thomas PE, Lieber CS, Levin W (1984) *J Biol Chem* **259**: 1239-1250
8. Ryan DE, Ramanathan L, Iida S, Thomas PE, Haniu M, Shively JE, Lieber CS, Levin W (1985) *J Biol Chem* **260**: 6385-6393
9. Ryan DE, Levin W (1990) *Pharmac Ther* **45**: 153-239
10. Guengerich FP, Dannan GA, Wright ST, Martin MV, Kaminsky LS (1982) *Xenobiotica* **12**: 701-716
11. Guengerich FP, Dannan GA, Wright ST, Martin MV, Kaminsky LS (1982) *Biochemistry* **21**: 6019-6030
12. Larrey D, Distlerath LM, Dannan GA, Wilkinson GR, Guengerich FP (1984) *Biochemistry* **23**: 2787-2795
13. Waxman DJ, Walsh C (1982) *J Biol Chem* **257**: 10446-10457
14. Waxman DJ, Walsh C (1983) *Biochemistry* **22**: 4846-4855
15. Waxman DJ, Dannan GA, Guengerich FP (1985) *Biochemistry* **4**: 4409-4417
16. Waxman DJ (1988) *Biochem Pharmacol* **37**: 71-84
17. Nebert DW, Gonzalez FJ (1987) *Ann Rev Biochem* **56**: 945-993
18. Gonzalez FJ (1989) *Pharmacol Rev* **40**: 243-288
19. Hines RN, Levy JB, Conrad RD, Iversen PL, Shen ML, Renli AM, Bresnick E (1985) *Arch Biochem Biophys* **237**: 465-476
20. Kawajiri K, Gotoh O, Sogawa K, Tagashira Y, Muramatsu M, Fujii-Kuriyama Y (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1649-1653
21. Song B-J, Gelboin HV, Park S-S, Yang CS, Gonzalez FJ (1986) *J Biol Chem* **261**: 16689-16697
22. Gibson GG, Orton TC, Tamburini PP (1982) *Biochem J* **203**: 161-168
23. Tamburini PP, Masson HA, Bains SK, Makowski R, Morris B, Gibson GG (1984) *Eur J Biochem* **139**: 235-246
24. Hardwick JP, Song B-J, Huberman E, Gonzalez FJ (1987) *J Biol Chem* **262**: 801-810
25. Jansson I, Mole J, Schenkman JB (1985) *J Biol Chem* **260**: 7084-7093
26. Sonderfan AJ, Arlotto MP, Dutton DR, McMillen SK, Parkinson A (1987) *Arch Biochem Biophys* **255**: 27-41
27. Namkung MJ, Yang HL, Hulla JE, Juchau MR (1988) *Molec Pharmacol* **34**: 628-637
28. Johansson I, Ekström G, Scholte B, Puzycki D, Jornvall H, Ingelman-Sundberg M (1988) *Biochemistry* **27**: 1925-1934
29. Hong J, Pan J, Gonzalez FJ, Gelboin HV, Yang CS (1987) *Biochem Biophys Res Commun* **142**: 1077-1083
30. Schenkman JB, Thummel KE, Favreau LV (1989) *Drug Metab Rev* **20**: 557-584
31. Favreau LV, Malchoff DM, Mole JE, Schenkman JB (1987) *J Biol Chem* **262**: 14319-14326
32. Dong Z, Hong J, Ma Q, Li D, Bullock J, Gonzalez FJ, Park SS, Gelboin HV, Yang CS (1988) *Arch Biochem Biophys* **263**: 29-35
33. Shimojo N, Ishizaki T, Imaoka S, Funae Y, Fujii S, Okuda K (1993) *Biochem Pharmacol* **46**: 621-627
34. Matsunaga T, Nagata K, Holsztynska EJ, Lapenson DP, Smith A, Kato R, Gelboin HV, Waxman DJ, Gonzalez FJ (1988) *J Biol Chem* **263**: 17995-18002
35. Labbe D, Jean A, Anderson A (1988) *DNA* **7**: 253-260
36. Kimura S, Kozak CA, Gonzalez FJ (1989) *Biochemistry* **28**: 3798-3803
37. Bandiera S, Ryan DE, Levin W, Thomas PE (1986) *Arch Biochem Biophys* **248**: 658-676
38. Gonzalez FJ, Song B-J, Hardwick JP (1986) *Mol Cell Biol* **6**: 2969-2976
39. Ioannides C, Lum PY, Parke DV (1984) *Xenobiotica* **14**: 119-124
40. Elshourbagy NA, Guzelian PS (1980) *J Biol Chem* **255**: 1279-1285
41. Schuetz EG, Wrighton SA, Safe SH, Guzelian PS (1986) *Biochemistry* **25**: 1124-1133
42. Halpert JR (1988) *Arch Biochem Biophys* **263**: 59-68
43. Cooper KO, Reik LM, Jayyosi Z, Bandiera S, Kelly M, Ryan DE, Daniel R, McCluskey SA, Levin W, Thomas PE (1993) *Arch Biochem Biophys* **301**: 345-354
44. Patten CJ, Ning SM, Lu AYH, Yang CS (1986) *Arch Biochem Biophys* **251**: 629-638
45. Nebert DW, Gonzalez FJ (1985) *Trends Pharmacol Sci* **6**: 160-164
46. Nebert DW, Jones JE (1989) *Int J Biochem* **21**: 243-252
47. Whitlock JP (1989) *Trends Pharmacol Sci* **10**: 285-288
48. Wilhelmsson A, Cuthill S, Denis M, Wikstrom A-C, Gustafsson J-A, Poellinger L (1990) *EMBO J* **9**: 69-76
49. Schuetz EG, Guzelian PS (1984) *J Biol Chem* **259**: 2007-2012
50. Milton MN, Elcombe CR, Gibson GG (1990) *Biochem Pharmacol* **40**: 2727-2732
51. Adesnik M, Bar-Nun S, Maschio F, Zunich M, Lippman A, Bard E (1981) *J Biol Chem* **256**: 10340-10345
52. Hardwick JP, Gonzalez FJ, Kasper CB (1983) *J Biol Chem* **258**: 8081-8085
53. Pike SF, Shephard EA, Rabin BR, Phillips IR (1985) *Biochem Pharmacol* **34**: 2489-2494
54. Friedberg T, Waxman DJ, Atchison M, Kumar A, Haaparanta T, Raphael C, Adesnik M (1986) *Biochemistry* **25**: 7975-7983
55. Barroso M, Dargouge O, Lechner MC (1988) *Eur J Biochem* **172**: 363-369
56. Shimada M, Murayama N, Yamauchi K, Yamazoe Y, Kato R (1989) *Arch Biochem Biophys* **270**: 578-587
57. John ME, John MC, Boggaram V, Simpson ER, Waterman MR (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 4715-4719
58. Zanger UM, Kagawa N, Lund J, Waterman MR (1992) *FASEB J* **6**: 719-723
59. Silver G, Krauter KS (1988) *J Biol Chem* **263**: 11802-11807
60. Kimura S, Gonzales FJ, Nebert DW (1986) *Mol Cell Biol* **6**: 1471-1477
61. Pasco DS, Boyum K W, Merchant SN, Chalberg SC, Fagan JB (1988) *J Biol Chem* **263**: 8671-8676
62. Simmons DL, McQuiddy P, Kasper CB (1987) *J Biol Chem* **262**: 326-332
63. Song B-J, Matsunaga T, Hardwick JP, Park SS, Veech RL, Yang CS, Gelboin HV, Gonzalez FJ (1987) *Mol Endocrinol* **1**: 542-547
64. Song B-J, Veech RL, Park SS, Gelboin HV, Gonzales FJ (1989) *J Biol Chem* **264**: 3568-3572
65. Tsutsumi M, Lasker JM, Takahashi T, Lieber CS (1993) *Arch Biochem Biophys* **304**: 209-218
66. Watkins PB, Wrighton SA, Schuetz EG, Maurer P, Guzelian PS (1986) *J Biol Chem* **261**: 6264-6271

Roczny spis treści tom 40, nr 1, 2, 3, 4, 1994

ARTYKUŁY

- Ewa Bartnik** — Nagrody Nobla z fizjologii lub medycyny oraz chemii w 1993 r. 4
- Henryk Berbec** — Gen p53 człowieka 6
- Maciej Szymański, Jan Barciszewski, Mirosława Barciszewska** — Mechanizm inicjacji odwrotnej transkrypcji wirusa HIV-1. 11
- Ewa Bohun, Tomasz Twardowski** — Nowe perspektywy strategii antysensu — regulacja biosyntezy białka 18
- Marek Gniazdowski** — Transkrypcja chemiczna zmodyfikowanego DNA 22
- Małgorzata M. Mroczkowska-Słupska, Jarosław T. Kuśmierk** — Molekularne podstawy mutagennego działania chlorku winylu 31
- Urszula Kralisz** — Funkcja białkowych kinaz tyrozynowych podczas aktywacji płytek krwi 40
- Czesław S. Cierniewski** — Budowa i funkcja receptorów integrynowych na przykładzie płytkowego receptora dla fibrynogenu 45
- Anna Filipek** — Agryna — budowa i rola w tworzeniu synaps nerwowo-mięśniowych 55
- Elżbieta Romanowska** — Kompleks cytochromowy b/f z błon chloroplastowych 59
- Michał Janitz, Maciej Kurpisz** — Sekwencjonowanie przez hybrydyzację — nowa metoda odczytu kodu genetycznego 72
- Małgorzata Walicka** — Naprawa DNA w genomie ludzkim 77
- Jerzy Bal** — Mukowiscydoza — podstawy wprowadzenia somatycznej terapii genowej 86
- Danuta Hulanicka, Andrzej Pałucha, Włodzimierz Zagórski** — Niekonwencjonalne strategie ochrony roślin przed infekcjami wirusowymi 91
- Renata Dąbrowska** — Cytoplazmatyczne białka motoryczne 96
- Ewa Maria Koźma, Krystyna Olczyk** — Proteoglikany hapanosiarczanowe i ich rola w organizmie 106
- Iwona Żak, Marian Drózd** — Struktura, biosynteza i funkcja oligosacharydów glikohormonów 113
- Danuta Solecka** — Udział białek w procesie aklimatyzacji roślin do niskiej temperatury 121
- Janina Kwiatkowska** — Sfingomielinowy szlak transmisji sygnałów 130
- Dorota Nowicka** — Geny kodujące receptory jonotropowe glutaminianu 135
- Małgorzata Sidorkiewicz, Andrzej Płucienniczak** — Białka kodowane przez HBV i ich wpływ na patogenezę wirusowego zapalenia wątroby typu B 143
- Ewa Sikora** — Mechanizmy śmierci programowanej komórek (apoptozy) 150
- Ewa Jaruga** — Telomerowa hipoteza starzenia się komórek 161
- Arkadiusz Szklarczyk** — Mechanizmy działania antysensownych oligodeoksyrybonukleotydów 166
- Michał Komoszyński** — Apirazy — enzymy kontrolujące stężenie wolnych nukleotydów w komórkach i tkankach 174
- Krystyna Grzelak** — Ekdysteroidy owadzie — biosynteza, metabolizm i funkcja 181
- Piotr Widlak** — Specyfika powstawania i naprawy mutagennych uszkodzeń materiału genetycznego 194
- Jarosław Marszałek** — Enzymologia replikacji DNA *Escherichia coli* 200
- Beata Schlichtholz, Thierry Soussi** — Perspektywy praktycznego zastosowania badań nad genem *p53* 211

Elżbieta Kulig — Receptor estrogenowy: budowa i funkcja w normalnej i neoplastycznej tkance 222

Andrzej Ozyhar — Receptor ekdysteroidowy *Drosophila melanogaster* — jeden z czynników transkrypcji kontrolujących metamorfozę 230

Dariusz Kmiecik, Wiesław H. Trzeciak — Udział transkrypcji genu cytochromu P450_{scc} w regulacji syntezy hormonów steroidowych w korze nadnerczy 240

Kamila Kobylińska — Formy molekularne cytochromu P-450 wątroby szczura 248

WSPOMNIENIA

Przyjaciele i współpracownicy — Profesor Józef Zborowski — Wspomnienia 2

Zofia Zielińska Profesor Tadeusz Mann — Wspomnienia 70

Indeks autorów prac przeglądowych, tom 40, 1994

B

Bal J — Zakład Genetyki, Instytut Matki i Dziecka, ul. Kasprzaka 17a, 01-211 Warszawa

Barciszewska M — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

Barciszewski J — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

Bartnik E — Zakład Genetyki UW, Al. Ujazdowskie 4, 00-478 Warszawa

Berbec H — Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej AM, ul. Lubartowska 85, 20-123 Lublin

Bohun E — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań

C

Cierniewski CS — Zakład Biofizyki, Instytut Fizjologii i Biochemii AM, ul. Lindleya 3, 90-131 Łódź

D

Dąbrowska R — Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Drózd M — Katedra i Zakład Biochemii i Chemii SAM, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice

F

Filipek A — Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

G

Gniazdowski M — Zakład Chemii Ogólnej, Instytut Fizjologii i Biochemii AM, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

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

H

Hulanicka D — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

J

Janitz M — Zakład Genetyki Człowieka, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

Jaruga E — Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12, 16, 90-237 Łódź

K

Kobylińska K — Zakład Farmakologii, Instytut Farmaceutyczny, ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa

Kmiecik D — Zakład Genetyki Człowieka, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

Komoszyński M — Zakład Biochemii, Instytut Biologii UMK, ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

Koźma EM — Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laborytoryjnej SAM, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

Kralisz U — Instytut Fizjologii i Biochemii AM, Zakład Biofizyki, ul. Lindleya 3, 90-131 Łódź

Kulig E — Zakład Biochemii AM, ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław

Kurpisz M — Zakład Genetyki Człowieka, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

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

Kwiatkowska J — Zakład Biochemii AM, ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław

M

Marszałek J — Katedra Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Mroczkowska-Słupska MM — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

N

Nowicka D — Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

O

Olczyk K — Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej ŚAM, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

Ożyhar A — Instytut Chemii Organicznej Biochemii i Biotechnologii, Politechnika Wrocławska, ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław

P

Pałucha A — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

Płucienniczak A — I Zakład Biochemii, Instytut Fizjologii i Biochemii AM, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

R

Romanowska E — Zakład Fizjologii Roślin II, UW, ul. Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa

S

Schlichtholz B — Katedra Biochemii, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Sidorkiewicz M Zakład Biochemii, Instytut Fizjologii i Biochemii AM, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

Sikora E — Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Solecka D — Zakład Fizjologii Odporności Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin UW, ul. Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa

Soussi T — U301 INSERM, 27 rue J. Dodu, 75010 Paris, France

Szklarczyk A — Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Szymański M — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

T

Trzeciak WH — Zakład Genetyki Człowieka, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

Twardowski T — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań

W

Walicka M — Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa

Widłak P — Zakład Biologii, Instytut Onkologii, Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-100 Gliwice

Z

Zagórski W — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

Zielińska Z — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Ż

Żak I — Katedra i Zakład Biochemii i Chemii ŚAM, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice

**Uprzejmie zawiadamiamy PT Koleżanki i PT Kolegów
o przeniesieniu siedziby Zarządu Głównego
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego
na teren Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
pokój 632 i 633**

Obecny adres:

**Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
Tel. bezpośredni 658 20 99
Tel. przez centralę 659 85 71 w. 352
Fax 22 53 42**

**Dyżury biura Zarządu odbywać się będą jak dotychczas
we wtorki w godz 12-18**

Kolegium Medycyny Laboratoryjnej w Polsce

Komisja Promocji

Adres
Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej
ul. Św. Agnieszki 1, 31-501 Kraków

Przewodniczący Komisji:
Dr Gerard Nowacki

tel. 22 08 39
fax: 22 83 05

Pozwalamy sobie poinformować, że powołane zostało do życia Kolegium Medycyny Laboratoryjnej w Polsce.

Kolegium powstało z inicjatywy Krajowego Zespołu Specjalistów do spraw Diagnostyki Laboratoryjnej i Diagnostyki Mikrobiologicznej, Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej oraz kilkudziesięciu specjalistów medycyny laboratoryjnej z ośrodków akademickich i pozaakademickich z całej Polski.

Zjazd założycielski odbył się w czerwcu 1993 roku w Gdańsku i zgromadził 80 członków Założycieli

W styczniu 1994 r. odbyło się Walne Zgromadzenie Członków Założycieli Kolegium w liczbie 167 osób. Walne Zgromadzenie Członków Założycieli przyjęło projekt Statutu Kolegium. Wybrano władze statutowe Kolegium, składające się z Prezydium i Rady Zarządu, Przewodniczących Komisji i Grup Roboczych oraz Komisji Rewizyjnej.

Kolegium gromadzi lekarzy i nielekarzy — specjalistów różnych dziedzin medycyny laboratoryjnej (diagnostyki laboratoryjnej), takich jak hematologia, serologia i transfuzjologia, immunologia, toksykologia, patomorfologia i cytologia kliniczna, genetyka kliniczna i cytogenetyka, medycyna nuklearna i endokrynologia, bakteriologia i wirusologia, parazytologia, biochemia i analityka kliniczna. Wspólnym i jednoczącym wszystkie dziedziny medycyny laboratoryjnej elementem jest diagnostyczny wymiar badania laboratoryjnego.

Cele i zadania Kolegium zostały przedstawione szczegółowo w Statucie. Pierwszym i najważniejszym zadaniem Kolegium jest rozwój medycyny laboratoryjnej w Polsce i kształtowanie modelu działania wszystkich dziedzin medycyny laboratoryjnej w sposób zapewniający największą jej użyteczność społeczną.

Kolegium będzie kolegialną i samorządną ale jednocześnie niezależną i elitarną reprezentacją specjalistów różnych dziedzin medycyny laboratoryjnej z ośrodków akademickich i pozaakademickich. Kolegium będzie instytucją opiniotwórczą, dbającą o prawidłowe pod względem merytorycznym, organizacyjnym i technicznym rozwiązanie wszystkich problemów w medycynie laboratoryjnej. Instytucją promującą rozwój wiedzy i praktyki laboratoryjnej, wyznaczającej standardy „dobrej praktyki laboratoryjnej”.

Kolegium będzie pełnić rolę integrującą środowisko i reprezentować je wobec organów administracji państwowej i samorządowej.

Głos kolegium będzie docierać:

- do wszystkich środowisk medycyny laboratoryjnej;
- do ośrodków władzy ustawodawczej — Sejmowej i Senackiej Komisji Zdrowia;
- do Ministerstwa Zdrowia i wszystkich jego Departamentów;
- do Urzędów Wojewódzkich i Wydziałów Zdrowia;
- wszędzie tam, gdzie podejmowane są decyzje dotyczące bezpośrednio lub pośrednio medycyny laboratoryjnej.

Kolegium widzi swoją rolę szeroko. Cele jakie sobie stawia obejmują wszystkie istotne problemy medycyny laboratoryjnej. Za najważniejsze uważamy kształtowanie modelu działania medycyny laboratoryjnej w Polsce, rozwój wiedzy i praktyki laboratoryjnej w Polsce, wyznaczanie standardów i zasad dotyczących organizacji, wymagań merytorycznych i technicznych oraz sposobu działania wszystkich

medycznych laboratoriów analityczno-diagnostycznych.

Cele edukacyjne Kolegium uwzględniają zarówno szkolenie przed- jak i podyplomowe, nie tylko w wyższych ale i w średnich szkołach medycznych. Biorąc też pod uwagę fakt, że w wielu dziedzinach medycyny laboratoryjnej pracują obok lekarzy — także nie lekarze — biolodzy, farmaceuci, chemicy i analitycy medyczni. Kolegium będzie starać się oddziaływać na kształcenie, widziane jako przygotowanie do zawodu i na system specjalizacji, który winien być zróżnicowany, dostosowany do posiadanego wykształcenia.

Kolegium będzie wspomagać wszelkie poczynania zmierzające do wprowadzenia wolnego rynku usług diagnostycznych we wszystkich działach medycyny laboratoryjnej. Będzie też współdziałać w wypracowaniu odpowiednich standardów w tym zakresie, zabezpieczających wysoki poziom badań oraz prawa pacjentów jak i pracowników laboratoriów diagnostycznych.

Cele te kolegium będzie realizować samodzielnie — formułując opinie, wyznaczając standardy, wymagania i zalecenia. Będzie również współdziałać z odpowiednimi Departamentami i Komisjami Ministerstwa Zdrowia, z instytucją krajowego nadzoru specjalistycznego i innymi instytucjami centralnymi, których działalność dotyczy medycyny laboratoryjnej. W szczególności współpraca z krajowymi zespołami specjalistycznymi może stanowić istotny element działania Kolegium i zapewnić praktyczną realizację zasad wypracowanych przez Kolegium.

Kolegium zamierza współdziałać z towarzystwami naukowymi. Kolegium nie będzie towarzystwem czy też supertowarzystwem naukowym. Nie stawia sobie takich celów.

Kolegium zamierza współdziałać z korporacjami zawodowymi, integrując środowisko medycyny laboratoryjnej i tworząc klimat zrozumienia i współdziałania ze środowiskami medycyny praktycznej, wspierając jednocześnie działania zmierzające do zlikwidowania istniejących obecnie przejawów dyskryminacji medycyny laboratoryjnej.

Kolegium przyjmuje te wszystkie zadania w poczuciu odpowiedzialności za prawidłowy rozwój i działania medycyny laboratoryjnej w Polsce. Te poczucie odpowiedzialności wypływa ze znajomości rzeczy i z przeświadczenia, że stan obecny, rzeczywistość w jakiej obecnie działamy — odbiega od wzorów i standardów obowiązujących już w innych krajach.

Mamy nadzieję, że idea Kolegium Medycyny Laboratoryjnej wpisuje się w perspektywę zmian, reformy organizacji i działania ochrony zdrowia w Polsce, i że zyska ona aprobację i poparcie środowiska.

Dr Gerard NOWACKI
Przewodniczący Komisji Promocji
i Organizacji Kolegium

Prof. Jerzy ROGULSKI
Prezes Kolegium Medycyny
Laboratoryjnej w Polsce

XXX Jubileuszowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Sprawozdanie



Attyka na Zamku Książąt Pomorskich — miejsce obrad
XXX Zjazdu



Wejście na XXX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Z upoważnienia Zarządu Głównego obrady XXX Jubileuszowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zorganizował Oddział Szczeciński PTBioch. Otrzymały się one w dniach 14—16 września 1994 w Szczecinie, na terenie Zamku Książąt Pomorskich. Na prośbę organizatorów protektorat nad Zjazdem objął JM Rektor Pomorskiej Akademii Medycznej, prof. dr hab. med. Seweryn Wiechowski. Doroczne spotkanie biochemików miało mieć, zgodnie z opinią Komitetu Organizacyjnego, oprawę godną Jubileuszu. Zamek Książąt Pomorskich wydawał się najlepszym miejscem dla przeprowadzenia obrad, usytuowania stoisk wystawowych, i najbardziej godnym dla przyjęcia, jak się okazało największej w historii Zjazdów, liczby uczestników. W Zjeździe wzięło udział 820 osób (w tym ok. 75% stanowiły osoby bardzo młode). Wśród uczestników Zjazdu znaleźli się także zaproszeni goście z Niemiec, Czech, Ukrainy, Litwy oraz Rosji i Wielkiej Brytanii, a także członkowie honorowi Towarzystwa.

Na uroczystość Otwarcia Zjazdu, która odbyła się w sali Opery i Operetki Szczecińskiej na terenie Zamku, zaproszono: Wojewodę Szczecińskiego, którego reprezentował Lekarz Wojewódzki, Prezydent Miasta Szczecina oraz rektorów uczelni szczecińskich. Gości przywitał Przewodniczący Komitetu Naukowego i Organizacyjnego profesor Zygmunt Machoy oraz rektor Pomorskiej Akademii Medycznej profesor Seweryn Wiechowski. Po bardzo serdecznym przemówieniu Prezydenta mecenasa Bartłomieja Sochańskiego, który uznał powierzenie Szczecinowi przez Zarząd Główny zorganizowania Zjazdu za zaszczyt dla miasta i środowiska, głos zabrała Prezes Towarzystwa prof. Liliana Konarska. Pani Prezes poza słowami przywitania, podziękowaniami dla organizatorów oraz życzeniami skierowanymi do uczestników Zjazdu przekazała zebranym szereg wiadomości kronikarsko-organizacyjnych z życia Towarzystwa. Korzystając z wyjątkowej i uroczystej chwili wręczyła profesorowi Zygmuntowi Machoyowi dyplom, w którym — w imieniu władz Towarzystwa i całej społeczności biochemicznej — dziękuje Profesorowi za lata działalności naukowo-społecznej w Towarzystwie oraz w środowisku polskim i poza granicami kraju.

Po oficjalnych wystąpieniach zostały wygłoszone dwa referaty plenarne: Profesor Bogusław Halikowski ze Szczecina, Członek rzeczywisty PAN, mówił na temat: „Wolne rodniki a mózg”, profesor Edmund Bauerlein z Instytutu Max Planca w Hartinsried mówił n.t.: „ATP-synthases and bacterial flagellar motor”. Po wykładach zabrała głos profesor Barbara Grzelakowska-Sztabert, organizator XXXI Zjazdu, zapraszając wszystkich zainteresowanych do Warszawy we wrześniu 1995 r. i informując o planowanych sesjach programowych. Uroczystość Sesji Otwarcia Zjazdu zakończył znakomity występ chóru Pomorskiej Akademii Medycznej, obchodzący swój jubileusz 25-lecia.

Przewodni temat „Organizmy żywe w cywilizacyjnie zmienionym środowisku naturalnym” zdominował problematykę naukową Zjazdu. Program szczegółowy oparto o zainteresowania i osiągnięcia naukowe szczecińskich i zaproszonych naukowców (dzięki temu w programie Zjazdu pojawiły się zagadnienia rzadko proponowane przez komitety naukowe) i zawierały się w następujących sesjach:

1. Molekularne mechanizmy karcinogenezy (organizatorzy: prof. Aleksandra Krygier-Stojałowska, prof. Jan Lubiński ze Szczecina)
 - Cz. I Molekularno-genetyczne mechanizmy procesu nowotworowego
 - Cz. II Proliferacja w procesie nowotworowym
 - Cz. III Zastosowanie molekularnej genetyki w diagnostyce i terapii nowotworów
 - Cz. IV Elementy karcinogenezy
2. Regulacja wytwarzania energii w komórce (organizator: prof. Mariusz Żydowo z Gdańska)
3. Molekularne i biochemiczne aspekty wirusowych i bakteryjnych chorób zwierząt (organizator: prof. Antoni Furowicz ze Szczecina)
4. Molekularne i regulacyjne aspekty systemu transportu jonów (organizator: prof. Tomasz Tyrakowski ze Szczecina)
5. Biologiczne zagrożenia związkami fluoru (organizator: prof. Zygmunt Machoy ze Szczecina)
6. Metabolizm lipoprotein (organizator: prof. Marek Naruszewicz ze Szczecina)
7. Składniki łącznotkankowe ściany naczyniowej (organizatorzy: prof. Edward Bańkowski z Białegostoku i prof. Marian Drózd z Katowic)
8. Pierwiastki śladowe w organizmach i środowisku (organizator: prof. Mikołaj Protasowicki ze Szczecina)
9. Biochemia mięśnia (organizator: prof. Marian Pytasz)
10. Wolne rodniki w medycynie i biologii (organizator: dr hab. Kazimierz Ciechanowski ze Szczecina)
11. Lektyny, selektyny i ich funkcje (organizator: prof. Zygmunt Sagan ze Szczecina)
12. Doniesienia różne (organizator: dr Teresa Wesołowska ze Szczecina)
 - Cz. I Molekularne podstawy biotechnologii
 1. Biologia molekularna (organizator: prof. Tomasz Twardowski z Poznania)
 2. Biotechnologia (organizator: prof. Stanisław Bielecki z Łodzi)
 - Cz. II Elementy toksykologii i diagnostyki klinicznej (organizator: dr Teresa Wesołowska ze Szczecina)
 - Cz. III Biochemia zwierząt (organizator: dr Teresa Wesołowska ze Szczecina)
 - Cz. IV Biochemia roślin (organizator: prof. Jan Kępczyński ze Szczecina)

Formuła sesji „Doniesienia różne” została zmieniona przez organizatora. Nadesłane prace, po kwalifikacji tematycznej, stały się materiałem dla podsesji. W ten sposób „Doniesienia różne” zyskały własny program. Do każdej nowej Sesji zostali zapraszani przewodniczący oraz wykładowcy spinający w całość zagadnienia poruszane w czasie tematycznej sesji plakatowej. Wydaje się, że sesja „Doniesienia różne” prowadzona w innej formie aniżeli czysto plakatowa silniej satysfakcjonuje autorów i motywuje uczestników do większego wysiłku intelektualnego i aktywności w czasie dyskusji. Dowodem przychylnego przyjęcia zmiany w prowadzeniu sesji „Doniesienia różne” była frekwencja na w/w sesjach.

Symposium satelitarne: „Biochemiczne i patofizjologiczne aspekty regulacji ustrojowej” (organizator: prof. Tomasz Tyrakowski ze Szczecina) wyprzedzało obrady Zjazdu o jeden dzień (13.09.94), a symposium satelitarne „Glikozylacja i glikokonjugaty w fizjologii i patologii” (organizatorzy: prof. Jerzy Kościelak z Warszawy i prof. Elwira Lisowska z Wrocławia) zamykało obrady Zjazdu w dniu 16 września.

Przedstawione prace plakatowe w sesjach programowych i „Doniesieniach różnych” były integralną częścią sesji i stanowiły równocenną formę prezentowania prac obok komunikatów ustnych. Dlatego uczestnicy przygotowali po kilka przezroczy dla ich wykorzystania w dyskusjach końcowych. Opracowania plakatowe prac prezentowano w Sali Stanisława Leszczyńskiego w Zamku na estetycznych stelazach. Miejsce i sposób prezentacji podnosiły istotnie wartość Sesji.

W czasie Zjazdu przedstawiono łącznie 671 doniesień, w tym 70 wykładów w Sesjach. 7 wykładów prezentowały Firmy. Większość prac znalazło swoje miejsce na plakatach.

Tematyka niektórych sesji cieszyła się ogromnym zainteresowaniem uczestników i osób z poza Zjazdu; szczególnie dużą frekwencję miała sesja „Molekularne mechanizmy karcinogenezy”, gdzie wykładowcami byli m.in. prof. M. Chorąży, J. Steffen, W. J. Stec, S. Szala. Sesja „Molekularne i biochemiczne aspekty wirusowych i bakteryjnych chorób zwierząt” mimo bardzo specjalistycznego charakteru miała licznych słuchaczy i dyskutantów. Niezmiernym zainteresowaniem, ze względu na aktualność tematu, cieszyły się sesje: „Pierwiastki śladowe w organizmach i środowisku”, „Biologiczne zagrożenia związkami fluoru”, „Metabolizm lipoprotein”, a w sesji „Doniesienia różne” — „Molekularne podstawy biotechnologii”, „Elementy toksykologii i diagnostyki klinicznej” oraz „Biochemia roślin”.

W czasie Zjazdu przeprowadzono dwa konkursy przewidziane wcześniejszymi postanowieniami ZG: o nagrodę imienia Włodzimierza Mozołowskiego i imienia Janiny Opieńskiej-Blauth, oraz konkurs za-

proponowany i sponsorowany przez Firmę M&C Lab. dla najlepszej prezentacji.

Materiały zjazdowe zostały wydane w formie szczegółowego „Programu”, w którym z okazji XXX jubileuszowego Zjazdu zamieszczono także informacje o składzie osobowym Zarządu Głównego i zarządów oddziałów terenowych, o sekcjach tematycznych, wydawnictwach i nagrodach Towarzystwa oraz w postaci tomu „Streszczenia” referatów i komunikatów, przygotowanych do druku ze składu komputerowego. Wydawnictwa częściowo finansował KBN. Specjalnie dla sesji „Biologiczne zagrożenia związkami fluoru” została wydana kolejna recenzowana publikacja książkowa „Metabolizm fluoru '94”, zawierająca skrócone wersje referatów i pełne publikacje komunikatów ze streszczeniami w języku angielskim i dwujęzycznymi tytułami prac (objętość 101 stron). Wydawnictwo to zostało sfinansowane ze środków Ministerstwa Zdrowia i Opieki Społecznej.

43 firmy prezentowały i oferowały, w pięknych budowanych na indywidualne zamówienia stoiskach, aparaturę, sprzęt, chemikalia i środki pomocnicze niezbędne w badaniach naukowych.

Organizację Zjazdu wspomagali sponsorzy miejscowi m.in. Browar Szczeciński, Szczecińska Spółdzielnia Mleczarska, PZM, PSM, „Hartwig”, Bank Ochrony Środowiska oraz firmy Behring Werke A. G. Hoechst Polska Sp. z o.o., Intimex, Merck, Perkin Elmer, Zepter.

Na imprezy towarzyszące złożyły się: koncert zespołu instrumentalno-wokalnego „Camerata Nova” pod batutą dyrektora Zamku, Eugeniusza Kusa; koncert sponsorowała firma Perkin Elmer, spotkania towarzyskie w salach kawiarni „Zamkowa”, wycieczki autokarowe po Szczecinie oraz do Berlina.

W czasie Zjazdu odbyło się posiedzenie Sekcji d/s Dydaktyki i posiedzenie Zarządu Głównego. Zjazd poprzedziła konferencja prasowa, w czasie której dziennikarze z mediów szczecińskich dowiedzieli się o celu Zjazdu, problematyce naukowej obrad i jednostek tworzących program Zjazdu oraz o oczekiwaniach organizatorów-naukowców pracujących w uczelniach Szczecina ze strony władz i przemysłu. Dzięki konferencji dziennikarze i reporterzy byli obecni na uroczystości otwarcia, w czasie Zjazdu oraz na uroczystości zamknięcia obrad. Wiadomości, komentarze i rozmowy z uczestnikami wybranych sesji przekazywano mieszkańcom Szczecina na bieżąco.

Wielu uczestników Zjazdu pozostało do końca z organizatorami i na uroczystości zamknięcia obrad Sala Księcia Bogusława była wypełniona. Najważniejszym punktem programu było ogłoszenie przez Prezesa Towarzystwa profesor Lilianę Konarską decyzji jury konkursowych i wręczenie nagród oraz wyróżnień.

W konkursie o nagrodę im. prof. Włodzimierza Mozłowskiego I nagrodę (sponsorowaną przez firmę Intimex) otrzymał Wojciech G. Musiał z Poznania za pracę „Transformacja tytoniu nikotiana tabacum genem białka otoczki wirusa ospowatości śliwy” oraz współautorstwo w pracy „Ekspresja genu białka otoczki wirusa ospowatości śliwy (PPV) w transformantach H tabacum”. Wyróżnienia otrzymali: Sławomir Dąbrowski z Gdańska za opracowanie „Badanie produktów PCR genu kodującego ludzką amylogeninę” i Barbara Niewczas z Warszawy za pracę „Regulacja kanału wapniowego na błonie komórkowej hepatomy H-35”.

W konkursie o nagrodę im. prof. Janiny Opieńskiej-Blauth (fundatorem jest Oddział PTBioch w Lublinie) wzięło udział 8 studentów: Sławomir Majdanik, Anna Herman, Sylwia Świtkowska, Borys Wróbel, Małgorzata Borzym, Beata Narożny, Maciej Król i Aleksander Rojek. I nagrodę otrzymała Anna Herman z Gdańska za pracę „Kontrola replikacji DNA przez czterofosforan guanozyny w komórkach Escherichia coli”, a trzy równorzędne nagrody II uzyskali: Maciej Król z Łodzi za pracę „Wpływ ambroksolu na wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia w ludzkich granulocytach obojętnochłonnych po stymulacji peptydem chemotaktycznym FMLP i konkawaliną A”, Sławomir Majdanik z Lublina za pracę „Wpływ DMSO na aminoacylację tRNA” oraz Aleksandra Rojek z Warszawy za pracę „Wpływ ATP i tapsigarginy na uwalnianie Ca²⁺ do cytosolu komórek glejaka C6”. Wszyscy uczestnicy tego konkursu otrzymali certyfikaty stwierdzające udział w konkursie.

Model cząsteczki DNA z firmy M&C Lab. jako nagrodę dla najlepszej prezentacji posterowej otrzymał zespół E. Poręba, A. Goździcka-Józefiak, H. Kędzia z Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM w Poznaniu za pracę „Analiza czynników komórkowych oddziałujących z wirusem HPV 16 w procesie onkogenezy”.

Na koniec uroczystości przewodniczący Komitetu Naukowego i Organizacyjnego Zjazdu Zygmunt Machoy i Prezes Towarzystwa Liliana Konarska podziękowali Komitetowi Organizacyjnemu za przygotowanie Zjazdu. Były to podziękowania bardzo przyjemne i potrzebne, bowiem Zjazd przygotowali w jego zasadniczej formie, poza niżej podpisanymi jeszcze tylko dwie osoby, dr Dorota Samujło i dr Tadeusz Ogoński. W ostatniej fazie przygotowań pracowało na rzecz gości i ogólnej oprawy obrad wiele osób, nie tylko członków Towarzystwa. Ich nazwiska dla większości z 820 gości pozostaną nieznane. Uczuciu radości z racji udanego Zjazdu towarzyszy uczucie żalu; tyle pracy i już po Zjeździe.

Był Zjazd... Za rok będzie kolejny XXXI w Warszawie.

Teresa Wesółowska, Zygmunt Machoy

RECENZJA KSIĄŻKI

Andrzej Jerzmanowski: **GENY I LUDZIE**

Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne
Warszawa 1994, str. 292

Jest to jedna z najlepiej napisanych książek, jakie czytałem, popularyzujących zagadnienia i osiągnięcia współczesnej biologii, zwłaszcza molekularnej, oraz pokazująca możliwe ich konsekwencje teraz i w przyszłości. Autor odsłania przed czytelnikiem elementy warsztatu badawczego, które do tych wyników doprowadziły, a także problemy i konflikty, w które uwikłani bywają ludzie zajmujący się pracą naukową. Wykazał przy tym niewątpliwy talent publicystyczny, przez co tekst czyta się z dużą przyjemnością, chwilami z napięciem. Opis historii odkrycia i scharakteryzowania wirusa HIV może być podstawą scenariusza sensacyjnego filmu, chociaż książka nie jest pisana w tonie sensacji. Myślę, że wielu z nas, dla których merytoryczna treść publikacji nie stanowi nowości, książka ta pokazuje jak można przełamywać hermetyczny język specjalistyczny w porozumiewaniu się z ludźmi innych specjalności.

W książce przedstawiony jest stan wiedzy na temat molekularnych aspektów funkcjonowania komórek i organizmów ilustrowany szczegółowszymi opisami mechanizmu działania wirusa AIDS, biologicznych mechanizmów transformacji nowotworowych i procesów starzenia się, a więc zjawisk szczególnie dziś pasjonujących wielu ludzi. Co ważne, autor nie straszy (jak to często czynili dziennikarze) perspektywami skonstruowania przez biologów nowych organizmów, nad którymi straci się kontrolę i które zagrażą ludzkości.

Opisom biologicznym towarzyszą pewne refleksje filozoficzne autora na temat wpływu obecnych i przewidywanych osiągnięć biologii na ogólną kondycję ludzkości. Jak większość współczesnych przyrodników jest on dzieckiem Oświecenia — wierzy w postęp wiedzy i jej dobroczynną rolę dla człowieka, chociaż nie bez pewnych wahań. Zaiste wydaje się, że istnieją realne szanse na to, że nauka pozwoli skutecznie zwalczać raka i leczyć choroby dziedziczne, ale będzie też niewątpliwie narastać rozdźwięk między możliwościami medycyny a finansowymi możliwościami ludzi, którzy chcieliby z nich skorzystać.

Wreszcie pytanie o dalsze wyzwania jakie natura stawia przed biologami. Autor upatruje je w ustaleniu „molekularnych i logicznych podstaw najbardziej zaawansowanych funkcji mózgu”, co może kiedyś stworzyć podstawę do przeniesienia świadomości poza ciało, „do zewnętrznego systemu magazynującego i analizującego dane”. Jest to perspektywa niezmiernie intrygująca wielu badaczy. Czy nie ociera się ona jednak o granice ludzkiego poznania? Jeśli chodzi o świat cząstek elementarnych, granicę taką wyznacza zasada nieoznaczoności Heisenberga. Być może, podobna teoretyczna granica poznania istnieje też na drugim biegunie organizacji materii, w jej najbardziej złożonej postaci — w strukturze mózgu i stanach jego świadomości.

Fakt, że omawiana książka, formalnie o biologii molekularnej, prowokuje do tego typu rozważań, świadczy o szerokości perspektywy, w jakie autor widzi własną dziedzinę badawczą.

Andrzej Paszewski

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii” w 1995 r. należy wpłacić odpowiednią kwotę na konto bankowe wydawcy (Polskiego Towarzystwa Biochemicznego) za pomocą przekazu zamieszczonego na odwrocie. Zamówione egzemplarze będziemy wysyłać pocztą na adres podany nam na przekazie. Ponieważ odcinek przekazu docierający do nas jest jednocześnie zamówieniem, prosimy o **bardzo wyraźne** napisanie

imienia, nazwiska (lub nazwy instytucji) i dokładnego adresu wraz z kodem pocztowym (DRUKOWANYMI LITERAMI) na wszystkich trzech odcinkach przekazu.

Prenumerata krajowa dla instytucji:
580 000 zł.

Prenumerata krajowa indywidualna:
280 000 zł, (50% zniżki dla członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego).

**Prenumerując
„Postępy
Biochemii”
wspierasz
swoje
czasopismo!**

Kolejny, XXXI, Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbędzie się w Warszawie w dniach 6-8 września 1995 r. Pierwsze zawiadomienie Członkowie otrzymają w listopadzie.

PROGRAM NAUKOWY ZJAZDU:

1. Rola błon w regulacji procesów komórkowych.
2. Mięśnie w normie i patologii.
3. Biologia komórki nowotworowej.
4. Geny i genomy.
5. Biochemia receptorów.
6. Procesy biotransformacji.
7. Regulacja hormonalna.
8. Nauczanie biochemii.

Zjazdowi towarzyszyć będą wystawy sprzętu laboratoryjnego, aparatury i odczynników. Przewiduje się umieszczenie ogłoszeń w materiałach zjazdowych.

Zainteresowanych uczestnikom w Zjeździe, a także osoby chcące zasięgnąć informacji w sprawie wystaw i ogłoszeń prosimy o kontakt z sekretarzem Oddziału Warszawskiego, pod następującym adresem:

Doc. dr hab. Katarzyna NAŁĘCZ,
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa,
tel. 659-85-71 w. 303, fax 22-53-42.

Z przyjemnością informujemy, że — wzorem lat ubiegłych — biochemicy polskiego pochodzenia i Polacy pracujący w krajach byłego Związku Radzieckiego mogą ubiegać się o pokrycie kosztów uczestnictwa w Zjeździe i pobytu w Warszawie. Serdecznie zapraszamy i prosimy o powiadomienie o tej możliwości zainteresowanych kolegów. Zgłoszenia przyjmuje Pełnomocnik Zarządu do kontaktów z kolegami w krajach byłego ZSRR — profesor dr med. Marek Gniazdowski z Zakładu Chemii Ogólnej Akademii Medycznej (ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź, tel. 784-277) oraz Zarząd Główny P.T. Bioch. (ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa).



Pokwitowanie dla wpłacającego

Odcinek dla posiadacza rachunku

Odcinek dla poczty lub banku

zł

zł

zł

słownie

słownie

słownie

wpłacający

wpłacający

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

na rachunek

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
37 00 44-1225-139-11

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
37 00 44-1225-139-11

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
37 00 44-1225-139-11

stempel

Pobrano opłatę

stempel

Pobrano opłatę

stempel

Pobrano opłatę

.....
podpis przyjmującego

zł

.....
podpis przyjmującego

zł

.....
podpis przyjmującego

zł

Wskazówki dla autorów

Wydawany przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje prace przeglądowe omawiające bieżące osiągnięcia, koncepcje i kierunki badawcze w dziedzinie biochemii i nauk pokrewnych; publikuje też noty z historii biochemii, zasady polskiego słownictwa biochemicznego, recenzje nadesłanych książek oraz sprawozdania ze zjazdów, konferencji i szkół, w których biorą udział członkowie Towarzystwa.

Prace przeznaczone do publikacji w „Postępkach Biochemii” mogą mieć charakter artykułów monograficznych (do 20 stron tekstu licząc piśmiennictwo i tabele), minireviews (do 10 stron tekstu), oraz krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach (do 5 stron tekstu).

Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowania piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienie zilustrowane za pomocą tabel, rycin, (wykresy, schematy, reakcje), wzorów i fotografii.

Wskazany jest podział artykułów monograficznych na rozdziały i podrozdziały, których rzeczowe tytuły tworzą spis treści. Zgodnie z przyjętą konwencją rozdziały noszą cyfry rzymskie podrozdziały odpowiednio rzymskie i arabskie np. I-1, I-2. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy przeto winni unikać składni obcojęzycznej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie doraźnie tworzonych skrótów, nawet jeżeli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z nadesłanych do Redakcji prac podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzenia zmian nie wpływających na treść pracy, deklaruje też gotowość konsultowania tekstu z Autorami.

Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznacznie z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. W przypadku, gdy Autor(zy) zamierza(ją) włączyć do swego autora artykułu ilustracje publikowane przez autorów prac cytowanych, należy uzyskać i przekazać nam odpowiednią zgodę na przedruk.

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, czcionką wielkości standardowej, z podwójną interlinią, z lewym marginesem ok. 4 cm z trzydziestoma wierszami na stronie i 60 znakami w wierszu (litera + odstęp), odstępy pomiędzy wyrazami powinny odpowiadać jednemu znakowi (nie równać do prawego marginesu).

W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń, ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie co do charakteru czcionki drukarskiej mogą Autorzy zaznaczyć ołówkiem na marginesach maszynopisu. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego trzeba na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie.

Strona informacyjna maszynopisu jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) autora (ów), nazwy, adresy wraz z numerem telefonu zakładów (w języku polskim

i angielskim), w których pracują autorzy, adres do korespondencji nr telefonu i ewentualnie fax, adresy prywatne autorów, tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrót tytułu pracy (do 25 znaków).

Strona 1 (tytułowa) zawiera imiona i nazwiska autorów, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści też w obu językach, tytuł naukowy każdego z autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym oraz wykaz stosowanych skrótów.

Kolejno numerowane dalsze strony obejmują tekst pracy, piśmiennictwo, tabele, podpisy i objaśnienia rycin, wzorów i fotografii.

PIŚMIENNICTWO: Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3,7,9,—26]. Odnośniki bibliograficzne winny mieć nową uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanej przez tych samych redaktorów (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady:

1. Hildenbrandt GR, Aronson NN (1980) *Biochim Biophys Acta* **631**: 499—502
2. Bostock CJ, Sumner AT (1978) *The Eukaryotic Chromosome*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam
3. Norberth T, Piscator M (1979) W: Friberg L, Nordberg GF, Von VB (red) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str 541-553
4. Delej J, Kesters K (1975) W: Florkin M, Stotz EH (red) *Comprehensive Biochemistry* t 29B. Elsevier, North-Holland Amsterdam, str 1-77
5. Franks NP, Lieb WR (1981) W: Knight CG (red) *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t 7. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str 243-272

ILUSTRACJE: Ryciny winny być gotowe do reprodukcji. Fotografie czarno-białe (kontrastowe), powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub kalce technicznej. Wskazane jest, aby ryciny były dwukrotnie większe od przyszłej reprodukcji, tj. w skali 2:1. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmie redakcja. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: tabele i ryciny noszą cyfry arabskie, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołówkiem preferowane miejsce umieszczenia tabeli, ryciny, czy wzoru. Tabele odpowiednio porubrykowane, winny być opatrzone jednoznacznym tytułem i ewentualnie także niezbędnymi objaśnieniami. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Ilustracje należy podpisać nazwiskiem pierwszego z autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „górną-dół” (ołówkiem na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

Maszynopis i załączniki (w dwu egzemplarzach), właściwie zabezpieczone przed uszkodzeniem w czasie transportu, należy przesać na adres:

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego,
ul. Pasteura 3,
02-093 Warszawa

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN zmienił siedzibę

Z przyjemnością zawiadamiamy, że nasz Instytut ma nowy adres. W październiku 1994 r. wszyscy pracownicy IBB znaleźli się w nowych budynkach. Współgospodarzami gmachów jest Zakład Genetyki i częściowo Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin, Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Z okazji oddania do użytku nowej siedziby, w dniach 28—30 listopada 1994 r. odbyło się sympozjum przedstawiające dorobek naukowy Instytutu i związanych z nami jednostek UW. Program sympozjum obejmował również następujące dyskusje zespołowe: „Edukacja w dziedzinie biologii”, „Biologia XXI wieku” oraz „Skąd idziemy dokąd zmierzamy”.

W sympozjum obok pracowników IBB PAN i UW wzięli udział liczni zaproszeni goście w tym nasi koledzy pracujący obecnie za granicą.

Nasz nowy adres: Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa, telefony 658 44 99 (centrala), 658 47 24 (sekretariat) i fax 658 46 36.

Dyrekcja Instytutu

