

# POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN  
0032-5422



## Advances in Biochemistry

TOM 40, NR 1, 1994

<b>Józef Zborowski</b>	
— Wspomnienia . . . . .	2
<b>Nagrody Nobla 1993 . . . . .</b>	<b>4</b>
<b>Gen p53 . . . . .</b>	<b>6</b>
<b>Transkrypcja wirusa HIV-1 . . . . .</b>	<b>11</b>
<b>Regulacja „Antysensem” . . . . .</b>	<b>18</b>
<b>Transkrypcja zmodyfikowanego DNA . . . . .</b>	<b>22</b>
<b>Mutagenne działanie chlorku winyłu . . . . .</b>	<b>31</b>
<b>Białkowe kinazy tyrozynowe . . . . .</b>	<b>40</b>
<b>Receptory integrynowe . . . . .</b>	<b>45</b>
<b>Agryna . . . . .</b>	<b>55</b>
<b>Kompleks cytochromowy b/f . . . . .</b>	<b>59</b>
<b>Sprawozdanie Zarządu Głównego . . . . .</b>	<b>63</b>

**Biospecyficzne czyste  
i dokładnie oznaczone  
ULTRAPURE BIOREAGENTS**

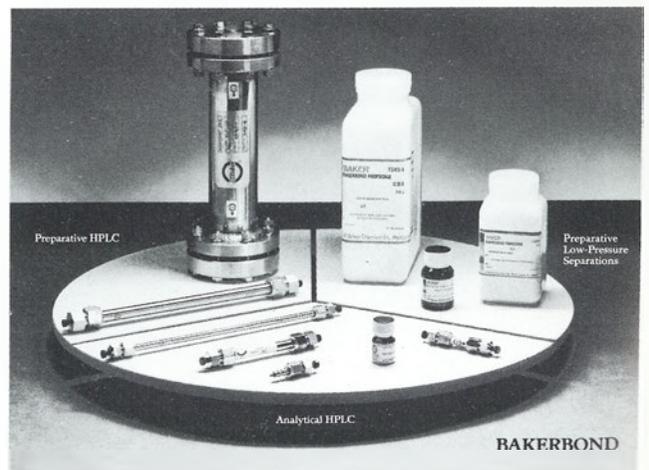


Wysoka i starannie oznaczona czystość, bez zanieczyszczeń aktywnych biologicznie – to szczególna cecha ULTRAPURE BIOREAGENTS. Stosując je w badaniach molekularno-biologicznych ogranicza się zakłócający wpływ zanieczyszczeń wprowadzanych z odczynnikami i w ten sposób unika się powtarzania oznaczeń. Równocześnie 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

**Dzięki SCOUT –  
od analityki do preparatyki.  
Biopolimery od  $\mu\text{g}$  do kg**



**BAKERBOND umożliwia stopniowanie**

Fazy BAKERBOND Wide-Pore pozwalają na chromatograficznie czystą izolację biopolimerów. Metody opracowane przy użyciu kolumn BAKERBOND SCOUT ( $4,6 \times 50$  mm,  $5 \mu$ ) mogą być bez problemu wykorzystane w skali produkcyjnej ( $40 \mu$ ). Nośnikiem dla faz BAKERBOND jest żel krzemionkowy. Niezależnie od wielkości ziarna chemiczne pokrycie jest takie samo. Istotnymi cechami tych faz są: specyficzność wiązania, wysoki odzysk obliczany na podstawie masy i aktywności ( $>95\%$ ) i wysoka zdolność wiązania ( $150$  mg/g).

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

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

**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  
EWA BARTNIK  
(Warszawa)  
KSENIA BYKOWSKA  
(Warszawa)  
MACIEJ GARSTKA  
(Warszawa)  
ANNA JAKUBIEC-PUKA  
(Warszawa)  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
(Warszawa)  
BOŻENA KAMIŃSKA  
(Warszawa)  
IRENA KĄKOL  
(Warszawa)  
JAROSŁAW KUŚMIEREK  
(Warszawa)  
GRAŻYNA PALAMARCZYK  
(Warszawa)  
JANUSZ SIEDLECKI  
(Warszawa)  
RYSZARD SŁOMSKI  
(Poznań)

**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

<b>Profesor Józef Zborowski — Wspomnienia</b> Professor Józef Zborowski — Obituary PRZYJACIELE I WSPÓŁPRACOWNICY . . . . .	2
<b>Nagrody Nobla z fizjologii lub medycyny oraz z chemii w 1993 r</b> Nobel prizes 1993 in medicine or physiology and chemistry EWA BARTNIK . . . . .	4
<b>Gen p53 człowieka</b> Human gene p53 HENRYK BERBEĆ . . . . .	6
<b>Mechanizm inicjacji odwrotnej transkrypcji wirusa HIV-1</b> Mechanism of HIV-1 reverse transcription initiation MACIEJ SZYMAŃSKI, JAN BARCISZEWSKI, MIROŚŁAWA BARCISZEWSKA . . . . .	11
<b>Nowe perspektywy strategii antysensu — regulacja biosyntezy białka</b> New possibilities of antisense strategy — regulation of protein biosynthesis EWA BOHUN, TOMASZ TWARDOWSKI . . . . .	18
<b>Transkrypcja chemiczna zmodyfikowanego DNA</b> Transcription of chemically modified DNA MAREK GNIAZDOWSKI . . . . .	22
<b>Molekularne podstawy mutagennego działania chlorku winylu</b> Molecular basis of mutagenic activity of vinyl chloride MAŁGORZATA M. MROCZKOWSKA-SŁUPSKA, JAROSŁAW T. KUŚMIEREK . . . . .	31
<b>Funkcja białkowych kinaz tyrozynowych podczas aktywacji płytek krwi</b> Role of protein tyrosine kinases during platelet activation URSZULA KRALISZ . . . . .	40
<b>Budowa i funkcja receptorów integrynowych na przykładzie płytkowego receptora dla fibrynogeny</b> Structure and function of integrin receptors based on platelet receptor for fibrinogen CZESŁAW S. CIERNIEWSKI . . . . .	45
<b>Agryna — budowa i rola w tworzeniu synaps nerwo-mięśniowych</b> Agrin — structure and role in neuromuscular junction ANNA FILIPEK . . . . .	55
<b>Kompleks cytochromowy b/f z błon chloroplastowych</b> Cytochrome b/f complex of chloroplast membranes ELŻBIETA ROMANOWSKA . . . . .	59
<b>Sprawozdanie Zarządu Głównego za 1993 r.</b> Annual Report LILIANA KONARSKA . . . . .	63



Professor Józef Zborowski  
1937—1993

25 grudnia 1993 r. zmarł nagle w wieku 56 lat profesor Józef Zborowski. Jego osiągnięcia naukowe stanowią cenny wkład w rozwój nauk biologicznych.

Kariera naukowa profesora Józefa Zborowskiego związana była z Instytutem Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, w którym pracował przez ponad 30 lat. Pracę badawczą w Instytucie rozpoczął jeszcze jako student Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego w 1962 roku, wykonując pod kierunkiem prof. Lecha Wojtczaka pracę magisterską. Bezpośrednio po ukończeniu studiów pracował przez rok w Katedrze Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Warszawskiego, a następnie w latach 1963—1967 odbył studia doktoranckie w Instytucie Nenckiego, specjalizując się w zakresie bioenergetyki mitochondriów i metabolizmu fosfolipidów. Stopień doktora nauk przyrodniczych uzyskał w roku 1968, a doktora habilitowanego w 1983 roku. W trzy lata później utworzył Pracownię Biochemii Lipidów w Zakładzie Biochemii Komórki Instytutu Nenckiego. W roku 1992 uzyskał tytuł profesora.

Professor Józef Zborowski odbył kilka staży badawczych w poważnych ośrodkach zagranicznych specjalizujących się w biochemii lipidów oraz w badaniu organizacji i funkcji błon biologicznych, między innymi w laboratorium Chemii Fizjologicznej w Groningen (prof. G. Scherphof) i Zakładzie Biochemii Uniwersytetu Teksańskiego w San Antonio (prof. N. C. Robinson). Ponadto współpracował z laboratoriami w Utrechcie, Helsinkach, Pradze, Perugii i Londynie, propagując polską naukę i utrzymując wysoki poziom badań prowadzonych przez swój zespół. Zdaniem prof.

L. M. G. van Golde (Utrecht) był On doskonałym Ambasadorem Instytutu Nenckiego. Swe liczne prace doświadczalne, monograficzne i przeglądowe publikował w czołowych czasopismach naukowych. W czasie pobytów za granicą wygłaszał wykłady i odczyty seminaryjne, a także aktywnie uczestniczył w wielu sympozjach krajowych i międzynarodowych. Dowodem uznania dokonań naukowych profesora Zborowskiego jest fakt, że profesorowie L. L. van Deenen, B. de Kruijff (Holandia), P. Somerharju (Finlandia) i L. Corazzi (Włochy) wyrażając żal z powodu przedwczesnego odejścia ich przyjaciela, deklarują chęć współpracy z grupą Jego uczniów.

Prace badawcze profesora Józefa Zborowskiego koncentrowały się wokół problemów związanych z biosyntezą fosfolipidów, głównie fosfatydyloinozytolu i fosfatydyloseryny, ich wewnątrzkomórkowym transportem oraz funkcją w błonach biologicznych. Dotyczyły one również oddziaływań lipidów z białkami błonowymi i wpływu składu lipidowego błony na aktywność niektórych enzymów. Wiele uwagi poświęcił także konstruowaniu liposomów, możliwości ich wykorzystania do docelowego wprowadzania leków do komórek wątroby oraz badaniom interakcji liposomów z białkami osocza krwi. Zdaniem prof. G. L. Scherphof'a badania te otworzyły nowe perspektywy badawcze.

W Instytucie Nenckiego profesor Józef Zborowski sprawował przed kilku laty funkcję zastępcy Dyrektora do spraw Naukowych, a także zastępcy kierownika, koordynowanego przez Instytut jednego z Centralnych Programów Badawczych, a ostatnio — koordynatora międzynarodowego programu TEMPUS. Brał także udział, jako redaktor lub recenzent w pracach redakcji *Postępów Biochemii*, *Acta Biochimica Polonica*, *Biochimica et Biophysica Acta*, *Diabetes, Nutrition and Metabolism (Clinical and Experimental)*.

Professor Józef Zborowski zawsze stawiał sobie wysokie wymagania naukowe i moralne. Jego bezkom-



Od lewej stoją: Pentti Somerharju (Zakład Chemii Medycznej, Uniwersytet w Helsinkach), Józef Zborowski, Günther Daum (Instytut Biochemii, Uniwersytet Techniczny w Graz, Austria)

promisowość nieraz przysparzała mu kłopotów. Był ze wszech miar człowiekiem życzliwym i lojalnym. W sytuacjach kryzysowych zawsze można było liczyć na jego pomoc i zrozumienie. Był niezwykle interesującym rozmówcą, a jego szeroka wiedza, niekonwencjonalny sposób myślenia oraz humanistyczne zaintere-

sowania czyniły z niego postać barwną i pełną osobistego uroku. Profesor Józef Zborowski był naszym dobrym kolegą i przyjacielem i takim pozostanie w naszej pamięci.

*Przyjaciele i współpracownicy*

## Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

zaprasza do udziału w Konkursie  
na najlepszy wykład akademicki  
w roku 1994

### Regulamin nagrody

1. Intencją nagrody jest popularyzacja biochemii i biologii molekularnej oraz pozyskanie materiałów dydaktycznych.
2. Warunkiem wzięcia udziału w Konkursie jest przygotowanie wykładu na wybrany temat uwzględniający najnowsze osiągnięcia w tej dziedzinie oraz ilustrujących go materiałów w postaci maszynopisu, rysunków i kompletu przezroczy. Termin nadsyłania materiałów mija 31.03.1994 r.
3. Przewidziana jest Nagroda Główna w wysokości **3 milionów złotych** oraz dwa wyróżnienia. Środki finansowe na Nagrodę zapewnia Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.
4. Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zorganizuje sesję, na której zostaną wygłoszone konkursowe wykłady. Maksymalny czas wystąpienia 2 × 45 minut. W 1994 roku sesja odbędzie się na początku czerwca. Nagroda Główna i wyróżnienia zostaną przyznane w dniu Konkursu.
5. Członkowie Zarządu Głównego tworzą Komisję Konkursową. Oceniają oni prezentację, wartość merytoryczną i dydaktyczną wykładów przyznając od 0 do 10 punktów. Komisja obraduje niejawnie, a protokół z obrad i inne materiały pozostają w dokumentacji Towarzystwa. Nagrodę uzyska osoba, która otrzyma największą liczbę punktów. Nazwisko zwycięzcy Konkursu zostanie podane do wiadomości Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w „Postępach Biochemii” oraz w „Listach”.
6. Materiały konkursowe: maszynopis wykładu, rysunki, przezrocza i programy komputerowe stają się własnością Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i będą rozpowszechniane w placówkach naukowych i dydaktycznych jako wykłady autorskie nagrodzonych osób, rekomendowane przez Oddziały Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Wymagana jest pisemna zgoda na przekazanie materiałów na własność Towarzystwa. Towarzystwo zastrzega sobie prawo do zakupu materiałów nienagrodzonych.
7. Niniejsza wersja regulaminu została uchwalona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w dniu 5 listopada 1990 roku i wchodzi w życie z dniem uchwalenia.

## Nagrody Nobla z fizjologii lub medycyny oraz z chemii w 1993 r

### Noble prizes 1993 in physiology or medicine and chemistry

EWA BARTNIK\*

W tym roku zarówno nagroda Nobla z medycyny, jak i nagroda Nobla z chemii zostały przyznane faktycznie za osiągnięcia w dziedzinie biologii molekularnej. Nagrodę Nobla z medycyny otrzymali Philip A. Sharp i Richard J. Roberts za wykrycie intronów, a nagrodę Nobla z dziedziny chemii Michael J. Smith za ukierunkowaną mutagenезę i Kary Mullis za reakcję łańcuchową polimerazy. Obie metody wpłynęły na niesłychane przyspieszenie tempa badań w biologii molekularnej w ciągu ostatnich 10-15 lat.

W tym roku mija 40 lat od opublikowania przez Watsona i Cricka pracy o strukturze DNA, za którą otrzymali Nagrodę Nobla w 1962 r. Od kilkadziesiąt lat cały szereg nagród Nobla został przyznany uczonym, którzy umożliwili zrozumienie poszczególnych etapów funkcjonowania żywych organizmów — kodowania informacji genetycznej, replikacji DNA, struktury genów itp. Nagroda dla Sharpa i Roberta świetnie pasuje do tego ciągu.

W 1977 r. znane były już podstawowe fakty dotyczące struktury genów, transkrypcji i translacji u bakterii. Wiadomo było nawet, że u *Eukariota* istnieje odwrotna transkryptaza. Opracowywane przez cały szereg uczonych w latach 70-tych techniki klonowania i sekwencjonowania genów zaczynały przynosić pierwsze dane o strukturze genów organizmów eukariotycznych, które były dotąd jakby „czarną dziurą”, choć podejrzewano, że nie różnią się od genów bakterii. W 1977 r. w czerwcu odbyło się XLII Cold Spring Harbor Symposium for Quantitative Biology — niesłychanie prestiżowe coroczne spotkanie uczonych, tym razem poświęcone chromatynie. Na tym zebraniu szereg pracowni — Sharp i Roberts, ale także Jamesa Darnella, doniosły o całkowicie niespodziewanych wynikach otrzymanych przy badaniu genów

jednego z ulubionych modelowych obiektów — adenowirusa. Ten wirus, wyizolowany pierwotnie z dróg oddechowych człowieka, daje się łatwo namnażać w laboratorium w hodowlach tkankowych, i ma niewielki genom (40000 bp) złożony z dwuniciowego, liniowego DNA. Przy badaniu powstających po infekcji komórek transkryptów adenowirusa okazało się, że pewne odcinki jego genomu, które nie leżą koło siebie w DNA przylegają do siebie w dojrzałym RNA. A priori można było to tłumaczyć na kilka różnych sposobów, ale ostatecznie doświadczenia wykazały, że najpierw na DNA adenowirusa powstaje tzw. pierwotny transkrypt, z którego wycinane są pewne sekwencje, a po ich wycięciu pozostające fragmenty RNA łączą się ze sobą. Gilbert zaproponował nazwanie tych wycinanych sekwencji intronami, zaś pozostałych sekwencji eksonami (od ekspresji).

Odkrycie istnienia intronów było przełomowym momentem w biologii molekularnej, stanowiło złamanie pewnego dogmatu o kolinearności DNA-RNA-białko i stanowiło punkt wyjściowy wielu doświadczeń, mających na celu zrozumienie struktury i działania genomów organizmów eukariotycznych.

Pierwszym komentarzem wyników Sharpa i Roberta był artykuł redakcyjny w *Nature* pt. „Adenovirus amazes at Cold Spring Harbor”. Wyniki zostały potem opublikowane zarówno w czasopismach naukowych, jak i w książce wydawanej przez organizatorów sympozjów w Cold Spring Harbor. Rychło znaleziono też introny w genach kodujących białka u ssaków, w genach rRNA i tRNA u całego szeregu organizmów, a także w DNA różnych organelli — mitochondriów i chloroplastów. Przez wiele lat zajmowano się mechanizmem wycinania intronów, jest ich kilka w zależności od typu intronu (Tabela 1). W szeregu pracowni wyjaśniono mechanizm wycinania w genach jądrowych kodujących białka, wielkie zasługi w tej dziedzinie ma m.in. pracownia Sharp. Stwierdzono, że za wycinanie tych intronów odpowiedzialny jest

\* Zakład Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego, Aleje Ujazdowskie 4, 00-478 Warszawa

**Tabela 1.**

Rodzaje intronów i mechanizmy ich wycinania

Typ intronu	Lokalizacja	Typ katalizy	Cechy szczególne
mRNA (jądrowy)	jądro	RNA (?)	udział snRNP, lariat jako produkt pośredni
grupa I	jądro (rRNA) mitochondria chloroplasty eubakterie fagi	RNA (auto-kataliza)	wewnętrzne ORF'Y, Udział maturaz, specyficzna integracja
grupa II	mitochondria chloroplasty		
tRNA	jądro	białkowa	wielofunkcyjna ligaza
arche-bakteryjny	arche-bakterie	białkowa (?)	wewnętrzne ORF'Y

duży kompleks, wielkości rybosomu, zawierający 5 rodzajów cząsteczek sn (małe jądrowe) RNA i wiele białek.

Stwierdzono też, analizując kolejne geny u ssaków, że intronów jest bardzo dużo w genach (Tabela 2), i że w niektórych genach — np. w genie kodującym dystrofinę — 99% genu to sekwencje intronów, a eksony stanowią tylko niewielką część całości.

Zrozumienie, że istnieją introny ma implikacje dla medycyny — zarówno poznawcze jak i praktyczne. Przynajmniej w przypadku jednej choroby — związanej z wytwarzaniem niewłaściwego rodzaju  $\beta$ -globiny tzw.  $\beta$ -talasemii — wykazano, że niektóre warianty choroby wynikają z błędnego wycinania intronów. Niedawno udało się dwóm polskim uczonym pracującym w Stanach — *Dominskiemu i Kole* (*Proc Natl Acad Sci USA* (1993) **90**: 8673-8687) — skorygować ten defekt *in vitro*, co otwiera perspektywy dla terapii tej choroby w przyszłości być może nie tylko metodami wprowadzania właściwego genu, ale także przez naprawianie składania niewłaściwego produktu genu.

Nagroda Nobla w dziedzinie chemii została przyznana za metody, mające kolosalny wpływ na rozwój biologii molekularnej. Takie nagrody otrzymali już np. *Sanger i Gilbert* za ustalenie metod sekwencjonowania DNA i *Berg* za proces klonowania.

**Tabela 2.**

Liczba intronów w niektórych genach u człowieka

Gen	Wielkość genu (kb)	Wielkość mRNA (kb)	Liczba intronów
$\alpha$ -globina	0,8	0,5	2
insulina	1,4	0,4	2
albumina	25,0	4,2	14
receptor LDL	45,0	5,5	17
czynnik VIII	186,0	9,0	26
dystrofina	2300,0	16,0	75

*Michael Smith* umożliwił genetykom realizację ich marzeń — uzyskiwanie konkretnych mutacji w konkretnych genach, i badanie następnie ich efektów. Genetyka klasyczna polegała na uzyskiwaniu mutantów — np. muszki owocowej czy *Escherichia coli* o zmienionym fenotypie, następnie mapowaniu genu w którym zaszła mutacja, a także wnioskowaniu o jego funkcji w oparciu o jak najdokładniej przeprowadzoną analizę fenotypu. Po opracowaniu metod klonowania genów zaczęto przeprowadzać ich mutowanie *in vitro*, ale stosowane metody nie umożliwiały wprowadzania mutacji w konkretnych miejscach genu. *Smith* przez zastosowanie starterów do replikacji DNA *in vitro*, które mają pojedyncze, niekomplementarne do matrycy nukleotydy, umożliwił wprowadzanie pożądanych mutacji w konkretnych miejscach genu, co pozwala na badanie ich efektów na działanie genu.

*Kary Mullis* wymyślił PCR — łańcuchową reakcję polimerazy, pozwalającą na uzyskanie milionów kopii pojedynczej sekwencji DNA. Ta „molekularna kserokopiarka” to prawdziwa rewolucja — w tej chwili ma zastosowania i w praktyce, i w nauce tak rozległe, że samo ich wyliczenie zajęłoby parę stron. W praktyce stosuje się tę metodę do wykrywania patogenów (m.in. HIV), do diagnostyki medycznej umożliwiającej stwierdzenie nie tylko czy w genie jest mutacja, ale czy zaszła ona w konkretnym miejscu w konkretnym genie. W laboratoriach badawczych stosowana jest m.in. do klonowania genów, a także do analizy ewolucji DNA dawno już wymarłych organizmów (choć jednak nie do wskrzeszania dinozaurów!) ponieważ niewielkie ilości nawet mocno zdegradowanego DNA znajdujące w tkankach kopalnych organizmów wystarczają do amplifikacji poszczególnych sekwencji techniką PCR.

Artykuł otrzymano 7 stycznia 1994 r.

Zaakceptowano do druku 7 stycznia 1994 r.

## Piśmiennictwo

1. *Sambrook J* (1977) Adenovirus amazes at Cold Spring Harbor *Nature* **268**: 101-104
2. *Green MR* (1991) Biochemical mechanism of constitutive and regulated pre mRNA splicing. *Ann Rev Cell Biol* **7**: 559-559
3. *Smith M* (1985) In vitro mutagenesis *Ann Rev Gen* **19**: 423
4. *Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M*, (1992) *W: Recombinant DNA: The polymerase chain reaction*, str. 79-88, wyd. Scientific American Books, N. Y.

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

# Gen *p53* człowieka

## Human gene *p53*

HENRYK BERBEĆ\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Struktura genu *p53*
- III. Mutacje w genie *p53*
- IV. Struktura białka *p53*
- V. Właściwości i rola biologiczna białka *p53*
  - V-1. Właściwości białka *p53*
  - V-2. Charakterystyka zmutowanych form białka *p53*
  - V-3. Udział białka *p53* w cyklu komórkowym
  - V-4. Białko *p53* a transformacja
  - V-5. Gen *p53* a kancerogeneza
  - V-6. Molekularny mechanizm działania białka *p53*
- VI. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** HCD - region o wysokiej konserwatywności, HSR - region o wysokiej podatności na mutacje.

### I. Wstęp

Wśród genów, których mutacja przyczynia się do rozwoju nowotworu można wyróżnić: (1) protoonkogeny, (2) geny supresorowe zwane także genami hamującymi transformację nowotworową lub antyonkogenami (ang. *tumor suppressor genes*) oraz (3) geny zwiększające częstość mutacji w genomie. Szczególną uwagę badaczy przyciąga ostatnio ludzki gen supresorowy określany jako gen *p53*. Mutacja w tym genie jest najczęstszym defektem genetycznym stwierdzanym w nowotworach wszystkich typów [1-5]. Transformacja nowotworowa wywołana przez defekt genu *p53* pojawia się w przypadku zadziałania dwustopniowego mechanizmu: (i) inaktywacji białka *p53* na skutek mutacji punktowej w jednym allelu i (ii) utraty drugiego allelu [6].

Produkt genu *p53* znany jest pod nazwami: „białko *p53*” oraz „białko TP53”. Dostępne są opracowania przeglądowe na temat postępu badań nad genem *p53* [2-5,7].

### II. Struktura genu *p53*

W komórkach myszy znaleziono gen *p53* w chromosomie 11. W genie tym wyróżniono 11 eksonów;

\* Doc. dr hab. Henryk Berbeć, Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej, 20-123 Lublin, ul. Lubartowska 85

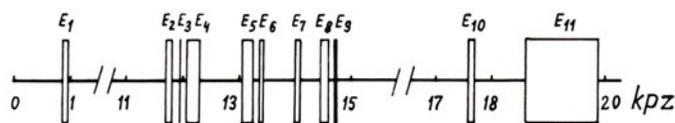
### Contents:

- I. Introduction
- II. Structure of *p53* gene
- III. Mutations in *p53* gene
- IV. Structure of *p53* protein
- V. Properties and biological role of *p53* protein
  - V-1. Properties of *p53* protein
  - V-2. Characterization of mutated forms of *p53* protein
  - V-3. Involvement of *p53* protein in the cell cycle
  - V-4. *p53* protein and transformation
  - V-5. *p53* gene and carcinogenesis
  - V-6. Molecular mechanism of *p53* protein action
- VI. Concluding remarks

zawiera on około 12,5 kbp [8]. W chromosomie 14 zidentyfikowano ponadto bezintronowy pseudogen *p53*, niezdolny do produkcji pełnej długości białka [8].

W haploidalnym genomie komórek organizmu człowieka występuje pojedynczy gen *p53*. Zlokalizowano go w chromosomie 17p, w strefach 12-13,3 [9]. Organizacja genu *p53* człowieka i myszy jest podobna. Gen *p53* człowieka (Ryc. 1) zawiera w swoim składzie również 11 eksonów, lecz jest większy od funkcjonalnego genu myszy, zawiera bowiem 20,3 kbp [10].

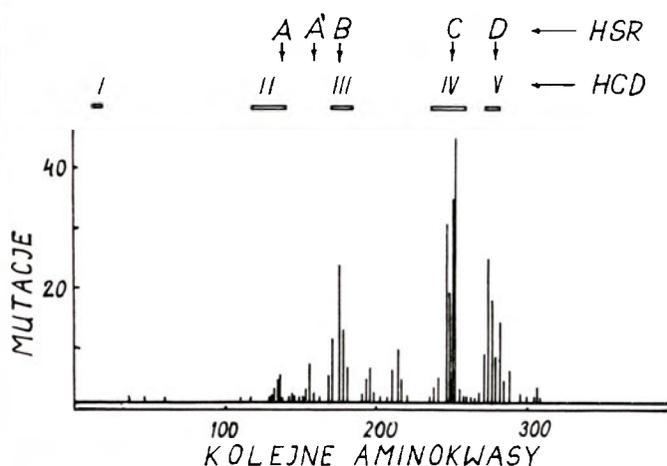
Badania filogenetyczne wykazały, że kodujące sekwencje genu *p53* różnych zwierząt charakteryzują się znaczną homologią. Wyróżnia się pięć regionów o wysokiej konserwatywności (ang. *highly conservative domain*, HCD) obejmujących następujące pozycje aminokwasów: 13-19 (HCD I), 117-132 (HCD II), 171-181 (HCD III), 234-258 (HCD IV) i 270-286 (HCD V) [5,11].



Ryc. 1. Struktura genu *p53* (wg [10] oraz Gene Bank).

### III. Mutacje w genie *p53*

W ponad połowie przypadków nowotworów u ludzi stwierdzono mutacje w genie *p53* [1, 3, 5]. Rozrzut mutacji badany wzdłuż całego genu nie jest równomierny (Ryc. 2). Mutacje występują głównie w obrębie eksonów 5-8, gdzie znajdują się cztery domeny o wysokiej konserwatywności (HCD II-V). Wyróżnia się 3,



Ryc. 2. Częstość mutacji w genie *p53* człowieka. Przedstawiono ilość mutacji zmieniających kolejne aminokwasy budujące białko *p53* w 350 przypadkach nowotworów (opracowano na podstawie [5]). W górnej części ryciny zaznaczono lokalizację regionów o wysokiej konserwatywności (HCD) oraz „gorących miejsc” (HSR).

4 lub nawet 5 tzw. „gorących miejsc” (ang. *hot spot region*, HSR), czyli regionów DNA szczególnie podatnych na mutacje [5]. Najczęściej dochodzi do mutacji w obrębie następujących kodonów: 132-143 (HSR A), 172-179 (HSR B), 237-249 (HSR C), 272-286 (HSR D) i 151-159 (HSR A') [5]. W wyszczególnionych pięciu regionach (gorących miejscach) wykrywa się ponad 70% wszystkich mutacji w genie *p53* [5]. Dla porównania, w genie *ras* z rodziny protoonkogenów, stwierdzono mutacje transformujące jedynie w dwóch kodonach [12].

Najliczniejsze mutacje w genie *p53* człowieka znajdowano w trzech kodonach CG(N) kodujących argininę: 175, 248 i 273 [5]. Może to mieć związek ze znaczną podatnością na spontaniczne mutacje dinukleotydu CpG. W wymienionych trzech kodonach dochodzi najczęściej do tranzycji C w T lub G w A.

Pośród ponad 350 przypadków różnych typów nowotworów, w których stwierdzono mutacje w genie *p53* [5], najczęstsze były mutacje zmiany sensu. Insercje stanowiły 2%, mutacje nonsensowne 6%. Połowa ostatnich mutacji polegała na zmianie kodonu CGA w TGA i dotyczyła regionu pomiędzy pozycjami 196 a 213 w białkowym produkcie genu.

#### IV. Struktura białka *p53*

Strukturę pierwszorzędową białka *p53* poznano sekwencjonując cDNA [13, 14]. Masa cząsteczkowa białka *p53* człowieka wynosi 53000 [15] (stąd wyprowadzono nazwę genu i jego produktu). Białko to składa się z 393 aminokwasów. Koniec karboksylowy białka zawiera region bogaty w aminokwasy zasadowe, koniec aminowy jest bogaty w aminokwasy kwaśne. Natywne białko *p53* jest fosfoproteiną. Resztę fosforanową znaleziono przy serynie w pozycji 315 [16].

Porównanie sekwencji ludzkiego i mysiego cDNA białka *p53* wskazuje na 78% homologię [13]. Najwię-

szą homologię (92%) stwierdza się w obrębie kodonów 156-288. Przypuszcza się, że ten właśnie region jest szczególnie ważny dla funkcji białka *p53* [13]. Wykryto polimorficzne formy białka *p53* człowieka, które wynikały z różnic w strukturze kodonów 72 [17] i 21 [18].

### V. Właściwości i rola biologiczna białka *p53*

#### V-1. Właściwości białka *p53*

Okres połowicznego rozpadu białka *p53* wynosi ok. 20 min [19]. Jego krótka trwałość biologiczna utrudnia prowadzenie badań. Prawidłowe białko *p53* wykrywane jest w jądrze komórkowym [20], podczas gdy forma zmutowana — jedynie w cytoplazmie [21].

Funkcjonalną postacią białka *p53* jest cząsteczka oligomeryczna, najprawdopodobniej tetrameryczna [22]. Sekwencja aminokwasów w pobliżu C-końca cząsteczki białka *p53* determinuje możliwość oligomeryzacji i transportu do jądra komórkowego [11, 23].

Zasadniczym efektem działania prawidłowego białka *p53* jest hamowanie wzrostu [24-27] i różnicowania [28, 29] hodowanych *in vitro* komórek myszy i człowieka. Prawidłowe białko *p53* ma zdolność indukowania apoptozy\*, podczas gdy białko zmutowane hamuje ten proces [30].

Białko *p53* wykazuje zdolność wiązania się z białkowymi produktami onkogennych wirusów: wirusa SV40, adenowirusa E1b [31], wirusa *papilloma* E6 [32], a także z czynnikiem o najwyższej wśród wymienionych białek aktywności transformacyjnej — z produktem genu *mdm2* [33, 34]. Białko *p53* związane z produktem wirusa *papilloma* E6 jest rozpoznawane przez ubikwitynę i ulega proteolizie [32]. Wykazano, że wymienione wyżej białka przyłączają się do cząsteczki białka *p53* w różnych miejscach [33, 35]. Zdolność wiązania się z białkiem *p53* wykazują również kinazy białkowe *cdc2* [16] oraz kinaza kazeinowa II [36], a także białka z rodziny białek szoku termicznego, np. *Hsc70* [37].

Prawidłowe białko *p53* wykazuje ponadto zdolność wiązania się z dwuniciowym DNA. Charakter wiązania może być zarówno niespecyficzny jak i specyficzny (wiązanie z określonymi sekwencjami DNA) [6, 38-41]. Jedno takie miejsce wiązania zidentyfikowano w N-końcowym odcinku białka, w obrębie aminokwasów 1-42 [40], gdzie zgrupowane są aminokwasy kwaśne. W wyniku przebadania wielu genomowych DNA stwierdzono, że prawidłowe białko *p53* ma zdolność wiązania się z 20-nukleotydowym palindromem występującym w niektórych DNA [38-41]. Zdolność wiązania się z DNA mają formy tetrameryczne białka *p53* [39]. Interesujące jest, że zdolność białka *p53* do wiązania się z DNA zanika, gdy białko to jest

\* Problem apoptozy (zaprogramowanego obumierania komórek) został omówiony w artykule E w y S i k o r y *Post. Biochem.* (1993) 39: 212-220

związane z dużym antygenem T wirusa SV40 [39], z produktem genu *mdm2* [39], lub tworzy heterooligomer (zawierający w swoim składzie zmutowane cząsteczki białka p53) [6, 39, 42].

Wykazano, że białko p53 wiążąc się z DNA może aktywować transkrypcję genów przyległych do miejsca wiązania [6, 39-43]. W niektórych doświadczeniach uzyskiwano efekt odwrotny: hamowanie transkrypcji przez prawidłowe białko p53 [6, 44]. Mutacje w obrębie czterech HCD (II-V) pozbawiają cząsteczkę tego białka zdolności wpływania na transkrypcję [6, 42]. Heterooligomery — kompleksy zmutowanego białka p53 z prawidłowym — nie są zdolne do wiązania się z DNA i nie wywierają wpływu na transkrypcję [6, 23, 42]. Jak już wspomniano wcześniej, biologicznie czynną formą białka p53 jest cząsteczka tetrameryczna [22].

## V-2. Charakterystyka zmutowanych form białka p53

Cząsteczki zmutowanych form białka p53 wykazują dłuższy okres połowicznego rozpadu niż białko prawidłowe. Być może, dlatego w komórkach stransformowanych obserwuje się większą zawartość białka p53 [34]. Biologiczne właściwości określonych form białka p53 zależą od rodzaju mutacji [6, 23]. Na przykład mutacje w obrębie kodonów 135-175 powodują zmianę konformacji białka [34, 44], czego nie zauważa się w przypadku mutacji w kodonie 273.

Cząsteczki białka p53 zmienione na skutek mutacji przeważnie nie mają zdolności hamowania wzrostu komórek [25]. Cząsteczki białka p53, które na skutek mutacji typu nonsens uległy skróceniu od C-końca, tracą zdolność do oligomeryzacji oraz do wnikania do jądra komórkowego [11, 23].

W cytosolu fibroblastów szczura transformowanych jednocześnie przy użyciu zmutowanych cząsteczek białka p53 i onkogenu *ras* zaobserwowano pojawianie się kompleksów utworzonych ze zmutowanych i prawidłowych cząsteczek białka p53 [21]. Kompleksy takie nie hamowały transformacji nowotworowej [6, 23, 42, 33]. Przyjmuje się, że zmiany konformacji zmutowanej cząsteczki białka p53 przenoszą się na konformację cząsteczki prawidłowego białka p53 z chwilą utworzenia wspólnego kompleksu [2, 23], co powoduje, że utworzone heterooligomery nie wykazują biologicznej aktywności prawidłowego białka.

## V-3. Udział białka p53 w cyklu komórkowym\*

Wyniki badań świadczą o udziale produktu genu p53 w regulacji cyklu komórkowego [16, 20, 21, 33, 45-49] i w różnicowaniu komórek [28, 29]. Zauważono, że w hodowli prawidłowych komórek myszy

\* Regulacja cyklu komórkowego została wyczerpująco omówiona w artykułach Barbary Grzelakowskiej-Sztabert w *Post. Biochem.* (1992) **38**: 98-107; (1993), **39**: 16-25.

poziom białka p53 (i odpowiadającego mu mRNA) zmienia się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, osiągając w fazie G1 najwyższe wartości [45, 48]. W innych doświadczeniach zauważono, że wniknięcie białka p53 do jądra komórkowego powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w późnej fazie G1 [21, 47, 49].

Rola białka p53 w cyklu komórkowym staje się szczególnie widoczna w warunkach stresu komórkowego [47]. Na przykład w uszkodzeniu DNA promieniowaniem jonizującym produkcja białka p53 w komórkach ulega szybkiemu zwiększeniu, a w konsekwencji następuje zahamowanie podziału komórek poprzez blokowanie replikacji DNA [47]. W niektórych komórkach, w których doszło do uszkodzenia DNA, obserwuje się charakterystyczne zmiany (fragmentację jądra). Przyjmuje się, że dochodzi do indukcji apoptozy (zaprogramowanego obumierania komórek) przy udziale białka p53 [30].

Białko p53 jest fosforylowane przez kinazę *cdc2* [16]. Maksymalny poziom fosforylacji osiągany jest podczas fazy M [16].

## V-4. Białko p53 a transformacja

Gen p53 był początkowo uważany za onkogen, ponieważ doświadczenia wskazywały, że jego produkt wywołuje transformację nowotworową. Dopiero w ostatnich latach okazało się, że jedynie zmutowane formy białka p53 wykazują aktywność transformacyjną [2, 6, 33, 42].

Badając komórki linii hodowanych *in vitro* wykazano, że transformację wywołaną za pomocą genów *onc* hamuje prawidłowa forma białka p53 [24]. Wykazano doświadczalnie, że wprowadzenie genu *p53* typu dzikiego lub cDNA do stransformowanych komórek zatrzymuje ich wzrost w fazie G1 cyklu [21, 25, 26, 49].

Zmutowane białko p53 wzmaga aktywność transformacyjną genu *ras* [50], podczas gdy prawidłowe białko wydatnie hamuje kotransformację prowadzoną jednocześnie przez formę zmutowaną białka p53 oraz przez gen *ras* [24, 50]. Interesujące jest, że aktywność transformacyjna zmutowanych cząsteczek białka p53 zależy od rodzaju zmian do jakich w nim doszło na skutek mutacji. Wykazano na przykład, że białko p53 zmutowane w kodonie 175 wykazuje 3 do 10 razy większą aktywność transformacyjną niż wtedy, gdy mutacja dotyczy kodonu 273 [34].

## V-5. Gen p53 a kancerogeneza

Doświadczenia ostatnich lat wykazały jednoznacznie, że produkt prawidłowego genu *p53* hamuje nowotworzenie [24- 27, 35, 46, 49]. Jedynie produkt genu zmutowanego wywołuje transformację nowotworową. Dlatego obecnie istnieje pełna zgodność wśród badaczy (na przykład [2-5, 39, 51]), że gen *p53* należy zaliczyć do klasy genów — supresorów transformacji

nowotworowej.

Jak już podano, w ponad połowie nowotworów u ludzi stwierdza się mutacje w genie *p53*. Analiza mutacji wskazuje na pewną współzależność pomiędzy rodzajem mutacji, a narządem, w którym rozwija się nowotwór [5]. Świadczy to, być może, że zachodzi jakiś związek przyczynowy pomiędzy rodzajem zmian mutacyjnych w genie *p53* a charakterem komórek lub tkanek, w których dochodzi do nowotworzenia. Zauważono na przykład, że dość często mutacja w obrębie kodonu 175, spotykana w DNA licznych nowotworów, nigdy nie występuje w DNA raka płuc [5]. W przypadkach raka wątroby u osób żyjących na obszarach geograficznych, w których za czynnik ryzyka uważa się aflatoksynę B1 oraz wirusa B zapalenia wątroby, większość mutacji znajdowano w kodonie 249 [3].

Przeprowadzając analizę materiału obejmującego ponad 350 przypadków, w których różnym typom nowotworów towarzyszyły mutacje w genie *p53* zauważono [5], że w DNA komórek nowotworów jelit, mózgu i układu limfatycznego przeważały tranzycje, podczas gdy w DNA komórek raka płuc i wątroby częstsze były transwersje, szczególnie GC w TA. Wskaźnik transwersji wyraźnie zależał od typu nowotworu. W DNA komórek raka jelita grubego transwersji nie stwierdzono, w DNA komórek raka wątroby transwersje obejmowały 20% badanych przypadków, zaś w DNA komórek raka płuc aż 40%.

Spośród 27 nukleotydów DNA regionu HSR A' genu *p53*, 25 stanowią G lub C. W raku płuc połowa mutacji przypadała na ten region, podczas gdy w przypadku raka jelita grubego nie obserwowano w tym regionie DNA mutacji [5]. Fakt ten ma przypuszczalnie związek z rodzajem kancerogenów, na jakie dany narząd jest narażony. Płuca są narządem szczególnie narażonym na bezpośredni kontakt z kancerogenami pochodzenia zewnętrznego zawartymi w dymie papierosowym, w pyłach itp. Prawdopodobny jest związek licznych mutacji znajdujących w komórkach raka płuc w regionie HSR A' genu *p53* z podatnością guaniny DNA na atak zewnętrznych czynników chemicznych [52].

Chyba najbardziej szczegółowo badano mutacje genu *p53* w DNA komórek jelita grubego. W około 80% przypadków stwierdzano anomalie w obrębie obydwu alleli: delecje i mutacje punktowe [9, 25]. W ok. 75% przypadków znajdowano w chromosomie 17p obszar delecji [9]. Fakty te mogą wskazywać, że rak jelita grubego rozwija się przede wszystkim wtedy, gdy brak jest prawidłowego produktu genu *p53*.

W rzadkim zespole Li-Fraumeni charakteryzującym się częstym występowaniem różnych nowotworów w młodym wieku stwierdzono dziedziczenie mutacji w genie *p53* w jednym allelu [2]. Przy tym na 17 mutacji, aż 13 znaleziono w eksonie 7 w rejonie HSR C [5].

Badając komórki linii HL 60 ostrej białaczki pro-

mielocytarnej, wykazano, że z powodu dużej delecji w genie *p53*, komórki były całkowicie pozbawione produktu tego genu (nie znajdowano też odpowiadającego mu mRNA) [14]. W komórkach tych zauważono zwiększony poziom produktu genu *myc*. Można spekulować, że jeden z mechanizmów przeciwnowotworowego działania białka *p53* polega na hamowaniu ekspresji onkogenu *myc* [4, 24].

Wykazano, że komórki produkujące zmutowane formy białka *p53* częściej ulegają transformacji nowotworowej niż komórki pozbawione tego białka [53, 54].

## V-6. Molekularny mechanizm działania białka *p53*

Wysunięto dwie hipotezy tłumaczące molekularny mechanizm działania produktu genu *p53*. Na podstawie doświadczeń, w których badano *in vitro* wpływ białka *p53* na syntezę DNA [21, 25, 26, 46, 47, 55] sformułowano hipotezę, która przyjmuje, że funkcja biologiczna białka *p53* polega na hamowaniu replikacji DNA na etapie inicjacji [55]. Przypuszcza się, że prawidłowe białko *p53* wiąże się z jeszcze nie zidentyfikowanym białkiem replikacyjnym, co powoduje zablokowanie syntezy DNA i uniemożliwia wejście komórki w fazę S. Prawdopodobnie istnieje komórkowy odpowiednik antygeny T, który bierze udział w inicjacji replikacji DNA [35, 55]. Związanie się białka *p53* z tym komórkowym odpowiednikiem wirusowego antygeny uniemożliwia replikację.

Według drugiej hipotezy, zasadniczą funkcją białka *p53* w komórce jest regulacja transkrypcji. Białko *p53* może działać jak transaktywator transkrypcji, stymulując lub hamując syntezę mRNA. Białko *p53* w formie tetrameru przyłącza się specyficznie do określonych regionów DNA i oddziałuje na transkrypcję genów przyległych do miejsca wiązania [39]. Za aktywację (bądź hamowanie) transkrypcji odpowiedzialny jest kwaśny region zlokalizowany w obrębie N-końca białka *p53*. Zdolność wiązania się z DNA i wpływania na transkrypcję zanika, gdy dochodzi do mutacji w którejś z czterech ewolucyjnie konserwatywnych domen białka *p53* (zmutowane białko *p53* nie tworzy aktywnych tetramerów [23]). Zdolność oddziaływania na transkrypcję zanika również wtedy, gdy białko *p53* zostaje związane z białkowym produktem wirusa SV40, adenowirusa E1b, wirusa *papilloma* E6 lub z produktem genu *mdm2* [39].

Białko *p53* może pobudzać transkrypcję genów przyczyniających się do hamowania wzrostu komórki lub powodować represję genów działających przeciwnie [39], stąd ostatecznym efektem działania białka *p53* jest hamowanie wzrostu komórki.

Lane [51] przedstawił interesującą koncepcję roli biologicznej produktu genu *p53*. Według tego autora, w prawidłowo funkcjonującej komórce białko *p53* działa jako „molekularny strażnik” pilnujący integralności genomu. Gdy DNA ulega uszkodzeniu, białko

p53 nagromadza się i wyłącza replikację, ażeby zapewnić czas na naprawę uszkodzeń. Gdy reperacja nie dochodzi do skutku, białko p53 przyczynia się do uruchomienia (aktywacji) procesu apoptozy, co pozwala na wyeliminowanie nieprawidłowej komórki ze środowiska. W komórkach, w których białko p53 zostało zainaktywowane przez mutację lub zostało związane z białkami blokującymi jego funkcję, uszkodzony DNA ulega replikacji. Nie dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1. Komórki ulegają przyspieszonemu wzrostowi i podziałom. W nadmiernie szybko dzielących się komórkach dochodzi do częstych mutacji i rearanżacji chromosomowych, co doprowadza do szybkiej selekcji uzłośliwionych klonów.

## VI. Uwagi końcowe

Produkt genu *p53* można uważać za ważny czynnik regulujący wzrost, proliferację i różnicowanie komórek. Jego prawidłowa funkcja zabezpiecza komórkę przed transformacją nowotworową. Badania nad białkiem p53 dostarczyły wielu informacji, które jednak nie wystarczają do sporządzenia pełnego obrazu jego udziału w procesach życiowych komórki. Na identyfikację i bliższą charakterystykę oczekują hipotetyczne białka jądrowe, za pośrednictwem których dochodzi do hamowania replikacji przy udziale białka p53. Potrzebne są badania nad identyfikacją genów, które są przypuszczalnie regulowane przy udziale białka p53. W celu lepszego zrozumienia wpływu określonych mutacji w genie *p53* na transformację nowotworową, konieczne są badania nad oddziaływaniami pomiędzy białkami onkogenicznymi, a prawidłowym i zmutowanym białkiem p53. Poznanie zależności pomiędzy miejscem i rodzajem mutacji w genie *p53*, a zmianami w strukturze przestrzennej białka p53, jakie te mutacje wywołują, może pozwolić na przewidywanie wpływu określonych mutacji na funkcje tego białka.

Artykuł otrzymano 10 października 1993 r.  
Zaakceptowano do druku 9 grudnia 1993 r.

## Piśmiennictwo

- Vogelstein B (1990) *Nature (Lond)* **348**: 681-682
- Oren M (1992) *FASEB J* **6**: 3169-3176
- Hollstein MC, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) *Science* **253**: 49-53
- Levine AJ, Momand J, Finlay A (1991) *Nature (Lond)* **351**: 453-456
- Caron de Fromental C, Soussi T (1992) *Genes Chromosomes and Cancer* **4**: 1-15
- Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, Vogelstein B (1992) *Science* **256**: 827-830
- Horst A (1992) *Post Biol Kom* **19**: 3-21
- Bienz-Tadmor B, Zakut-Houri R, Givol D, Oren M (1984) *EMBO J* **3**: 2179-2183
- Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, van Tuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B (1989) *Science* **244**: 217-221
- Lamb P, Crawford L (1986) *Mol Cell Biol* **6**: 1379-1385
- Soussi T, Caron de Fromental C, May P (1990) *Oncogene* **5**: 945-952
- Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler K W, Levin B, Frost P, Vogelstein B (1992) *Science* **256**: 102-105
- Zakut-Houri R, Bienz-Tadmor B, Givol D, Oren M (1985) *EMBO J* **4**: 1251-1255
- Wolf D, Laver-Rudich Z, Rotter V (1985) *Mol Cell Biol* **5**: 1887-1893
- Crawford LV, Pim DC, Gurney EG, Goodfellow P, Taylor-Papadimitriou J (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 41-45
- Bischoff JR, Friedman PN, Marshak DR, Prives C, Beach D (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4766-4770
- Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV (1987) *Mol Cell Biol* **7**: 961-963
- Ahuja HG, Testa MP, Cline MJ (1990) *Oncogene* **5**: 1409-1410
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A (1992) *Nature (Lond)* **356**: 215-221
- Dippold WG, Jay G, DeLeo AB, Khoury G, Old LJ (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 1695-1699
- Martinez J, Georgoff I, Martinez J, Levine AJ (1991) *Genes Dev* **5**: 151-159
- Stenger JE, Mayr GA, Mann K, Tegtmeyer P (1992) *Mol Carcinog* **5**: 102-106
- Milner J, Medcalf EA (1991) *Cell* **65**: 765-774
- Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ (1989) *Cell* **57**: 1083-1089
- Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Wilson JK U, Vogelstein B (1990) *Science* **249**: 912-915
- Mercer WE, Amin M, Sauve GJ, Appella E, Ullrich SJ, Romano JW (1990) *Oncogene* **5**: 973-980
- Chen PL, Chen Y, Bookstein R, Lee WH (1990) *Science* **250**: 1576-1580
- Shaulsky G, Goldfinger N, Peled A, Rotter V (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8982-8986
- Shaulsky G, Goldfinger N, Rotter V (1991) *Cancer Res* **51**: 5232-5237
- Marx J (1993) *Science* **259**: 760-761
- Sarnov P, Ho YS, Williams J, Levine AJ (1982) *Cell* **28**: 387-394
- Wernes BA, Levine AJ, Howley PM (1990) *Science* **248**: 76-79
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992) *Cell* **69**: 1237-1245
- Hinds PW, Finlay CA, Quartin RS, Baker SJ, Fearon ER, Vogelstein B, Levine AJ (1990) *Cell Growth Different* **1**: 571-580
- Barak Y, Oren M (1992) *EMBO J* **11**: 2115-2121
- Meek DW, Simon S, Kikkawa U, Eckhart W (1990) *EMBO J* **9**: 3253-3260
- Hinds PW, Finlay CA, Frey AB, Levine AJ (1987) *Mol Cell Biol* **7**: 2863-2869
- Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B (1991) *Science* **252**: 1708-1711
- Vogelstein B, Kinzler KW (1992) *Cell* **70**: 523-526
- Unger T, Nau MM, Segal S, Minna JD (1992) *EMBO J* **11**: 1383-1390
- Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wright WE, Shay JW (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 2866-2871
- Farmer G, Bargonetti J, Zhu H, Friedman P, Prywes R, Prives C (1992) *Nature (Lond)* **358**: 83-86
- Ginsberg D, Mehta F, Yaniv M, Oren M (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9979-9983
- Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP (1990) *EMBO J* **9**: 1595-1602
- Reich NC, Oren M, Levine AJ (1983) *Mol Cell Biol* **3**: 2143-2150

46. Diller L, Kassel J, Nelson CE, Gryka MA, Litwak G, Gebhardt M, Bressac B, Ozturk M, Baker SJ, Vogelstein B, Friend SH (1990) *Molec Cell Biol* **10**: 5772-5781
47. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW (1991) *Cancer Res* **51**: 6304-6311
48. Maltzman W, Czyzyk L (1984) *Mol Cell Biol* **4**: 1689-1694
49. Michalovitz D, Halevy O, Oren M (1990) *Cell* **62**: 671-680
50. Zambetti GP, Olson D, Labow M, Levine AJ (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 3952-3956
51. Lane DP (1992) *Nature* (Lond) **358**: 15-16
52. Kriek E, Den Engelse L, Scherer E, Westa JG (1984) *Biochim Biophys Acta* **738**: 181-201
53. Harris CC, Hollstein M (1993) *N Engl J Med* **329**: 1318-1327
54. Eliyahu D, Michalovitz D, Oren M (1985) *Nature* (Lond) **316**: 158-160
55. Gannon JV, Lane DP (1987) *Nature* (Lond) **329**: 456-458

# Mechanizm inicjacji odwrotnej transkrypcji wirusa HIV-1

## Mechanism of HIV-1 reverse transcription initiation

MACIEJ SZYMAŃSKI<sup>1</sup>,  
JAN BARCISZEWSKI<sup>2</sup>,  
MIROŚŁAWA Z. BARCISZEWSKA<sup>3</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Odwrotna transkryptaza
- III. Starterowe tRNA
- IV. Rybonukleaza H
- V. Białko nukleokapsydu

### Contents:

- I. Introduction
- II. Reverse transcriptase
- III. Primer tRNAs
- IV. Ribonuclease H
- V. Nucleocapsid protein

**Wykaz stosowanych skrótów:** pbs — miejsce wiązania startera (ang. *primer binding site*); ppt — odcinek polipurynowy (ang. *polypurine tract*); AZT — azydotymidyna; ddI — dideoksyinozyna; CNBP — białko komórkowe wiążące kwasy nukleinowe (ang. *cellular nucleic acid binding protein*).

### I. Wstęp

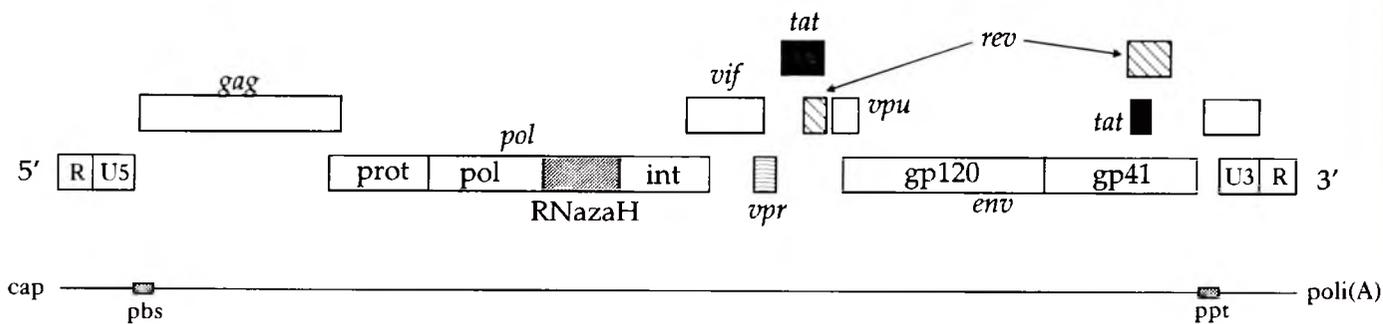
Ludzki wirus nabytego zespołu upośledzenia odporności (ang. *Human Immunodeficiency Virus 1—HIV-1*) zaliczany jest do grupy wirusów zwierzęcych zwanych retrowirusami. Materiałem genetycznym zawartym w kapsydach retrowirusów jest jednoniciowy RNA (Ryc. 1). W cyklu życiowym retrowirusów, w procesie odwrotnej transkrypcji dochodzi do przepisania informacji genetycznej, zawartej w genomie wirusa na DNA (Ryc. 2). Powstająca w ten sposób kopia DNA ulega integracji z genomowym DNA komórki (tzw. prowirus) stanowi matrycę dla transkrypcji genów

wirusowych kodujących białka strukturalne wirionów oraz białka odpowiedzialne za proliferację wirusa.

Odwrotna transkrypcja (Ryc. 2) katalizowana jest przez wielofunkcyjny enzym wirusowy — odwrotną transkryptazę, która posiada dwie aktywności: polimerazy DNA zależnej od RNA i DNA oraz rybonukleazy H. Polimeraza DNA katalizuje syntezę 3'-końcowego odcinka nici (-)DNA na matrycy RNA przez wydłużanie starterowego RNA, związanego z miejscem pbs (ang. *primer binding site*) znajdującym się 100-150 nukleotydów od końca 5' wirusowego RNA. Utworzony w ten sposób pierwszy produkt odwrotnej transkrypcji, tzw. *strong stop* cDNA, przenoszony jest na koniec 3' tej samej lub innej cząsteczki wirusowego RNA. Tam swoiście wiąże się z rejonem R i pełni funkcję startera dla dalszej syntezy nici (-)DNA. Równoległe z tworzeniem nici (-)DNA zachodzi degradacja matrycowego RNA przez rybonukleazę H, która pozostawia krótki odcinek wirusowego RNA, przy końcu 3', związany z nicią (-)DNA. Odcinek ten jest bogaty w puryny (ang. *polypurine track* — ppt) i służy jako starter inicjacji syntezy nici (+)DNA na matrycy DNA [1].

Proces odwrotnej transkrypcji jest kluczowym etapem proliferacji retrowirusów. Zrozumienie tego zja-

<sup>1</sup> Mgr, <sup>2</sup> prof. dr hab., <sup>3</sup> doc. dr hab., Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań



**Ryc. 1.** Schemat budowy genomu HIV-1. Geny czytane są w trzech ramkach zaznaczonych na różnych poziomach. *gag* — gen kodujący białka wewnętrznej otoczki wirusa; *pol* — gen kodujący odwrotną transkryptazę (pol, RNazaH), proteazę (prot) i integrazę (int); *vif* — wirusowy czynnik infekcyjny (ang. *viral infectivity factor*); *vpu*, *vpr* — białka wirusowe U i R; *env* — gen glikoprotein otoczki zewnętrznej gp120 i gp41; *tat*, *rev*, *nef* — geny białek regulatorowych.

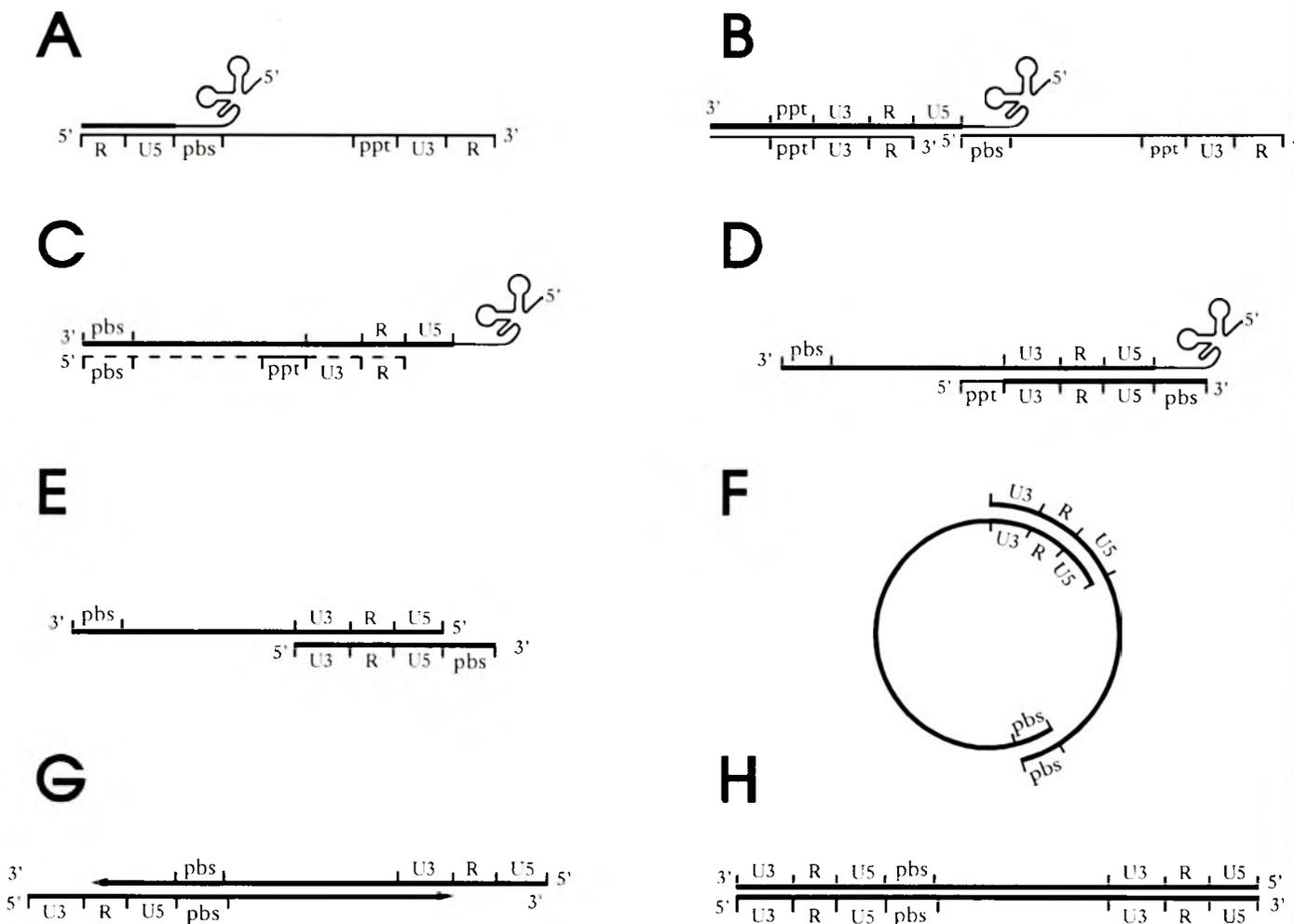
wiska może stanowić punkt wyjścia do badań nad potencjalnymi inhibitorami poszczególnych etapów i w konsekwencji, projektowania leków, które mogłyby być zastosowane w leczeniu chorób wywoływanych przez retrowirusy.

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat mechanizmu inicjacji

odwrotnej transkrypcji oraz roli, jaką w tym procesie odgrywa cząsteczka tRNA.

## II. Odwrotna transkryptaza

Jedynym enzymem wirusowym, który jest niezbędny do syntezy prowirusowego DNA jest odwrotna



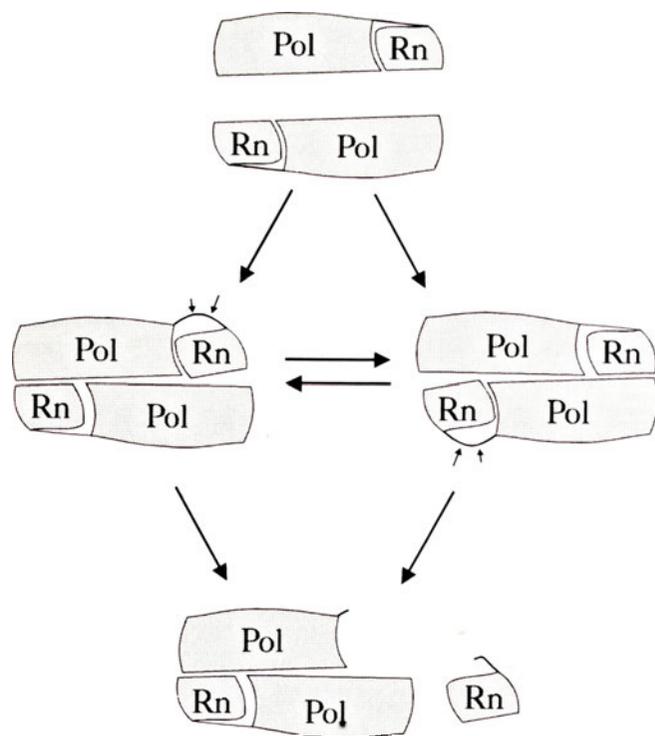
**Ryc. 2.** Schemat przebiegu odwrotnej transkrypcji: A — Starterowy tRNA wiąże się z genomowym RNA w miejscu *pbs* i inicjuje syntezę nici (-)DNA; B — Hydroliza RNA przez RNazę H pozwala na hybrydyzację regionu R (-)DNA z inną cząsteczką wirusowego RNA, co pozwala na kontynuację syntezy nici (-)DNA; C — Po ukończeniu syntezy nici (-)DNA RNaza H degraduje matrycowy RNA pozostawiając odcinek polipurynowy (ppt), D — odcinek polipurynowy stanowi starter syntezy nici (+)DNA; E — Po zakończeniu syntezy pierwszego odcinka (+)DNA RNaza H odcina starterowy RNA (tRNA) od nici (-)DNA i ppt od nici (+)DNA; F — Hybrydyzacja komplementarnych odcinków *pbs*; G — Po hybrydyzacji odcinków *pbs* ukończona zostaje synteza obydwu nici DNA; H — Prowirusowy DNA.

transkryptaza (EC 2.7.7.49), kodowana przez region *pol* genomowego RNA HIV-1 (Ryc. 1). Jest to polimeraza DNA, katalizująca syntezę łańcuchów polinukleotydowych na matrycy RNA lub DNA. Ponadto enzym ten wykazuje aktywność RNazy H hydrolyzującej wiązania fosfodwuwęglowe RNA w hybrydach DNA-RNA [2]. Podobnie jak w przypadku odwrotnych transkryptaz innych retrowirusów, aktywności polimerazy DNA i rybonukleazy H zlokalizowane są, odpowiednio, w aminowej i karboksylowej części cząsteczki białka [2]. Zarówno w wirionach, jak i w zainfekowanych komórkach odwrotna transkryptaza HIV-1 występuje w postaci heterodimerów złożonych z łańcuchów polipeptydowych o masach cząsteczkowych 66 kD (p66) i 51 kD (p51) [2]. Białko p66 powstaje w wyniku proteolizy prekursorowego białka p160 powstającego w wyniku translacji produktu genu *pol*. Mniejsza podjednostka (p51) powstaje przez odcięcie polipeptydu (p15) od końca karboksylowego białka p66. Homodimer p66/p66 ulega asymetrycznej proteolizie w jednym z odcinków łączących odcinając domenę p15 z resztą białka. Przepuszczalnie jedna z domen RNazy H (p15) w homodimerze jest częściowo rozwinięta eksponując fragment łańcucha polipeptydowego, w którym następuje cięcie (Ryc. 3) [3]. Proces ten katalizowany jest najprawdopodobniej przez proteazę wirusową chociaż nie wykluczony jest udział enzymów proteolitycznych komórki gospodarza. Ekspresja genu odwrotnej transkryptazy w komórkach

*E. coli* prowadzi do powstania zarówno homodimerów p66/p66, jak i heterodimerów p66/p51. Mniejsza podjednostka powstaje w tym przypadku w wyniku działania proteaz bakteryjnych [4]. Heterodimery można również uzyskać przez trawienie homodimeru chymotrypsyną [2]. Prawdopodobnie tylko jedna z podjednostek heterodimeru p66/p51 jest aktywna w procesie polimeryzacji DNA, podczas gdy druga zapewnia optymalną konformację białka [5]. Domeny polimerazy DNA i RNazy H odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1 wykazują wysoką homologię sekwencji z odpowiadającymi im analogicznymi fragmentami enzymów innych retrowirusów. W niektórych przypadkach możliwe jest rozdzielenie funkcjonalnych regionów odwrotnej transkryptazy, wykazujących aktywność polimerazy i RNazy H. Nie jest to jednak możliwe w przypadku enzymu HIV-1, gdzie domeny te wykazują bardzo wysoki stopień współzależności funkcjonalnej [6].

Polipeptyd odpowiadający RNazie H (p15) uzyskany w wyniku trawienia homodimerów przez proteazę, lub w wyniku ekspresji w *E. coli* nie wykazuje aktywności enzymatycznej. Podobnie, sama podjednostka p51 nie jest w pełni aktywna w reakcji polimeryzacji DNA [6].

Ostatnio rozwiązano strukturę krystaliczną kompleksu odwrotnej transkryptazy HIV-1 z nienukleotydowym inhibitorem — newirapiną [7], oraz struktury domen polimerazy [8] i RNazy H [6, 9]. Porównanie tych wyników z wcześniej określonymi strukturami innych enzymów wykazuje, że struktury domen polimerazowej i RNazy H odwrotnej transkryptazy HIV-1 są podobne, odpowiednio, do fragmentu Klenowa polimerazy DNA i RNazy H z *E. coli* [7, 9, 10]. Analiza struktury kompleksu z newirapiną pozwoliła na zrozumienie sposobu wzajemnego oddziaływania podjednostek odwrotnej transkryptazy. Kompleks ten jest asymetryczny, tzn. podjednostka p51 oddziałuje z domeną RNazy H podjednostki p66. Podjednostka p66 tworzy bruzdę, w której wiązana jest matryca i nowo syntetyzowany DNA. Wcześniej proponowany model zakładał równoległe ułożenie podjednostek [2]. Antyrównoległe ułożenie podjednostek potwierdza hipotezę powstawania heterodimerów zaproponowaną przez Hostomsk'y'ego i wsp. [6]. Poznanie struktury odwrotnej transkryptazy oraz mechanizmów kluczowych procesów w replikacji retrowirusów może mieć istotne znaczenie przy projektowaniu nowych leków antywirusowych blokujących działanie różnych składników aparatu genetycznego wirusa. Niektóre analogi nukleotydów, jak 3'azydodeoksytymidyna (AZT) i dideoksyinozyna (ddI), blokują aktywność odwrotnej transkryptazy i są wykorzystywane w terapii AIDS [11-13]. Jak wiadomo związki te (AZT i ddI) nie zawierają grupy hydroksylowej przy atomie węgla 3' deoksyrybozy i po wbudowaniu do nowo utworzonego łańcucha DNA powodują terminację jego syntezy.

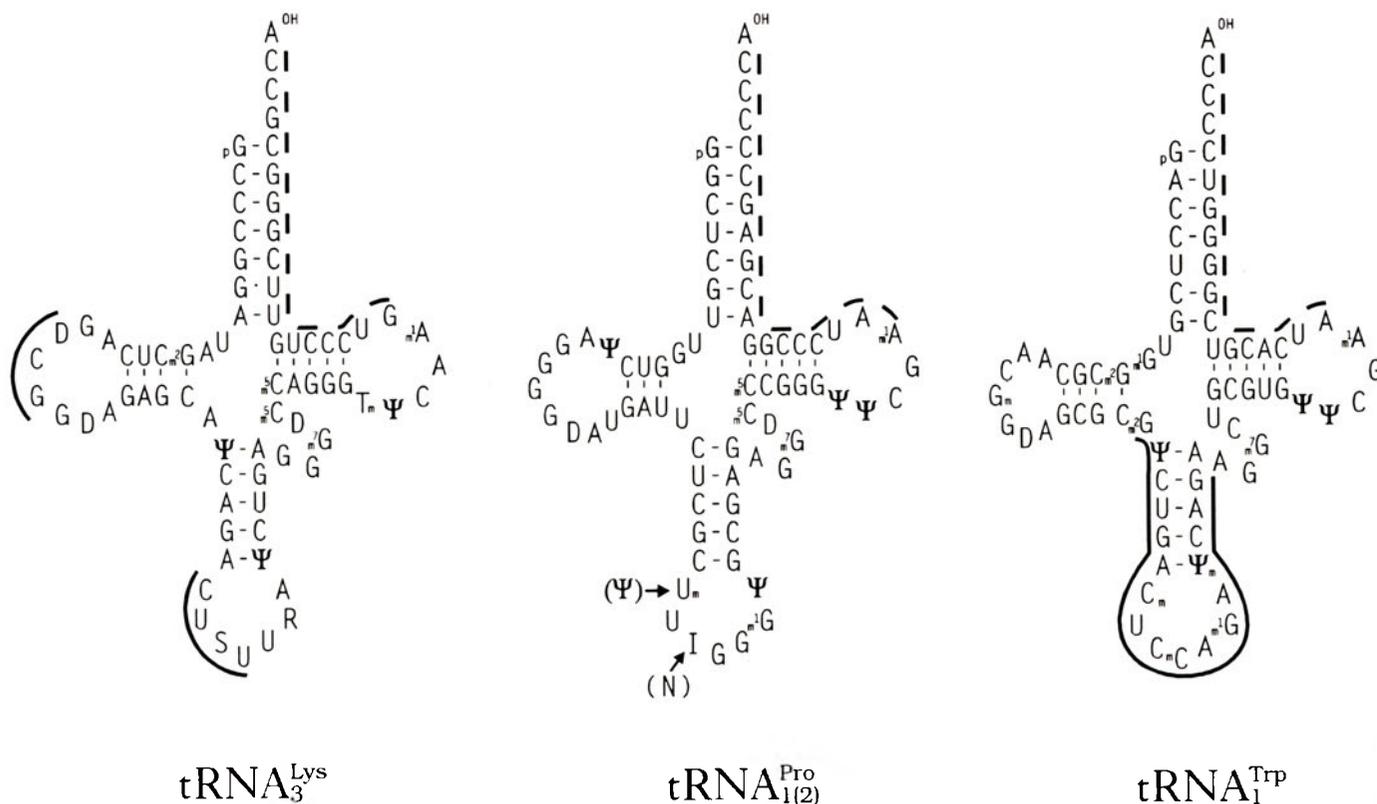


**Ryc. 3.** Proponowany mechanizm tworzenia heterodimerów odwrotnej transkryptazy. W luźno związanych asymetrycznych homodimerach p66/p66 jedna z domen rybonukleazy H jest częściowo rozwinięta umożliwiając działanie proteazy. Symbole Pol i Rn oznaczają odpowiednio domeny polimerazową i RNazy H.

### III. Starterowe tRNA

Wspólną cechą enzymów katalizujących syntezę DNA jest ich niezdolność do inicjacji łańcucha *de novo*. W każdym z dotychczas poznanych przypadków synteza DNA jest inicjowana przez starterowe RNA, posiadające wolną grupę hydroksylową na końcu 3', do której polimeraza przyłącza kolejne deoksynukleotydy komplementarne wobec matrycy. Wszystkie dotychczas opisane odwrotne transkryptazy retrowirusowe wykorzystują, jako startery w procesie inicjacji odwrotnej transkrypcji, cząsteczki transferowych RNA gospodarza [14]. Sekwencje 3'-końcowych fragmentów tych tRNA są komplementarne z sekwencjami pbs w genomowym RNA wirusa (Ryc. 4). Cząsteczka

Enzymy wirusów ptasich z grupy AMV/ASV (AMV-*Avian Myeloblastosis Virus*, ASV-*Avian Sarcoma Virus*) wykorzystują jako startery syntezy DNA cząsteczki tRNA<sup>Trp</sup> [19, 20]. W przypadku MuLV (*Murine Leukemia Virus*) starterem jest tRNA<sup>Pro</sup> [21], a w przypadku MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*) i HIV-1 tRNA<sub>3</sub><sup>Lys</sup> [22]. Wydaje się, że o specyficzności oddziaływania tRNA z odwrotną transkryptazą decyduje budowa cząsteczki enzymu. Monomeryczny enzym MuLV wiąże kilka różnych tRNA z podobnym powinowactwem, a dimeryczne enzymy wirusów ptasich wykazują podobnie wysoką specyficzność w stosunku do tRNA<sup>Trp</sup> jak enzym HIV-1 w stosunku do tRNA<sup>Lys</sup> [2,23]. W komórkach ssaków stwierdzono trzy tRNA specyficzne dla lizyny [24]. Wszystkie one



Ryc. 4. Struktury drugorzędowe niektórych tRNA wykorzystywanych jako startery inicjacji odwrotnej transkrypcji. Linia przerywana zaznaczono fragmenty sekwencji komplementarne wobec pbs w genomowych RNA. Na strukturach tRNA<sup>Lys</sup> i tRNA<sup>Trp</sup> zaznaczono regiony oddziałujące z odwrotną transkryptazą.

tRNA, związana z genomowym RNA poprzez sekwencję pbs, wydłużana jest przez odwrotną transkryptazę w czasie syntezy 3'-końcowego odcinka nici (-)DNA. Transferowe RNA pełniące funkcję starterów syntezy (-)DNA, oprócz komplementarności 3'-końcowej sekwencji nukleotydowej do pbs, muszą wykazywać również inne cechy strukturalne, które decydują o rozpoznawaniu ich przez odwrotną transkryptazę. Specyficzne oddziaływanie tRNA z odwrotną transkryptazą może być podobne do oddziaływania tRNA z syntetazą aminoacylo-tRNA. Analogia ta jest tym bardziej uderzająca, że w przypadku obydwu kompleksów istotną rolę odgrywa pętla antykodonu [15-18]. Odwrotne transkryptazy różnych retrowirusów wykazują zróżnicowaną specyficzność w stosunku do tRNA.

tworzą stabilne kompleksy z odwrotną transkryptazą i powodują inhibicję jej aktywności *in vitro* [18, 25]. Oligomery powstające w wyniku hydrolizy lizynowych tRNA rybonukleazą T1, zawierające fragment 3' ramienia antykodonowego i pętli antykodonu w takim samym stopniu obniżają aktywność odwrotnej transkryptazy jak natywne cząsteczki tRNA<sup>Lys</sup> (Ryc. 4). Wyraźną inhibicję obserwowano również w przypadku tRNA<sup>Trp</sup> i tRNA<sup>Phe</sup>, podczas gdy tRNA<sup>Pro</sup>, tRNA<sup>Gly</sup> i tRNA<sup>Val</sup> nie miały żadnego wpływu na aktywność tego enzymu [18]. Inhibicja odwrotnej transkrypcji przez tRNA<sup>Lys</sup> dotyczy wyłącznie heterodimeru p66/p51 [26]. W przypadku homodimeru p66/p66 zjawisko inhibicji nie jest obserwowane, prawdopodobnie ze względu na obecność w nim dodatkowej

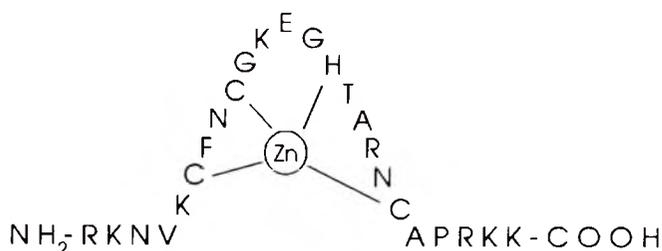


ną (p-rA-DNA) [33]. W przypadku odwrotnej transkryptazy AMV odcięcie starterowego tRNA<sup>Trp</sup> zachodzi w wyniku endonukleolitycznego trawienia dokładnie w miejscu połączenia DNA-RNA uwalniając nienaruszoną cząsteczkę tRNA [34]. Usunięcie tRNA zachodzi dopiero po syntezy DNA komplementarnego wobec końcowych nukleotydów tRNA odpowiedzialnych za wiązanie do pbs.

Oprócz aktywności RNazy H, hydrolizującej RNA w dupleksach RNA/DNA, odwrotna transkryptaza wykazuje aktywność nukleazową, której substratem są dupлексы RNA/RNA. Aktywność ta, określana terminem RNazy D, jest niezależna od RNazy H i wykazuje taką samą specyficzność w stosunku do substratu jak RNaza III *E. coli* [35, 36].

## V. Białko nukleokapsydu

Jednym z podstawowych składników wirionów retrowirusów jest zasadowe białko nukleokapsydu (NC) powstające w wyniku dojrzewania prekursora kodowanego przez region *gag* genomu wirusowego [37]. Białko to wraz z odwrotną transkryptazą oraz diploidalnym genomem wirusowym tworzy rybonukleoproteinowy rdzeń retrowirusa. Oprócz funkcji strukturalnej białko nukleokapsydu odgrywa istotną rolę w procesie tworzenia dimerów genomowego RNA [38, 39], upakowywaniu wirusowego RNA w wirionach oraz inicjacji odwrotnej transkrypcji [40-42]. Białka nukleokapsydu różnych retrowirusów, pomimo różnic wielkości, wykazują duże podobieństwo strukturalne przejawiające się w trójdomenowej strukturze. N-końcowa domena bogata jest w aminokwasy zasadowe. Centralna domena zawiera jeden (p10 MuLV) lub dwa (p12 RSV, p15 HIV-1, p14 MMTV) motywy tzw. palca cynkowego. Fragment przy końcu karboksylowym jest bogaty w reszty proliny [40]. Motyw palca cynkowego o ogólnej sekwencji Cys-X2-Cys-X3-His-X4-Cys jest potencjalnym miejscem wiązania atomu cynku podobnie jak w strukturach palców cynkowych występujących w białkach wiążących DNA [43], czy RNA [44]. Motyw ten nazwany jest palcem cynkowym typu retrowirusowego, dla odróżnienia od klasycznego palca cynkowego występującego w czynnikach transkrypcyjnych, od którego różni się sekwencją i strukturą przestrzenną. Różnice te mają swe konsekwencje funkcjonalne. Opisane dotychczas



Ryc. 6. Schemat palca cynkowego typu retrowirusowego na przykładzie pierwszego palca p15 wirusa HIV-1.

białka zawierające ten motyw obejmujące poza białkami retrowirusowymi białko kodowane przez transpozon *copia* drożdży i ludzkie białko wiążące kwasy nukleinowe (CNBP), wykazują specyficzność w stosunku do jednoniciowych regionów kwasów nukleinowych [45], natomiast czynniki transkrypcyjne, w których występują klasyczne palce cynkowe, wiążą dupлексы DNA [44]. Obecność domen palca cynkowego jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu upakowywania RNA w wirionach, ale nie jest konieczna dla hybrydyzacji tRNA z pbs [41]. W tym przypadku istotna wydaje się być krótka sekwencja ograniczająca pierwszy palec od strony końca aminowego.

Funkcja białek nukleokapsydu polega prawdopodobnie na rozplataniu odcinków RNA o rozbudowanej strukturze drugo- i trzeciorzędowej oraz wiązaniu regionów komplementarnych, co odgrywa istotną rolę zarówno w procesie dimeryzacji genomu, jak i przy inicjacji odwrotnej transkrypcji. Białko nukleokapsydu jest niezbędne dla hybrydyzacji starterowego tRNA z pbs. Jego rola polega na rozplataniu ramienia aminokwasowego tRNA i stabilizacji jednoniciowej struktury matrycowego RNA [42]. Udział białka nukleokapsydu w inicjacji odwrotnej transkrypcji wymagane jest tylko w przypadku, gdy matrycą dla syntezy DNA jest natywny genom wirusowy. W badaniach *in vitro*, w których inicjowano odwrotną transkrypcję krótkich odcinków RNA, brak białka nukleokapsydu nie miał wpływu na efektywność inicjacji [28].

Artykuł otrzymano 13 kwietnia 1993 r.

Zaakceptowano do druku 23 września 1993 r.

## Piśmiennictwo

1. Huber HA, Richardson CC (1990) *J Biol Chem* **265**: 10565-10573
2. Jacobo-Molina A, Arnold A (1991) *Biochemistry* **30**: 6351-6361
3. Hostomska Z, Matthews DA, Davies JF, Nodes BR, Hostomsky Z (1991) *J Biol Chem* **266**: 14697-14702
4. Farmerie WG, Loeb DD, Casavant NC, Hutchinson CA, Edgell MH, Swanstrom R (1987) *Science* **236**: 305-308
5. Huang SC, Smith JR, Moen LK (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **184**: 986-992
6. Hostomsky Z, Hostomska Z, Hudson GO, Moomaw EW, Nodes BR (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1148-1152
7. Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA (1992) *Science* **256**: 1783-1790
8. Narasimhan LS, Maggiora GM (1992) *Prot Eng* **5**: 139-146
9. Davies JF, Hostomska Z, Hostomsky Z, Jordan SR, Matthews DA (1991) *Science* **252**: 88-95
10. Katayanagi K, Miyagawa M, Matsushima M, Ishikawa M, Kanaya S, Nakamura H, Ikehara M, Matsuzaki T, Morikawa K (1992) *J Mol Biol* **223**: 1029-1052
11. Mitsuya H, Broder S (1987) *Nature (Lond)* **325**: 773-778
12. Mitsuya H, Yarchoan R, Broder S (1990) *Science* **249**: 1533-1543
13. Goody RS, Müller B, Restle T (1991) *FEBS Lett* **291**: 1-5

14. Barciszewska M, Barciszewski J (1992) *Biotechnologia Przegląd Informacyjny* 16: 63-75
15. Araya A, Sarih L, Litvak S (1979) *Nucleic Acides Res* 6: 3831-3843
16. Barat C, Lullien V, Schatz O, Keith G, Nugeyre MT, Grüninger-Leith F, Barré-Sinoussi F, LeGrice SFJ, Darlix JL (1989) *EMBO J* 8: 3279-3285
17. Sarih-Cottin L, Bordier B, Musier-Forsyth K, Andreola ML, Barr PJ, Litvak S (1992) *J Mol Biol* 226: 1-6
18. Bordier B, Tarrago-Litvak L, Sallafranque-Andreola ML, Robert D, Tharaud D, Fournier M, Barr PJ, Litvak S, Sarih-Cottin L (1990) *Nucleic Acides Res* 18: 429-436
19. Harada F, Sawyer RC, Dahlberg JE (1975) *J Biol Chem* 250: 3487-3497
20. Waters LC, Mullin BC, Ho T, Yang W-K (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 2155-2159
21. Peters G, Dahlberg JE (1979) *J Virol* 31: 398-407
22. Waters LC (1991) *Virology* 112: 766-769
23. Litvak S, Araya A (1982) *Trends Biochem Sci* 7: 361-364
24. Raba M, Limburg K, Burghagen M, Katze JR, Simsek M, Heckman JE, RajBhandary UL, Gross HJ (1979) *Eur J Biochem* 97: 305-310
25. Sallafranque-Andreola ML, Robert D, Barr PJ, Fournier M, Litvak S, Sarih-Cottin L, Tarrago-Litvak L (1989) *Eur J Biochem* 184: 367-374
26. Andreola M-L, Nevinsky GA, Barr PJ, Sarih-Cottin L, Bordier B, Fournier M, Litvak S, Tarrago-Litvak L (1992) *J Biol Chem* 267: 19356-19362
27. Barat C, LeGrice SFJ, Darlix JL (1991) *Nucleic Acides Res* 19: 751-757
28. Kohlstaedt LA, Steitz TA (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9652-9656
29. Kleiman L, Caudry S, Boulerice F, Wainberg MA, Parniak MA (1991) *Biochem Biophys Res Com* 174: 1272-1280
30. Schatz O, Mous J, LeGrice SJF (1990) *EMBO J* 9: 1171-1176
31. Prasad VR, Goff SP (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2104-3108
32. Hostomsky Z, Hostomska Z, Hudson GO, Momaw EW, Nodes BR (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1148-1152
33. Furfine ES, Reardon JE (1991) *Biochemistry* 30: 7041-7046
34. Omer CA, Faras AJ (1982) *Cell* 30: 797-805
35. Ben-Artzi H, Zeelon E, LeGrice SFJ, Gorecki M, Panet A (1992) *Nucleic Acides Res* 20: 5115-5118
36. Hostomsky Z, Hudson GO, Rahmati S, Hostomska Z (1992) *Nucleic Acides Res* 20: 5819-5824
37. Katz RA, Jentoft JE (1989) *BioEssays* 11: 176-181
38. Bieth E, Gabus C, Darlix J-L (1990) *Nucleic Acides Res* 18: 119-127
39. Darlix J-L, Gabus C, Nugeyre M-T, Clavel F, Barré-Sinoussi F (1990) *J Mol Biol* 216: 689-699
40. Prats AC, Sarih C, Gabus C, Litvak S, Keith G, Darlix JL (1988) *EMBO J* 7: 1777-1783
41. De Rocquigny H, Gabus C, Vincent A, Fournié-Zaluski M-C, Roques B, Darlix J-L (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6472-6476
42. Khan R, Giedroc DP (1992) *J Biol Chem* 267: 6689-6695
43. Latchman DS (1990) *Biochem J* 270: 281-289
44. Theunissen O, Rudt F, Guddat U, Mentzel H, Pieler T (1992) *Cell* 71: 679-690
45. South TL, Blake PR, Hare DR, Summers MF (1991) *Biochemistry* 30: 6342-6349
46. Peliska JA, Benkovic SJ (1992) *Curr Biol* 2: 621-523

XXX ZJAZD P.T.BIOCH W 1994 ROKU

## ZAWIADOMIENIE WSTĘPNE

We wrześniu (14-16 IX) 1994 roku odbędzie się w Szczecinie Ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Jednym z zasadniczych tematów Zjazdu będzie tematyka związana z molekularno-biochemicznymi aspektami białaczek bydła i chorób zwierząt hodowlanych wywoływanych przez wirusy oraz wewnątrzkomórkowe fakultatywne patogeny bakteryjne (*Listeria* spp., *Brucella* spp., *Mycobacterium* spp., *Salmonella* spp., i inne).

w imieniu Komitetu  
Organizacyjnego

Prof. zw. dr hab. A. Furowicz

# Nowe perspektywy strategii antysensu — regulacja biosyntezy białka

## New possibilities of antisense strategy — regulation of protein biosynthesis

EWA BOHUN<sup>1</sup>,  
TOMASZ TWARDOWSKI<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Klasyfikacja i pojęcie związków antysensowych
- III. Badania rybosomalne z udziałem związków antysensowych
- IV. Zastosowanie strategii antysensu na poziomie regulacji biosyntezy białka
- V. Piśmiennictwo

**Wykaz stosowanych skrótów:** a-DNA, a-RNA — otrzymany w wyniku syntezy chemicznej lub ekspresji genu krótki oligonukleotyd DNA lub RNA o sekwencji antysensowej; L-rRNA — rybosomalny RNA dużej podjednostki rybosomalnej.

### I. Wstęp

W ciągu ostatnich dwudziestu lat związki antysensowe znalazły szerokie zastosowanie w badaniach ekspresji genu. Zastosowanie związków antysensowych do interpretacji mechanizmów regulatorowych translacji, a zwłaszcza zachodzących na rybosomie jest zagadnieniem stosunkowo nowym. W szczególności ciekawe są rezultaty prac związanych z zastosowaniem syntetycznych antysensowych oligodeoksynukleotydów (a-DNA) komplementarnych do określonych fragmentów rybosomalnych RNA. Taka hybrydyzacja powoduje zablokowanie biosyntezy białka. Perspektywy wykorzystania tego typu związków w praktyce medycznej i w rolnictwie są coraz szersze, a w szczególności wykorzystanie rybozymów oraz oligonukleotydów tworzących kompleksy trójniciowe (tzw. trójniciowa „helisa”) stwarza nowe możliwości.

### II. Klasyfikacja i pojęcie związków antysensowych

Pojęcie „antysensu” związane jest bezpośrednio ze zdolnością kwasów nukleinowych do wzajemnej inter-

### Contents:

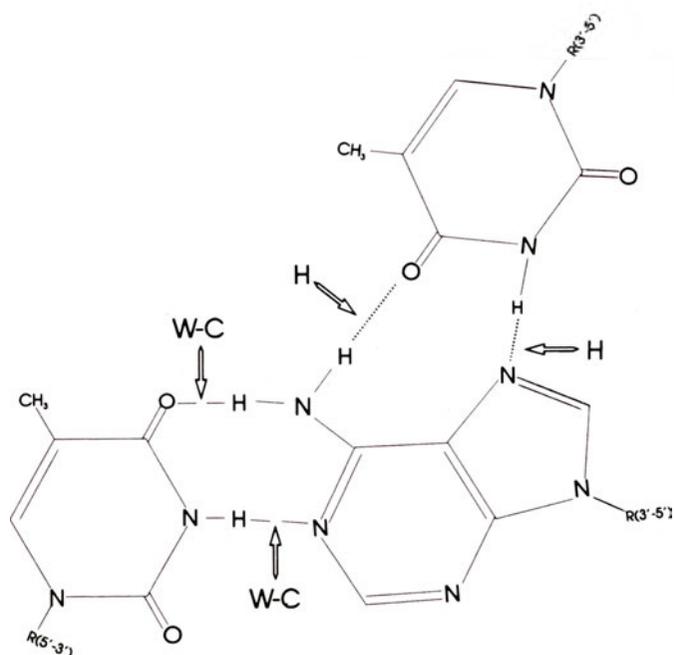
- I. Introduction
- II. Classes and definition of antisense reagents
- III. Probing of ribosomes using antisense reagents
- IV. Application of antisense strategies effective on protein biosynthesis level
- V. References

akcji poprzez hybrydyzację. Dwie przeciwbieżne nici kwasu nukleinowego komplementarnie oddziałując ze sobą jednocześnie blokują możliwość innych oddziaływań biologicznych. Doskonałym, klasycznym przykładem tego typu oddziaływania jest parowanie zasad kodonu i antykodonu, które kiedyś określano terminami „kodon” i „nodok”. Antysensowym oligonukleotydem jest krótki oligomer (na ogół od kilku do kilkudziesięciu nukleotydów), który w wyniku specyficznego rozpoznania i hybrydyzacji komplementarnej sekwencji blokuje aktywność biologiczną związaną z działaniem tego fragmentu. Ta naturalna właściwość kwasów nukleinowych wynika ze specyficzności parowania zasad, czy to w klasycznym ujęciu Watsona-Cricka, czy to na zasadzie oddziaływań grup donorowych i akceptorowych różnych ligandów związanych z poszczególnymi zasadami, jak np. wiązania wodorowe typu Hoogsteena (Ryc. 1). Strategie antysensu wymagają stosowania oligonukleotydów RNA, DNA lub ich analogów wykazujących komplementarną, „antysensową”, sekwencję wobec kodującej czyli „sensowej” nici kwasu nukleinowego [1].

W zależności od metody pozyskiwania antysensowych związków można wyróżnić powstałe na drodze chemicznej, albo w wyniku ekspresji genu.

Synteza chemiczna — pozwala otrzymywać krótkie oligonukleotydy DNA lub RNA, z ewentualnymi modyfikacjami chemicznymi (na ogół o długości do 30 jednostek), które stosuje się w celu hybrydyzacji do określonych, wzajemnie się uzupełniających sekwencji RNA (pre-mRNA, mRNA, rRNA) [2]. W przypadku wprowadzania tak otrzymanych antysensowych oligonukleotydów do komórki — efekt ich działania *in vivo* jest krótkotrwały, zależny od czasu półtrwania w ukła-

<sup>1</sup> Mgr, <sup>2</sup> prof. dr hab., Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego, 12 61-704 Poznań



Ryc. 1. Klasyczne wiązanie wodorowe Watsona-Cricka (W-C) pomiędzy parą zasad tymina-adenina oraz wiązanie wodorowe typu Hoogsteen'a pomiędzy adeniną i dodatkową tyminą w kompleksie trójniciowym.

dach biologicznych.

Ekspresja genu — w konsekwencji wprowadzenia odpowiedniego genu do genomu danego układu biologicznego zachodzi synteza stosunkowo długich (powyżej 50 jednostek) antysensowych RNA. W wyniku transkrypcji odpowiednich antysensowych sekwencji genowych DNA otrzymywane są zaprogramowane a-RNA będące endogennymi elementami tego układu biologicznego. W zależności od wybranego promotora produkcja antysensowych RNA *in vivo* może być chwilowa lub długotrwała [3-5].

Uzyskane antysensowe transkrypty można stosować do zahamowania translacji w wyniku tworzenia komplementarnych hybrydów typu (mRNA-antysensowy DNA) [3]. W połączeniu z modyfikacjami, np. po włączeniu do antysensowej nici DNA sekwencji kodującej strukturę rybozomu, możliwe jest otrzymanie antysensowych DNA zawierających katalityczną domenę pozwalającą ciąć docelowy fragment RNA w określonym miejscu [4]. Ma to istotne znaczenie dla zahamowania replikacji RNA wirusów.

Niezależnie od źródła pozyskiwania oligonukleotydów specyficzność i skuteczność działania antysensowego związku zależy od:

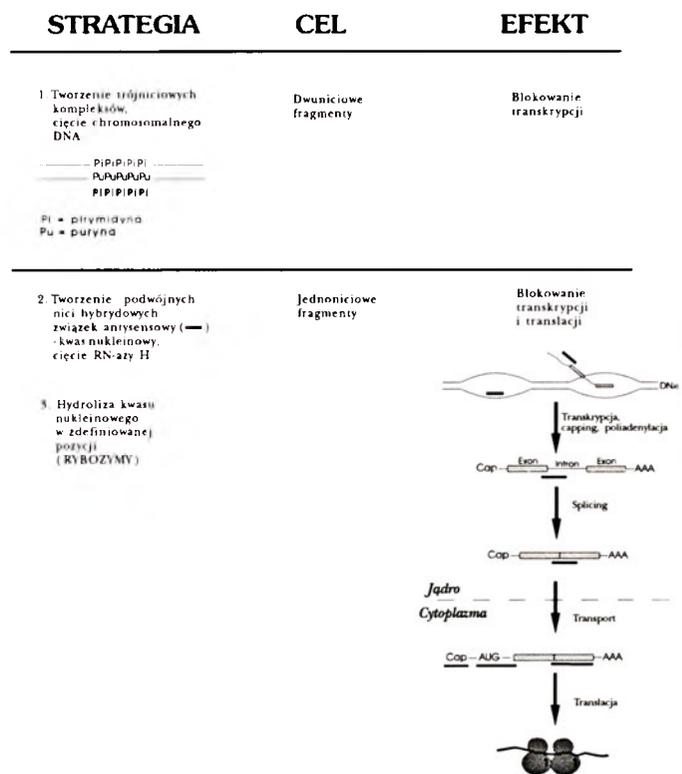
- dostępności docelowej „sensowej” sekwencji,
- struktury drugorzędowej nici „sens” i „antysens”,
- wyjątkowości (niepowtarzalności) sekwencji docelowej,
- mocy wiązania pomiędzy sekwencją kodującą i antysensową,
- sposobu inhibicji wywoływanej przez związek antysensowy,
- odporności na nukleazy (szczególnie istotne w przypadku oligonukleotydów otrzymywanych drogą chemiczną),

— zdolności wnikania do komórki oraz migracji między jądrem komórkowym a cytoplazmą (w zależności od metody wprowadzania antysensowego związku do komórki).

Początkowo jako strategie antysensu określano te koncepcje eksperymentalne, których celem była kontrola ekspresji genu na poziomie mRNA. W szczególności inhibicja translacji mRNA w wyniku hybrydyzacji wprowadzanego z zewnątrz do komórki antysensowego oligonukleotydu, komplementarnego wobec specyficznego fragmentu mRNA [1, 5]. W ciągu ostatnich lat zastosowanie strategii antysensu rozszerzono: — blokowanie tzw. *splicingu* prekursorowego mRNA; — inhibicję transkrypcji genomowego DNA poprzez tworzenie trójniciowych kompleksów (ang. „triple-stranded complexes” [5], lub „triple helix” [6]; — działanie rybozymów, czy też — efekty wynikające z działania RN-azy H [1, 6] — (Ryc. 2).

Jednakże analiza zastosowań strategii antysensu na różnych poziomach przenoszenia informacji genetycznej nie jest przedmiotem tego artykułu, a zainteresowanych Czytelników odsyłamy do obszernych opracowań: [1-2, 6-9, 37]. Omówione zostały w nich przykłady strategii antysensu prowadzących do zablokowania replikacji genetycznej oraz przerwania ekspresji genu. Szczególnie efektywne było działanie antysensowych oligonukleotydów skierowanych względem mRNA w miejscu wiązania czynników inicjatorowych, kodonu *START* czy też sekwencji kodującej.

Regulacja biosyntezy białka związkami antysensowymi na poziomie kompleksu rybosomalnego jest w tym kontekście zagadnieniem nowym i tym bardziej interesującym.



Ryc. 2. Strategie eksperymentalne wiążące się z zastosowaniem antysensowych związków.

### III. Badania rybosomalne z udziałem związków antysensowych

Badania mechanizmów regulatorowych, w których uczestniczy rybosom i przyłączające się do niego ligandy (np. aminoacylo-tRNA, peptydylo-tRNA, tRNA), polegają przede wszystkim na stosowaniu syntetycznych oligonukleotydów DNA i RNA oraz ich analogów, a nie na stosowaniu produktów naturalnej ekspresji genu. Większość badań ukierunkowano w celu poznania właściwości rybosomalnych kwasów nukleinowych. Już w 1967 roku alkilowane pochodne oligorybonukleotydów użyto do wprowadzenia specyficznej modyfikacji rybosomalnego RNA [10], a w trzy lata później komplementarne oligodeoksynukleotydy zastosowano do prób wyjaśnienia struktury 5S rRNA [11]. Za pomocą hybrydyzacji sond cDNA oraz mikroskopu elektronowego określono ogólną morfologię podjednostki 30S *E. coli* [12]. Natomiast, głównie przy zastosowaniu oligodeoksynukleotydów zawierających fotolabilne grupy zdolne do wytwarzania wiązań krzyżowych, zidentyfikowano rybosomalne komponenty białkowe, sąsiadujące z odcinkiem 23S rRNA zaliczanym do centrum transferazy peptydylowej [13]. Krótkie, syntetyczne oligomery DNA służące mogą do badania interakcji rybosomalnych RNA między sobą oraz miejsc wiązania (tRNA \* rRNA) z rozdzielczością nawet do jednej czy dwóch zasad, co można ogólnie określić jako funkcjonalne regiony tRNA [14-15]. Odrębne zagadnienie stanowią zmiany konformacyjne rRNA wewnątrz podjednostek rybosomalnych. Badania tych przemian również są realizowane z zastosowaniem a-DNA. Przykładem są prace dotyczące struktury 16S rRNA podjednostki 30S z *E. coli* [16], czy też fragmentów 23S rRNA zaangażowanych w wiązanie deacylowanego tRNA w miejscu E [17]. Syntetyczne sondy DNA znalazły zastosowanie również jako chromosomalne markery rybosomalnych RNA *Apis mellifera* i *Triticum monococcum* [18, 19], a antysensowe transkrypty RNA umożliwiły badanie interakcji białek rybosomalnych z rybosomalnymi kwasami nukleinowymi (np. białka S7 z 16S rRNA [20] i śledzenie „dojrzewania” rybosomów [21]).

Szczególne zainteresowanie budzą fragmenty rybosomalnych RNA zaangażowane w uniwersalne funkcje rybosomu, jak np. synteza wiązania peptydowego czy też wydłużanie łańcucha polipeptydowego. Te fragmenty strukturalne rRNA mają często formę pojedynczych łańcuchów wyeksponowanych na powierzchnię rybosomu, co warunkuje ich oddziaływanie z innymi ligandami. Dostępność tych fragmentów strukturalnych dla innych komponentów układu translacyjnego pozostaje w ścisłym związku z ich funkcją biologiczną. Należy sądzić, że elementy rRNA zaangażowane w uniwersalne funkcje rybosomu charakteryzują się zachowawczością sekwencji oraz strukturami przestrzennymi identycznymi lub bardzo podobnymi, niezależnie od pochodzenia materiału biologicznego

[22-24]. Zablokowanie takiej domeny funkcjonalnej relatywnie małym związkiem, np. krótkim (10-20 zasad) antysensowym oligonukleotydem, winno spowodować inhibicję aktywności biologicznej. Podobny efekt może nastąpić w przypadku zastosowania rybozomu i programowej hydrolizy funkcjonalnego fragmentu RNA w specyficznym, wcześniej zaplanowanym, miejscu. Takie podejście eksperymentalne umożliwia precyzyjne badanie funkcji danej struktury RNA, jak również mechanizmu molekularnego danego procesu.

W przeprowadzonych pracach eksperymentalnych, dotyczących analizy znanych struktur pierwszorzędowych 23S i 26S rRNA oraz przez porównanie wybranych fragmentów o określonej funkcji biologicznej, wybraliśmy kilka potencjalnie istotnych dla funkcjonowania rybosomu elementów strukturalnych rRNA. Badano tzw. domenę a-sarcyny dużego rybosomalnego RNA (L-rRNA). Za pomocą antysensowych sond oligonukleotydów DNA wykazaliśmy uczestnictwo tego fragmentu rRNA dużej podjednostki rybosomalnej w procesie wiązania aminoacylo-tRNA i wydłużania łańcucha polipeptydowego [23, 24]. Możliwa jest hybrydyzacja a-DNA z wolnym rybosomem, tj. nie zaangażowanym w proces syntezy polipeptydu. Natomiast rybosom ze związanym nowo syntetyzowanym polipeptydem nie jest zdolny do hybrydyzacji a-DNA. Przyłączenie tylko aminoacylo-tRNA nie zabezpiecza rybosomu przed hybrydyzacją a-DNA z domeną a-sarcyny.

Zastosowanie syntetycznych sond oligonukleotydowych, komplementarnych wobec różnych fragmentów roślinnych 5S rRNA, pozwoliło na uzyskanie nowego narzędzia badawczego do analizy mechanizmu wiązania fenyloalaniny-tRNA z rybosomami oraz syntezy polifenyloalaniny [25]. Wykazano wyraźne różnice w zdolności do hybrydyzacji poszczególnych sond oraz odmienny efekt inhibitorowy w procesie wiązania fenyloalaniny-tRNA i syntezy polifenyloalaniny. Spośród testowanych oligonukleotydów największy efekt inhibitorowy wykazywała sonda komplementarna wobec zachowawczej sekwencji w pętli „C” cząsteczki 5S rRNA [25].

### IV. Wnioski i perspektywy zastosowania strategii antysensu efektywnych podczas regulacji biosyntezy białka

Począwszy od lat siedemdziesiątych oligonukleotydy i ich analogi znalazły szereg ważnych zastosowań w biologii molekularnej. Są one stosowane do klonowania i sekwencjonowania, jako elementy „blokowe” służące do konstrukcji syntetycznych genów oraz jako startery („primers”) reakcji PCR (łańcuchowa reakcja polimeryzacji).

Uniwersalność prawa parowania zasad — będąca podstawą strategii antysensu — prowadzi do wielorakich możliwości ich wykorzystania. Przykładem

tych zastosowań są badania cyklu komórkowego i namnażania komórek, identyfikacja genów odgrywających istotną rolę w rozwoju embrionalnym, analiza procesów regulatorowych transkrypcji i translacji, testowanych zarówno *in vivo* jak i *in vitro* [1, 2, 5, 6]. Antysensowe oligonukleotydy znalazły praktyczne zastosowanie w diagnostyce medycznej [26-29] i weterynaryjnej [30] (głównie jako sondy hybrydizacyjne względem 16S rRNA bakterii chorobotwórczych), a należy sądzić, że w niedalekiej przyszłości staną się także istotnym czynnikiem terapeutycznym, zwłaszcza w odniesieniu do chorób wirusowych i nowotworowych.

Po raz pierwszy *in vivo* udało się zastosować strategię antysensu do zahamowania proliferacji wirusa mięsaka *Rous sarcoma* w kulturach tkankowych — po dodaniu do medium komórkowego niezmodyfikowanych oligodeoksynukleotydów, komplementarnych wobec wirusowego RNA [31]. Podejście to stanowiło podstawę do opracowania dalszych strategii antywirusowych, a ostatnio także terapii genowej w przypadku AIDS. Terapia ta zakłada zablokowanie ekspresji określonych genów w komórkach zainfekowanych wirusem HIV [32], czy też wstrzymanie replikacji samego wirusa w zainfekowanym układzie biologicznym (np. za pomocą antysensowego wektora RNA, sprzężonego z katalityczną domeną typu "hammerhead" [33]). Większość badań *in vivo* na poziomie translacji prowadzono za pomocą antysensowych oligonukleotydów RNA czy DNA komplementarnych wobec informacyjnego RNA (mRNA). Antysensowa sekwencja specyficznie blokuje syntezę kodowanego białka w wyniku utworzenia dwuniciowego hybrydu, co pociąga za sobą niemożność odczytania przez rybosomy informacji kodowanej w mRNA. Szczegółowe badania prowadzone zarówno w układach pozakomórkowych, jak i w kulturach tkankowych, wykazały jednakże, że efekt działania antysensowego związku rzadko stanowi wyłącznie czysto mechaniczne zablokowanie translacji [6]. Efekt ten zależy m.in. od umiejscowienia a-DNA względem fragmentu mRNA. To znaczy czy a-DNA występuje przed czy za kodonem startowym, czy pokrywa się z miejscem wiązania podjednostek rybosomalnych lub czynników inicjujących, czy też wyłącznie z sekwencją kodującą (por. praca przeglądowa Helene i Toulme [6]). Zarówno w komórkach pro- jak i eukariotycznych stwierdzono, że obecność antysensowego RNA (lub a-DNA) może hamować syntezę białka, a także obniżać poziom docelowego transkryptu. Powoduje on destabilizację względnie uaktywnienie RNaz specyficznych dla RNA-RNA hybrydów [6]. Różny stopień efektywności blokowania translacji zależy od miejsca przyłączenia antysensowego związku. Przykładowo antysensowy transkrypt komplementarny względem odcinka 3' mRNA wykazuje wyższą skuteczność niż komplementarny względem promotorowego odcinka 5', włącznie z kodonem startowym AUG, a także

regionów kodujących [33, 34]. Specyficzne zablokowanie translacji na poziomie rRNA, z pominięciem mRNA, pozwoliłoby uniknąć występowania „efektów ubocznych”. Jest to możliwe zwłaszcza w przypadku zastosowania syntetycznych oligonukleotydów. Strategia ta wymaga zewnętrznego podania do komórek a-DNA, np. w wyniku mikroiniekcji, czy też poprzez pobranie z podłoża. Zastosowanie takiego podejścia eksperymentalnego pozwala uniknąć ewentualnych modyfikacji a-DNA czy też nawet hydrolizy tej cząsteczki, a zatem procesów mogących zachodzić podczas transportu z jądra komórkowego do cytoplazmy. Taka możliwość istnieje w przypadku antysensowych transkryptów powstałych w komórce w wyniku wprowadzenia antysensowych genów. „Zainfekowanie” komórki z zewnątrz prowadzi wyłącznie do hybrydizacji w cytoplazmie. Synteza chemiczna pozwala również na wprowadzenie do cząsteczki antysensowego związku grup funkcyjnych, zwiększających stabilność i odporność na enzymy nukleolityczne oraz powinowactwo do sekwencji docelowej. Zachodzi również poprawa przenikania przez błony komórkowe lub pobierania a-DNA przez komórkę (zainteresowanych odsyłamy do opracowań [5, 35-37]).

Odpowiednio przygotowane, antysensowe związki komplementarne względem specyficznej sekwencji rRNA mogłyby stanowić preparat terapeutyczny. Istotną byłaby w tym przypadku możliwość podawania tych preparatów tylko w okresie obecności patogenów w organizmie.

Także badania prowadzone w układach roślinnych z wykorzystaniem antysensowych oligonukleotydów regulujących biosyntezę białka na poziomie rRNA uzasadniają stwierdzenie, że antysensowe związki służą celom poznawczym i aplikacyjnym.

*Artykuł otrzymano 12 października 1993 r.  
Zaakceptowano do druku 9 grudnia 1993 r.*

#### **Podziękowanie:**

Praca w części finansowana w ramach grantu KBN # 6 6283 92 03.

#### **Piśmiennictwo**

1. Erickson RP, Izant JG (1992) W: Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA, Raven Press
2. Colmyn A (1990) *J Cell Sci* 97: 399-409
3. Uhlmann E (1993) W: Abstract Book of Sixth European Congress on Biotechnology, Firenze, t 4, TH 009
4. Homann M, Tzortzakaki S, Rittner K, Szcza-kiel G, Tabler M (1993) *NAR* 21: 2809-2814
5. Miller PS (1991) *Biotechnology* 9: 358-362
6. Helene C, Toulme JJ (1990) *Biochim Biophys Acta* 1049: 99-125
7. Weintraub HM (1990) *Sci Amer*: 34-40
8. Bryant JA (1989) *TIBTECH* 7: 20-21
9. Marsh J (1990) *TIBTECH* 8: 139-140
10. Belikova AM, Zaritova VF, Grineva NI (1967) *Tetrahedron Lett* 37: 3557-3567

11. Lewis JB, Doty P (1970) *Nature (Lond)* **225**: 510-512
12. Oakes MI, Scheinman A, Atha T, Shankweiler G, Lake JA (1990) W: Hill WE, Dahlberg A, Garrett RA, Moore PB, Schlessinger D, Warner JR (red) *The Ribosome: Structure, Function and Evolution*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., str. 180-193
13. Muralikrishna P, Cooperman BS (1991) *Biochemistry* **30**: 5421-5428
14. Hill WA, Tassanakajohn A (1987) *Biochimie* **69**: 1071-1080
15. Hill WA, Weller J, Gluick T, Merryman C, Marconi RT, Tassanakajohn A, Tapprich WE (1990) W: Hill WE, Dahlberg A, Garrett RA, Moore PB, Schlessinger D, Warner JR (red) *The Ribosome: Structure, Function and Evolution*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., str. 253-261
16. Weller JW, Hill WE (1992) *Biochemistry* **31**: 2748-2757
17. Lodmell JS, Tapprich WE, Hill WE (1993) *Biochemistry* **32**: 4067-4072
18. Mesters JR, Degraaf JM, Kraal B (1993) *FEBS Lett* **321**: 149-152
19. Kim NS, Kuspira J, Armstrong K, Bhambhani R (1993) *Genome* **36**: 77-86
20. Dragon F, Brakieringras L (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 1199-1203
21. Morel G (1993) *Pathologie Biologie* **41**: 187-193
22. Nierhaus KH, Schilling-Bartetzko S, Twardowski T (1992) *Biochimie* **74**: 403-410
23. Grzywacz-Bohun E, Twardowski T (1992) *Acta Biochim Pol* **39**: 65-73
24. Bohun E, Twardowski T (1993) *Acta Biochim Pol* **40**: 12-16
25. Shaikhin S, Sobkiewicz A, Barciszewski J, Twardowski T (1993) XXIX Zjazd P. T. BIOCH. Wrocław, Streszczenia Referatów i Komunikatów Zjazdowych VIP18, str. 310
26. Ramasamy R, Ranasinghe C (1993) *Indian J Med Res Section A-Infectious Diseases* **97**: 108-111
27. Vancamp G, Fierens H, Vandamme P, Goossens H, Huyghebaert A, Dewachter R (1993) *Syst Appl Microbiol* **16**: 30-36
28. Pahlson C, Mattsson JG, Larsson PG, Gersdorf H, Gobel UB, Forsum U, Johansson KE (1993) *APMIS* **100**: 655-662
29. Braunhowland EB, Danielsen SA, Nierzwickbauer SA (1992) *Biotechniques* **13**: 928
30. Lafontaine S, Egerton JR, Rood JI (1993) *Vet Microbiol* **35**: 101-117
31. Zamecnik PC, Stephenson ML (1978) *Proc Nat Acad Sci USA* **75**: 280-284
32. Balboni PG, Bozzini R, Zucchini S, Marconi PC, Grossi MP, Caputo A, Manservigi R, Barban-ti-Brodano G (1993) W: Abstract Book of Sixth European Congress on Biotechnology, Firenze, t. 4, TH013
33. Palu G, Biasolo MA, Parolin C, Haseltine WA (1993) W: Abstract Book of Sixth European Congress on Biotechnology, Firenze, t. 4, TH012
34. Strickland S, Huarte J, Belin D, Vassalli A, Rickles RJ, Vassalli JD (1988) *Science* **241**: 680-684
35. Usman N, Cedergren R (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 334-339
36. Heidenreich O, Pieken W, Eckstein F (1993) *FASEB J* **7**: 90-96
37. Crooke ST, Lebleu B (ed.) (1993) W: *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo

## Transkrypcja chemicznie zmodyfikowanego DNA

### Transcription of chemically modified DNA

MAREK GNIAZDOWSKI\*

#### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Chemiczna modyfikacja DNA
  - II-1. Specyficzność wiązania
  - II-2. Struktura przestrzenna układu addukt-DNA
- III. Wpływ adduktów na syntezę RNA
  - III-1. Inhibicja całkowitej syntezy RNA
  - III-2. Wierność transkrypcji
  - III-3. Wiązanie polimerazy RNA ze zmodyfikowaną matrycą i inicjacja
  - III-4. Elongacja
- IV. Uwagi końcowe

#### Contents:

- I. Introduction
- II. Chemical modification of DNA
  - II-1. Specificity of binding
  - II-2. Steric structure of adduct-DNA system
- III. Effect of adducts on RNA synthesis *in vitro*
  - III-1. Inhibition of total RNA synthesis
  - III-2. Fidelity of transcription
  - III-3. Binding of RNA polymerase to modified template and initiation
  - III-4. Elongation
- IV. Concluding remarks

\* Prof. dr hab., Zakład Chemii Ogólnej, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna w Łodzi, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

Wykaz stosowanych skrótów: pz — pary zasad; w tekście addukty reagującego z DNA metabolitu benzo(a)pirenu, benzo(a)piren-9,10-epoksy-8,7-diolu określam nazwą macierzystego związku, w podobny sposób skracam nazwy innych adduktów.

# I. Wstęp

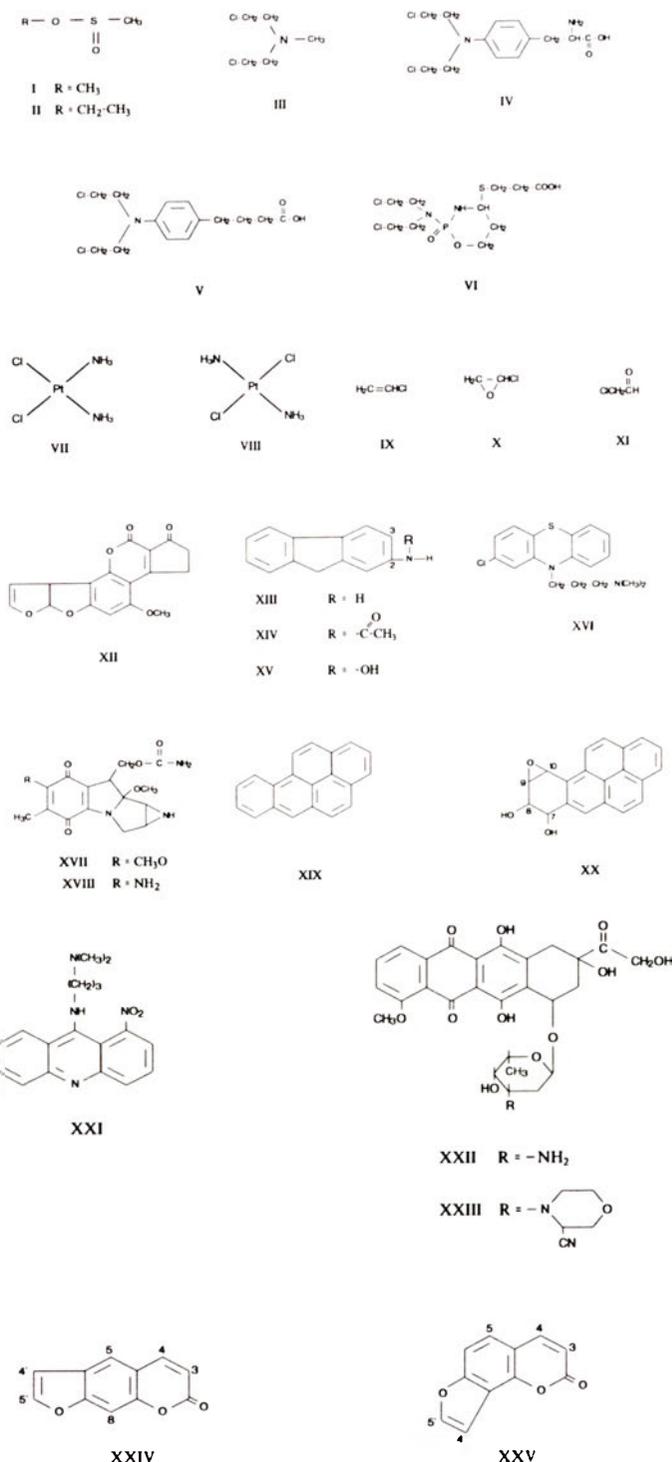
Aktywność biologiczna wielu kancerogenów i cytotatyków jest uwarunkowana ich kowalencyjnym wiązaniem z DNA [1, 2]. Często reakcje te można odtworzyć i badać w prostych układach bezkomórkowych. Jednym z nich jest układ zależnej od DNA polimerazy RNA [3-8]. Zaletą jego jest wysoki stopień wierności procesu transkrypcji. Wierność ta właściwa jest zwłaszcza układom prokariotycznym. I tak np. polimeraza RNA izolowana z *Escherichia coli* syntezuje wobec DNA faga T7 produkt odpowiadający RNA powstającemu w komórce bakteryjnej bezpośrednio po zakażeniu fagiem. Dzieje się tak dlatego, że enzym bakteryjny rozpoznaje promotory, „sensowną” nić fagowego DNA, kolejne zasady w trakcie elongacji łańcucha RNA i sygnały terminacji [3-8]. W artykule omawiam wpływ kowalencyjnych modyfikacji DNA, polegających na podstawieniu lub przyłączeniu drobnocząsteczkowych związków, na funkcję DNA jako matrycy. Badania zmodyfikowanego DNA pozwalają na lepsze poznanie z jednej strony oddziaływań enzym-matryca, z drugiej — natury samego uszkodzenia.

## II. Chemiczna modyfikacja DNA

Przegląd ograniczam do tych związków, których produkty reakcji z kwasami nukleinowymi były badane w układzie syntezy RNA *in vitro*. Są to substancje bardzo różne, poczynając od tak prostej jak *cis*-diaminodichloroplatyna(II) (*cis*-platyna), poprzez iperyt azotowy i inne leki dwualkilujące, wielopierścieniowe związki aromatyczne, z których najczęściej badane były przeciwluszczykowe pochodne furokumaryn, aż do silnych mutagenów i kancerogenów, jakimi są benzo(a)piren i 2-aminofluoren, czy chlorek winylu (Ryc. 1).

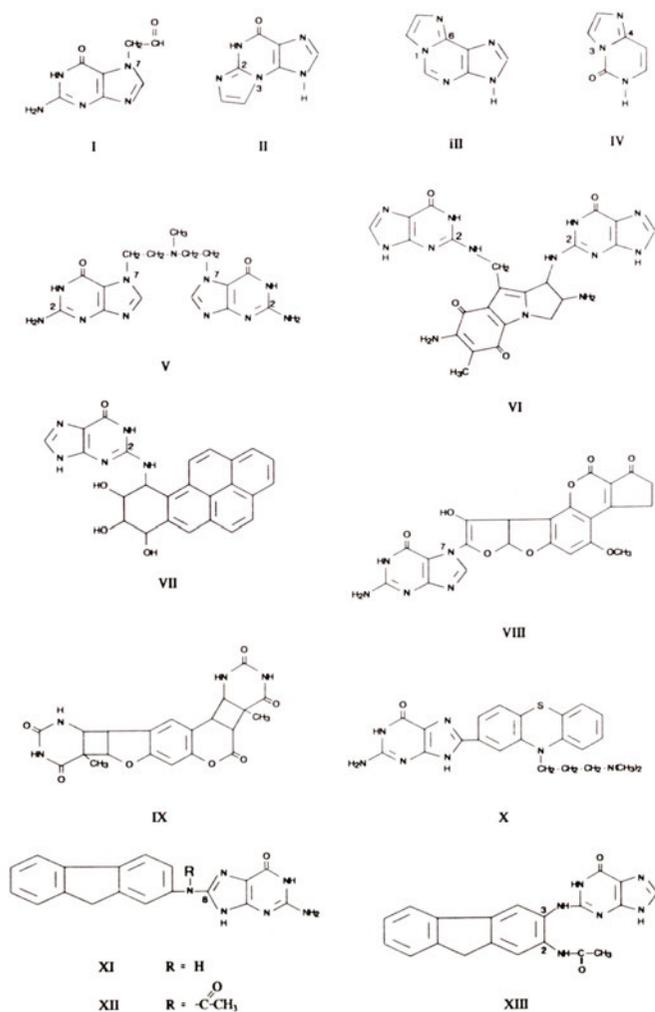
### II-1. Specyficzność wiązania

Wiele związków reaguje przede wszystkim z zasadami purynowymi kwasów nukleinowych, zwłaszcza guaniną, przy czym miejscem wiązania jest często pozycja N7. Te atomy azotu o wysokiej gęstości elektronicznej eksponowane do większej bruzdy DNA w konformacji B, reagują z czynnikami elektrofilowymi. N7 guaniny ulega reakcji z monoalkilującymi związkami, takimi jak metylo- czy etylometanosulfonian, i ze związkami dwualkilującymi, wywodzącymi się z iperytu [9-11]. Cechą tych ostatnich są dwie grupy chloroetylowe (Ryc. 1, 2). Z N7 guaniny jest również wiązana (Ryc. 1, 2) aktywowana przy udziale frakcji mikrosomalnej aflatoksyna B<sub>1</sub> [12, 13]. Atomy N7 puryn, najczęściej guaniny, są także miejscem wiązania atomu centralnego *cis*-platyny. Płaskokwadratowa struktura kompleksu warunkuje istnienie dwóch stereoizomerów: *cis*- i *trans*-platyny (Ryc. 1). Obydwa reagują z DNA, przy czym podstawieniu ulegają jeden



Ryc. 1. Struktury omawianych związków. I metylometanosulfonian; II etylometanosulfonian; związki dwualkylujące: III iperyt azotowy; IV mefalan; V chlorambucil; VI aktywowana pochodna cyklofosfamidu — 4,5-(propionowy kwas)-sulfidocyklofosfamid; VII *cis*-platyna; VIII *trans*-platyna; IX chlorek winylu i jego metabolity: X tlenek chloroetyleny i XI aldehyd chlorooctowy; XII aflatoksyna B<sub>1</sub>; XIII 2-aminofluoren; XIV N-acetylo-2-aminofluoren; XV N-hydroksy-2-aminofluoren; XVI chlorpromazyna; XVII mitomycyna A; XVIII mitomycyna C; XIX benzo(a)piren; XX benzo(a)piren-9,10-epoksy-8,7-diol; XXI nitrakryna; XXII adriamycyna (doksorubicyna); XXIII 3'-(3-cyano-4-morfolinylo)-3'-deamioadriamycyna; XXIV psoralen; XXV angelicyna.

lub dwa atomy chloru. Tylko jeden z izomerów, *cis*-platyna, okazał się użyteczny w terapii nowotworów [14-16].



Ryc. 2. Struktury niektórych adduktów.

I—IV addukty metabolitów chlorku winylu: I 7-(2-oksoetylo)guanina; II N2, 3-etenoguanina; III 1,N6-etenoadenina; IV 3,N4-etenocytozyna; V produkt alkilacji dwufunkcyjnej dwóch guanin iperytem azotowym; VI dwufunkcyjnie związana mitomycyna C; addukty benzo(a)pirenu (VII) i aflatoksyny B<sub>1</sub> (VIII) z guaniną; IX struktura jednego z fotoadduktów psoralenu z tyminami; X prawdopodobna struktura adduktu chlorpromazyny, na podstawie budowy produktu reakcji chlorpromazyny z GMP [19]; addukty 2-amino- (XI) i N-acetylo-2-aminofluorenu (XII) z C8 guaniny oraz N-acetylo-2-aminofluorenu z grupą NH<sub>2</sub> guaniny (XIII).

Pochodne 2-aminofluorenu tworzą podczas inkubacji z DNA dwa typy adduktów o strukturach identycznych ze strukturami adduktów wyodrębnionych z wątroby szczurów. Przeważa ilościowo produkt podstawienia na atomie C8 guaniny. Część kancerogenu wiąże się z grupą 2NH<sub>2</sub> zasady [17, 18]. Z C8 guaniny jest także wiązany lek antypsychotyczny, chlorpromazyna (Ryc. 1. 2) [19].

Mitomycyna C (aktywowana czynnikami redukcijnymi) wiąże się selektywnie z grupami 2NH<sub>2</sub> guaniny [4, 20, 21], dając dwa rodzaje monoadduktów oraz diaddukt (Ryc. 2). Głównym miejscem przyłączenia pochodnych benzo(a)pirenu do DNA jest również grupa 2NH<sub>2</sub> guaniny (Ryc. 2), rzadziej atom N7 puryny [22].

Preferencją w stosunku do puryn w reakcji redukcyjnego wiązania z DNA w obecności związków sulfhydrylowych charakteryzuje się nitrakryna (Ledarin) (Ryc. 1). Struktura powstającego adduktu nie jest znana [23, 24]. Adriamycyna (doksorubicyna, Ryc. 1) w obecności jonów Fe(III) tworzy nieodwracalne połączenie z DNA prawdopodobnie w wyniku katalitycznej redukcji ditiotretiolem [25]. W inny sposób reaguje z DNA bardzo aktywna biologicznie cyjanomorfolinowa (Ryc. 1) pochodna adriamycyny [26, 27]. Istotną rolę odgrywa tu podstawienie grupy cyjanowej. W obu przypadkach miejscem wiązania jest guanina. Struktura tych adduktów jest przedmiotem domysłów [26-29].

Oddziaływania furokumaryn z DNA są tematem szeregu artykułów przeglądowych [30-32], także na tych łamach [33]. Skondensowane pierścienie układu furokumaryny są ułożone liniowo (psoralen) lub kątowo (angelicyna) (Ryc. 1). Pochodne psoralenu reagują z DNA tworząc pod wpływem naświetlania w zakresie 320-400 nm monoaddukty. Wiązanie następuje przez układ cyklobutanowy między atomami węgla 4' i 5' w pierścieniu furanowym lub 3 i 4 w pierścieniu pironowym a atomami 5 i 6 zasady pirymidynowej, najczęściej tyminy. Monoaddukt utworzony wzdłuż krawędzi furanu może być przekształcony w wyniku dalszego naświetlania w diaddukt (Ryc. 2) poprzez cykloaddycję między pierścieniem pironowym a pirymidyną (tyminą) w komplementarnej nici DNA [30-33].

Właściwości matrycowe DNA ulegają modyfikacji pod wpływem chlorku winylu, a właściwie jego metabolitów (Ryc. 1), tlenku chloroetyleny i aldehydu chlorooctowego [34]. W wyniku ich reakcji z kwasami nukleinowymi powstają produkty podstawienia na atomie N7 guaniny oraz pochodne zasad określane jako „eteno”, których wspólną cechą jest dodatkowy układ pierścieniowy (Ryc. 2). O tworzeniu adduktu decyduje nie tylko specyficzność reakcji w stosunku do danej zasady, lecz także otoczenie reagującej zasady. Ten kontekst sekwencyjny to także jeden z celów badań transkrypcji zmodyfikowanej matrycy (por. III-2,4).

## II-2. Struktura przestrzenna układu addukt-DNA

Ułożenie wielopierścieniowego fragmentu adduktu w stosunku do heliksu może mieć znaczenie dla właściwości DNA. Cykliczne układy mitomycyny C [35], benzo(a)pirenu [22] czy 2-aminofluorenu [18], jeśli ten ostatni związany jest z grupą aminową guaniny, leżą w mniejszej bruzdzie heliksu nie wywołując większych zmian konformacyjnych. Związany kowalencyjnie pierścień psoralenu jest interkalowany między sąsiadujące pary zasad [30-33] i także nie powoduje destabilizacji wiązań między komplementarnymi zasadami. Jeśli natomiast acetyloaminofluoren połączony jest z C8 pierścienia guaniny, następują znaczne

zmiany konformacyjne [36]. Podstawiona reszta guaniny w formie *syn* jest „wynicowana” na zewnątrz heliksu podczas gdy układ pierścieniowy kancerogenu jest wsunięty w strukturę dwuniciową (“*insertion-denaturation model*”). Struktura taka może przyjmować konformację Z [37, 38]. Bichara i Fuchs [39] podkreślają różnicę między dwoma skądinąd bardzo bliskimi sobie adduktami. Jeśli bowiem z DNA związana jest reszta aminofluorenu (brak grupy N-acetylowej), to denaturacja DNA nie następuje, a wielopierścieniowy addukt leży w węższej bruzdzie DNA w niewielkim stopniu zmieniając przestrzenną strukturę heliksu.

Spośród wielu rodzajów wiązania cisplatyny z DNA, szczególną uwagę przyciąga ten, w którym atom centralny kompleksu spina dwie sąsiednie puryny w tej samej nici DNA poprzez atomy N7. Ten typ wiązania jest charakterystyczny dla izomeru *cis*, a nie występuje wśród produktów reakcji izomeru *trans* [14-16]. Izomer *trans* ze względu na odległości między centrami reaktywnymi cząsteczki (Ryc. 1) może natomiast wiązać dwie puryny w tym samym łańcuchu przedzielone trzecią zasadą, najczęściej pirymidynową (por. III-4). Wewnątrznicowe wiązanie cisplatyny powoduje zaburzenie struktury DNA, lokalne zerwanie wiązań wodorowych i zagięcie heliksu [15].

Alkilacja zasad może zwiększać tendencję do przyjmowania przez DNA struktury Z [40]. Związki, które mogą reagować z DNA dwufunkcyjnie: iperyty i inne leki dialkilujące [10], pochodne psoralenu [30-33], mitomycyna C [20, 21], cisplatyna [14-16] cyjanomorfolinoadriamycyna [27] oraz w pewnym stopniu nitrakryna [24] tworzą wiązania międzynicowe stabilizujące heliks. W przeciwieństwie do psoralenów, angelicyny ze względu na kątowe ułożenie pierścieni (Ryc. 1), tworzą wyłącznie monoaddukty [31, 33].

### III. Wpływ adduktów na syntezę RNA

Badania substancji wiążących się kowalencyjnie z DNA w układzie syntezy RNA obejmują oznaczanie całkowitej syntezy RNA na zmodyfikowanej matrycy, określanie ich wpływu na wiązanie polimerazy RNA z DNA, na inicjację łańcuchów polinukleotydowych i na elongację.

#### III-1. Inhibicja całkowitej syntezy RNA

Najłatwiej uchwytną konsekwencją chemicznej modyfikacji DNA jest obniżenie jego aktywności matrycowej, czyli zmniejszenie całkowitej ilości syntezowanego RNA. Zależność między procentowym obniżeniem syntezy RNA, a liczbą adduktów na matrycy przedstawiona na wykresie logarytmicznym stanowi w wielu przypadkach linię prostą. Może to być przydatne dla oznaczenia liczby adduktów, gdy brak innej metody pomiaru. Kompilacja danych pochodzących z kilku pracowni (Gniazdowski, Cera, w przy-

gotowaniu) wykazała, że pomiary aktywności matrycowej dokonywane w różnych warunkach (różne typy matryc, polimerazy RNA z różnych źródeł) dają podobne wartości. W przypadku wielopierścieniowych adduktów 8-metoksypsoralenu, 4,5-dimetyloangelicyny [41, 42], benzo(a)pirenu [43], pochodnych 2-aminofluorenu [43, 44] i nitrakryny [45] obserwowano zahamowanie syntezy RNA do 50% przy liczbie adduktów wynoszącej 0,2-0,8 na  $10^3$  pz DNA. Czynnikiem mogącym wpływać na wyniki pomiarów aktywności jest długość transkryptu [46].

Prostsze związki alkilujące w mniejszym stopniu hamują syntezę RNA. 50% hamowania obserwowano przy 1,6 cząsteczek iperytu azotowego przypadających na  $10^3$  pz DNA faga T7 [47]. Działanie czynników monoalkilujących: dimetylosiarczanu i metylo- lub etylometanosulfonianu daje analogiczny efekt dopiero przy 14 alkilowanych zasadach na  $10^3$  pz [48].

Obniżenie aktywności matrycowej może wskazać na powstawanie adduktów, a badanie krzywej inhibicji w zależności od gęstości adduktów, potwierdzić ich różnice strukturalne [43]. Zmniejszenie aktywności bakteryjnej polimerazy RNA w obecności poli (dI-dC) uprzednio traktowanego aflatoksyną B1 stało się przesłanką wskazującą na wiązanie tego kancerogenu z resztami cytozyny [49, 50].

Kowalencyjnie związane ligandy wywierają o wiele większy efekt na syntezę RNA niż ligandy oddziaływujące z DNA niekowalencyjnie. I tak np. niekowalencyjnie choć silnie wiążące się bis- i trisakrydiny hamowały syntezę RNA przy stosunku molowym ligand/DNA: 120/ $10^3$  pz [51].

#### III-2. Wierność transkrypcji

Wiele zmian właściwości matrycowych DNA jest w jakimś sensie naruszeniem wierności transkrypcji. W tym miejscu ograniczam się do dwóch jej aspektów: wyboru przez enzym właściwej nici heliksu i właściwości kodujących zmodyfikowanych zasad.

Pierwszym zagadnieniem zajęły się w zapomnianych obecnie badaniach Boulé-Charest i Marmet-Bratley. Autorki stwierdziły, że przy stopniu inhibicji odpowiadającym wiązaniu 4 cząsteczek iperytu azotowego na  $10^3$  pz, powstający RNA jest nadal komplementarny, podobnie jak w kontroli, do jednej tylko nici DNA faga T7 [52].

Właściwości kodujące zmodyfikowanych zasad były badane z zastosowaniem tak polimeraz DNA jak i polimeraz RNA. Zdaniem Singer polimerazy RNA mają tę przewagę, że pozbawione są gmatwającej wyniki aktywności „korygującej” właściwej polimerazie DNA I [53]. Niektóre modyfikacje DNA jak podstawienie guaniny w pozycji 7 resztą 2-oksoetylową, pochodzącą z metabolitu chlorku winylu, tlenku chloroetyleny [54] hamują transkrypcję nie zmieniając właściwości kodujących zasady. Metylacja 04 tyminy lub 06 guaniny zwiększa wydatnie prawdopodobień-

stwo błędnego kodowania [54]. 8-Hydroksyguanina produkt uszkodzeń DNA rodnikami tlenowymi koduje zarówno cytozynę jak i adeninę [55]. Również reakcje cykloaddycji metabolitów chlorku winylu (Ryc. 2) z adeniną, guaniną lub cytozyną prowadzące do pochodnych etenowych dają matryce o zmienionych właściwościach kodujących. I tak np. stwierdzono, że prawdopodobieństwo kodowania uracylu przez etenocytozynę wynosi 33% [34]. Etenoguanina występująca w strukturze poli C powoduje wbudowywanie obok cytozyny także adeniny i uracylu [56]. Właściwości kodujące zmodyfikowanej zasady zależą od jej otoczenia. Ta sama etenoguanina jako przerywnik w strukturze poli A jest odczytywana przez polimerazę RNA jak adenina jeśli odpowiedni substrat, CTP, nie występuje w nadmiarze [57].

### III-3. Wiązanie polimerazy RNA ze zmodyfikowaną matrycą i inicjacja

Specyficzność transkrypcji zależy od znalezienia przez enzym rejonu promotora i rozpoczęcia od niego syntezy RNA. Wiązanie enzymu ze zmodyfikowaną matrycą było badane stosunkowo rzadko. Wynikało to prawdopodobnie z założenia, że przy gęstości adduktów nie przekraczającej na ogół jednej cząsteczki na  $10^2$  pz, prawdopodobieństwo uchwytynych doświadczalnie zmian w obrębie promotora, jest niewielkie. Nie stwierdzono dużych różnic w wiązaniu przez enzym z DNA faga T7 zawierającego 40 reszt nitrakryny lub 12 reszt 8-metoksypsoralenu na  $10^3$  pz i wiązaniu DNA kontrolnego [58]. W przypadku DNA zmodyfikowanego nitrakryną, kompleks enzym-matryca był bardziej wrażliwy na podwyższoną siłę jonową [58, 59]. Metylacja zasad DNA grasicy cielecej do poziomu 5% nie zmniejszała wiązania polimerazy [60].

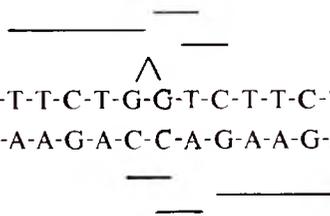
Badania inicjacji przemawiają za tym, że modyfikacje chemiczne zmieniają oddziaływania polimerazy RNA z promotorem. Badania te polegają na oznaczeniu liczby inicjowanych łańcuchów RNA lub badaniu inicjacji poronnej. W pierwszym przypadku używane są jako substraty ATP i/lub GTP znakowane  $^{32}\text{P}$  w pozycji  $\gamma$ , ponieważ łańcuchy RNA z reguły rozpoczynają się od nukleotydów purynowych a  $\gamma$  i  $\beta$   $^{32}\text{P}$  pozostają na końcu 5' pierwotnego transkryptu. Jeśli w doświadczeniach jest także substrat, o znakowanej zasadzie, to można obliczyć średnią długość syntezy łańcuchów [2, 44, 59]. Poronna inicjacja polega na powtarzającej się syntezie oligonukleotydów przez enzym związany z promotorem. Można ją badać pomijając niektóre substraty w mieszaninie reakcyjnej. Długość produktu jest wyznaczona przez pojawienie się na kodującej nici zasady komplementarnej względem brakującego nukleozydotrifosforanu. I tak np. polimeraza *E. coli* w obecności tylko ATP i UTP syntezuje pppApU na promotorach A1 i A3 DNA faga T7. Niekiedy wyznacza się miejsce startu na matrycy poprzez dodanie do mieszaniny reakcyjnej odpowied-

niego komplementarnego dinukleotydu [8].

Synteza pppApU na DNA faga T7 jest hamowana w zbliżonym stopniu przez 8-metoksypsoralen i pochodne angelicyny [42, 58, 61]. Efekt inhibicyjny jest znacznie mniejszy niż hamowanie całkowitej syntezy RNA. Jest to zrozumiałe bowiem inicjacja następuje na krótkim odcinku DNA, podczas gdy w fazie elongacji prawdopodobieństwo natknięcia się na addukt jest odpowiednio większe. Tworzenie adduktu w miejscach startu promotorów A1 i A3, w których następuje synteza pppApU (ApT) jest mało prawdopodobne. 8-Metoksypsoralen wiąże się z tą sekwencją stosunkowo rzadko [62, 63]. Za inhibicję może być więc odpowiedzialny addukt oddalony o kilka par zasad.

Jeśli porównywano inkorporację  $\gamma$   $^{32}\text{P}$ -ATP lub GTP i całkowitą syntezę RNA, z reguły bardziej hamowana była całkowita synteza RNA. Niewielkie zmiany lub brak zmian w liczbie inicjowanych łańcuchów obserwowano na metylowanym DNA z *M. lysodeicticus* lub grasicy cielecej o trzykrotnie obniżonej aktywności matrycowej [60]. Nitrakryna hamuje w większym stopniu syntezę łańcuchów rozpoczynających się od GTP niż od ATP [59]. W przypadku benzo(a)pirenu [43] i, w mniejszym stopniu, w przypadku acetylo-2-aminofluorenu [44] obserwowano wzrost liczby inicjowanych łańcuchów, gdy całkowita synteza RNA była zahamowana do kilkunastu procent. Jeżeli w badaniach użyto matryce konstruowane w taki sposób, że addukty benzo(a)pirenu były związane asymetrycznie z kodującą albo niekodującą nicią, wzrost szybkości inicjacji był obserwowany tylko w pierwszym przypadku [64].

Wzrost szybkości inicjacji można wyjaśnić w dwójaki sposób: 1° enzym szybciej, niż w przypadku niezamodyfikowanej matrycy, kończy syntezę łańcucha napotykać addukt, dysocjuje, powraca do miejsca startu i reinicjuje następny łańcuch; 2° zmiany konformacyjne wywołane przez addukt w regionie promotora zwiększają prawdopodobieństwo inicjacji. Ta druga hipoteza znajduje poparcie w doświadczeniach Corry i wsp. [65]. Badacze ci zsyntetyzowali dwa rodzaje dwuniciowych polinukleotydów, w których występowały jako powtarzające się motywy eikozanukleotydy różniące się jedynie w środku łańcucha. Jeden z nich miał jednostkę dinukleotydową d(GpG), drugi — jednostkę d(ApG), obydwa zawierały związane w centrum reszty cisplatyny (Ryc. 3). Stosując różne inicjujące dinukleotydy i odpowiednie substraty badano inicjację i transkrypcję na niciach zmodyfikowanych platyną i niciach komplementarnych. Wyniki otrzymane z polimerazą *E. coli* i polimerazą II z zarodków pszenicy oraz obydwoma wariantami, d(GpG) i d(ApA), były podobne [65]. Enzym mógł inicjować w bardzo ograniczonym stopniu transkrypcję, jeśli miejsce startu nakładało się częściowo na miejsce wiązania platyny lub znajdowało się przed adduktem (Ryc. 3). Warto przypomnieć, że w miejscu dwufunkcyjnie związanej z sąsiednimi zasadami platyny na-



**Ryc. 3.** Powtarzająca się sekwencja w polinukleotydzie w doświadczeniach z cisplatyną [65, 66].  
 Badano dwa warianty: z d(GpG) (na rycinie) lub z d(ApG) w środku sekwencji w układzie z polimerazą *E. coli* lub polimerazą izolowaną z zarodków pszenicy. Cisplatyna była związana ze środkowym dinukleotydem jak wskazano ( $\Delta$ ). W poszczególnych doświadczeniach dinukleotydy komplementarne do nici platynowanej lub dolnej wyznaczały inicjację w kierunku wskazanym strzałkami, a długość transkryptu wyznaczona była poprzez odpowiedni zestaw substratów. Jeśli np. zastosowano UTP i GpG następowała synteza trinukleotydu na nici dolnej.

stępuje rozerwanie wiązań wodorowych i rozwinięcie heliksu [15]. Stąd zapewne na nici komplementarnej zaobserwowano wzrost inicjacji [65]. Dalsze badania wykazały, że wiązanie polimerazy bakteryjnej z polinukleotydem zawierającym sekwencję d(ApG)-Pt w centrum powtarzającego się motywu nie ulega zmianom. Natomiast  $K_m$  enzymu dla wariantu d(GpG) zawierającego addukt jest 4-5 razy wyższa niż dla polinukleotydu niezmodyfikowanego [66]. Oznacza to, że enzym w różny sposób oddziałuje z tymi dwoma rodzajami adduktów.

Doświadczenia te były pierwszymi, w których badano wiązanie enzymu i inicjację za pomocą matrycy, na której addukt był umieszczony tak precyzyjnie [65, 66]. Obecny stan techniki syntezy polinukleotydów pozwala spodziewać się podobnych badań z innymi adduktami.

### III-4. Elongacja

W wielu pracowniach stwierdzono, że najbardziej widoczną konsekwencją obecności adduktów w matrycy jest powstawanie krótszych łańcuchów RNA. Zaobserwowano to w przypadku pochodnych amino-fluorenu [44], nitrakryny [59], benzo(a)pirenu [67], 8-metoksypsoralenu [58] i metylowanego DNA [60]. Wyniki te nasunęły dalsze pytania: Czy każda cząsteczka adduktu blokuje elongację, czy też enzym może niekiedy ją ominąć? Czy addukty hamują syntezę RNA jedynie wówczas gdy znajdują się na transkrybowanej nici? Czy są różnice między mono- i diadduktami w efektywności przerywania syntezy? W jakiej odległości od adduktu enzym przerywa syntezę łańcucha polinukleotydowego? Czy mechanizm blokowania enzymu zależy od wielkości cząsteczki enzymu, struktury wyższych rzędów lub pochodzenia? Czy enzym w nie-naturalnym miejscu terminacji pozostaje zablokowany w kompleksie trójskładnikowym matryca-polimeraza-nowosyntetyzowany RNA, czy też kompleks ten ulega dysocjacji i enzym może ponownie reinicjować

syntezę?

Porównanie adduktów benzo(a)pirenu, acetylo-2-aminofluorenu i 2-aminofluorenu wykazało, że wszystkie trzy kancerogeny blokują w określonych miejscach syntezę łańcuchów [43]. Liczba tych miejsc w przypadku benzo(a)pirenu odpowiadała gęstości rozłożenia adduktów. Natomiast reszty amino-fluorenu, a w mniejszym stopniu silnie zaburzającego strukturę DNA acetyloaminofluorenu (por. II-2) mogą być omijane przez polimerazę faga T7 [43], przy czym enzym bezbłędnie odczytuje zmodyfikowaną guaninę wstawiając w transkrypcie cytozynę [55]. Dodajmy, że polimeraza III z oocytów *Xenopus laevis* jest blokowana przez te addukty [68].

Zastosowanie matryc, w której jedna tylko nie — transkrybowana albo nietranskrybowana, była obciążona benzo(a)pirenem pozwoliło na stwierdzenie, że addukty blokują elongację przede wszystkim wtedy, gdy związane są z nicią kodującą. Stwierdzono to zarówno z polimerazą faga T7 [64], jak i w bardziej złożonym układzie z polimerazą III [68]. Gdy użyto matrycę ze zmodyfikowaną nicią nietranskrybowaną obserwowano niewielki wzrost terminacji w stosunku do nie modyfikowanego DNA [64]. Nath i Romana tłumaczą to raczej wpływem adduktów na rozwijanie heliksu, zwolnieniem elongacji i pauzą w syntezie niż jej przerywaniem. Podobne wnioski wysnuto z doświadczeń, w których 4'-hydroksymetylo-4,5', 8-trimetylopsoralen związany był z jedną nicią [69].

Ostatnio porównano transkrypcję polinukleotydów, w których dwie guaniny w tej samej nici spięte były cis- lub transplatyną [70]. W przypadku cisplatyny była to sekwencja d(GpG) (por. Ryc. 3) lub wariant tego polinukleotydu z sekwencją d(GpTpG) centrum powtarzalnego motywu. W przypadku transplatyny możliwe jest utworzenie diadduktu wewnątrznicowego tylko w sekwencji d(GpTpG) (por. II-1). Wykazano, że cisplatyna zarówno związana z sąsiadującymi guaninami jak i z sekwencją d(GpTpG) na nici transkrybowanej stanowi dla enzymu nieprzekraczalną barierę, transplatyna, natomiast, nie [70]. Analizując transkrypcję produktów reakcji cis- i transplatyny wykazano jeszcze jedną różnicę między nimi. Wiązania międzynicowe cisplatyny występują między guaninami w komplementarnych sekwencjach d(GpC), nie obserwuje się ich w sekwencjach d(CpG) [71] natomiast nieaktywny stereoizomer tworzy wiązania dwufunkcyjne łącząc komplementarną parę dG·dC [72]. Monoaddukty cisplatyny mogą być omijane przez polimerazę [70].

Decuypier i wsp. [73], Shi i wsp. [69] badali odległość między miejscem terminacji łańcucha od adduktu furokumaryny. Analizowano RNA syntetyzowany na SV40 DNA, zawierającym zależnie od warunków naświetlenia minimalną albo maksymalną ilość diadduktów. Porównanie sekwencji transkryptu z potencjalnymi miejscami wiązania psoralenu wskazywało na to, że synteza RNA zatrzymywana jest

w odległości dwóch zasad zarówno przed monoadduktem, jak i diadduktem [73]. W pracowni H e a r s t a zastosowano syntetyczne polinukleotydy zawierające mono- lub diaddukt wstawiony 30 zasad poniżej miejsca startu. Jest ono na tyle odległe od adduktu, że transkrybujący enzym opuszcza promotor, przesuwając się wzdłuż matrycy, oddysocjowuje podjednostkę sigma i ulega przekształceniu w formę charakterystyczną dla kompleksu elongacyjnego. Analiza transkryptu wykazała, że polimeraza kończy łańcuch RNA nukleotydem kodowanym bezpośrednio przed monoadduktem lub przed wiązaniem międzyniciowym. Enzym pozostaje zablokowany w kompleksie z DNA i RNA [69]. Identyczne wyniki otrzymano z polimerazą faga T7 [74].

Badania z polimerazą *E. coli* na DNA modyfikowanym mitomycyną C wykazały, że wiele łańcuchów RNA ulega terminacji jedną zasadę przed tą, która jest kodowana przez guaninę. W łańcuchu RNA oznacza to przerwanie syntezy na X w sekwencji XpC [75]. W tej samej pracy wykazano, że terminacja łańcuchów RNA przez adriamycynę w obecności jonów Fe(II) lub Fe(III), jest bardziej selektywna. Następuje ona bowiem na reszcie guaniny poprzedzającej resztę cytozyny w łańcuchu RNA. Świadczy to o powstawaniu specyficznych adduktów, być może wiązań międzyniciowych, nie wykrywanych innymi metodami [25, 75]. Cyjanomorfolinoadriamycyna (Ryc. 1) reagująca z DNA w odmienny sposób [26, 27] powoduje blokowanie transkrypcji na sekwencjach CpC i GpG, a także na sekwencji GpC [28, 29]. Blokowanie na tej ostatniej może odpowiadać wiązaniom międzyniciowym. Natomiast bloki na sekwencjach CpC i GpG mogą zależeć od diadduktów wewnątrznicowych. Jeśli reszty cytozyny nie ulegają modyfikacji to zablokowanie transkrypcji przy dwóch kolejnych guaninach na nici nie-transkrybowanej oznacza, że w tym przypadku diaddukt na tej nici również blokuje syntezę RNA [29]. W badaniach Philipsa i w s p. [75] mitomycyna C hamuje transkrypcję, jak się wydaje, niezależnie od tego czy są to międzyniciowe diaddukty czy monoaddukty na nici transkrybowanej.

Istnieją wyniki wskazujące na to, że efekty adduktów zależą od rodzaju enzymu. Polimeraza faga SP6 była blokowana przez dwufunkcyjnie związaną mitomycyną A na 3-4 zasady przed wiązaniem międzyniciowym. Natomiast wiele monoadduktów było omijanych przez ten enzym i powstawał transkrypt o długości takiej jak na DNA nie modyfikowanym (C e r a i C r o t h e r s maszynopis).

Badania związków dwualkilujących: iperytu azotowego, mefalanu, chlorambucilu i pochodnej cyklofosfamidu (Ryc. 1) wykazały, że tylko trzy pierwsze powodowały zahamowanie syntezy RNA przez polimerazy faga T7 lub SP6 w określonych miejscach. Miejsca te nie zawsze pokrywały się z charakterystycznymi miejscami alkilacji matrycy, jakimi są reszty guaniny [76]. Dalsze badania w tej pracowni do-

prowadziły do wniosków, że uszkodzeniami matrycy prowadzącymi do zatrzymania transkrypcji są, w przypadku iperytu azotowego, wiązania dwufunkcyjne między sąsiadującymi guaninami w tej samej nici. W przypadku mefalanu i chloroambucilu są to raczej wiązania między kolejnymi adeninami [77]. Warto wspomnieć, że rolę dwufunkcyjnych wiązań w obrębie tej samej nici DNA w hamowaniu syntezy RNA przez iperyty podkreślały już D e g r é - C o u v e i M a m e t - B r a t l e y [47]. Analiza terminacji przy wysokich stężeniach iperytu azotowego wskazuje [78], że enzym bakteryjny przerywa syntezę jedną zasadą przed dwoma kolejnymi guaninami, lecz także, w przeciwieństwie do wyników P i e p e r a i w s p. [76, 77], przed pojedynczo występującymi guaninami. Niektóre z tych ostatnich miejsc terminacji ze względu na bliskość drugiej guaniny w nici komplementarnej mogą odpowiadać wiązaniom międzyniciowym [78].

Polimeraza RNA zatrzymana przez psoralen pozostaje w kompleksie złożonym z enzymu, matrycy i nowosyntezowanego RNA [69, 74]. Architektura takiego zamrożonego przez addukt kompleksu elongacyjnego była przedmiotem badań [74, 79, 80], a ich wyniki były niedawno omówione [33]. Warto to omówienie uzupełnić o nowsze publikacje [81, 82]. Badania kompleksu polimerazy T7 z polinukleotydem o długości 66 pz i mostkiem psoralenowym w pozycji +36/+37 licząc od miejsca startu wykazały, że zatrzymany przez diaddukt enzym jest mocno związany z niekodującą nicią DNA, a powstający łańcuch RNA tworzy z transkrybowaną nicią hybryd o długości 7 pz [81]. Z tego trójskładnikowego kompleksu można oddysocjować RNA działaniem heparyny uzyskując trwałe kompleksy „quasi elongacyjny” [81]. Trwałość wiązania enzymu ze zmodyfikowanym DNA [74, 79, 81, 82] stanowi potwierdzenie innych danych wskazujących na to, że polimeraza napotykać na addukty tworzone przez acetyloaminofluoren [44], benzo(a)piren [67], pochodne psoralenu lub angelicyny [42] jest zatrzymana. Trwałość tego wiązania w miejscu modyfikacji jest różna dla różnych adduktów. Zwiększenie bowiem liczby inicjowanych łańcuchów na DNA zmodyfikowanym przez benzo(a)piren [43, 64] świadczy o tym, że w przypadku tego adduktu enzym może dysocjować i rozpoczynać następną rundę.

W niektórych pracowniach stwierdzono, że monoaddukty: pochodne promazyny [73], monofunkcyjnie związana mitomycyna (C e r a i C r o t h e r s, maszynopis), benzo(a)piren [46], czy aminofluoren [55] nie zawsze blokują elongację. Obserwuje się to na ogół z niewielką, bo o masie  $10^5$  daltonów, polimerazą T7 lub SP6 [46, 55], rzadziej z multimerycznym enzymem bakteryjnym lub eukariotycznym [55, 68, 73]. W większości przypadków duże addukty powodują terminację. Trudno powiedzieć w jakim stopniu zależy to od struktury adduktu, w jakim od „kontekstu” zasad. Polimeraza może natomiast często ominąć proste reszty mono i dialkilowe na DNA [78].

## IV. Uwagi końcowe

Większość kowalencyjnych modyfikacji DNA blokuje elongację. Stwierdzono to dla monoadduktów na nici transkrybowanej i wiążących dwie nici diadduktów psoralenu. Mechanizm blokowania przez te uszkodzenia może być różny [69]. Monoaddukt znosi właściwości kodujące tyminy, natomiast diaddukt blokuje syntezę RNA poprzez uniemożliwienie rozdzielania komplementarnych nici. W niektórych przypadkach przypuszcza się, że enzym może ominąć uszkodzenie, a także zmienić transkrybowaną nić [43], choć na to ostatnie brak jest dowodów. Inne zmiany w układzie transkrypcji to zaburzenia wiązania enzymu i inicjacji. Zaburzenia struktury DNA mogą zwiększyć liczbę inicjacji z pierwotnych promotorów, mogą też powodować powstanie nowych miejsc inicjacji. Łatwo wyobrazić sobie, że mostki międzynciowe inaktywują promotory. Modyfikacja zasad może zmieniać kodujące ich właściwości.

Badania zmodyfikowanych matryc pozwalają na poznawanie mechanizmów transkrypcji. Analiza oddziaływania enzymu w miejscach terminacji indukowanych przez psoralen [69, 74, 79, 81, 82] lub badania platynowanych polinukleotydów [65, 66] są tego najlepszymi przykładami. Transkrypcja służy wreszcie jako narzędzie wykrycia adduktów i określenia ich lokalizacji w DNA i tak jest stosowana w wielu ostatnio publikowanych pracach. Wyniki badań w których w prostych układach subcelularnych widzi się różnicę między lekiem a jego nieaktywnym analogiem lub stereozomerem [70] to szczególnie dar natury dla biologa molekularnego. Z drugiej strony nie sposób nie zauważyć, że leki przeciwnowotworowe i kancerogeny w opisywanym układzie niejednokrotnie zachowują się tak samo [25, 29, 49, 60, 70-72, 74-78, 83].

Obecny stan wiedzy pozwala na wysunięcie wielu nowych pytań i powtórzenie tych, na które dotychczas odpowiedzi są fragmentaryczne. Czy wierność transkrypcji jest zachowana, gdy enzym dochodzi do miejsca terminacji wyznaczonego przez addukt? Jeśli ma to miejsce to jak polimeraza omija addukt? Jakie są strukturalne cechy adduktów decydujące o wymuszonej terminacji? W przypadku powstawania więcej niż jednego typu adduktu nasuwa się pytanie o różnice mechanizmów inhibicji właściwe formom izomerycznym. Sądząc z ostatnich publikacji, a także nie publikowanych informacji, na wiele z tych pytań poszukuje się odpowiedzi.

### Podziękowanie

Autor dziękuje Dr Cinzii Cera za zezwolenie na wykorzystanie jej niepublikowanych wyników i dyskusję przedstawionych zagadnień, Dr Ewie Ciesielskiej i Dr Leszkowi Szmigiero za cenne uwagi i pomoc w przygotowaniu rycin, Pani Elżbiecie Bentlejewskiej i Panu Jackowi Cieślakowi za cierpliwe przepisywanie tekstu i pomoc w uporządkowaniu biblio-

grafii. Część materiałów do publikacji była zebrana w trakcie pobytu na Uniwersytecie w Padwie w ramach programu TEMPUS (kontrakt nr IMG-PLT-0051-90).

Artykuł otrzymano 15 sierpnia 1993 r.  
Zaakceptowano do druku 9 grudnia 1993 r.

## Piśmiennictwo

1. Gale EF, Cundliffe E, Reynolds PE, Richmond MH, Waring MJ (1981) W: The molecular basis of antibiotic action, Wiley, New York, str. 258-401
2. Gniazdowski M (1985) *Post Biochem* 31: 53-86
3. Buchowicz J (1978) W: *Biologia Molekularna*. Geneza, przedmiot i perspektywy, PWN, Warszawa
4. Mazuś B (1979) *Post Biochem* 25: 501-531
5. Ślaska K (1980) *Post Biochem* 26: 161-182
6. Krawczyk Z (1982) *Post Biochem* 28: 465-486
7. Chamberlin M, Ryan T (1982) W: Boyer PB (red) *The Enzymes* 15, Academic Press, New York, str. 87-108
8. Mc Clure WR (1985) *Annu Rev Biochem* 54: 171-204
9. Richardson FC, Richardson KK (1990) *Mutat Res* 233: 127-138
10. Brookes P (1990) *Mutat Res* 233: 3-14
11. Lawley PD (1989) *Mutat Res* 213: 3-25
12. Wood ML, Lindsay JR, Garner RC (1988) *Cancer Res* 48: 5391-5396
13. Loechler EL, Teeter MM, Whitlow MD (1988) *J Biomol Struct Dyn* 5: 1237-1257
14. Rosenberg B (1978) *Biochimie* 60: 859-867
15. Pinto AL, Lippard SJ (1985) *Biochim Biophys Acta* 780: 167-180
16. Oliński R, Zastawny TH (1991) *Post Biochem* 37: 40-47
17. Beland FA, Poirier MC (1989) W: Sirica AE (red), *The pathobiology of neoplasia*, Plenum, New York, str. 57-80
18. Grunberger D, Santella RM (1983) W: *Genes and proteins in oncogenesis*, Academic Press, San Diego, str. 13-40
19. Ciulla TA, Epling GA, Kochevar IE (1986) *Photochem Photobiol* 43: 607-613
20. Tomasz M, Lipman R, Chowdary D, Pawlak J, Verdine GL, Nakanishi K (1987) *Science* 235: 1204-1208
21. Tomasz M, Lipman R, Mc Guinness BF, Nakanishi K (1988) *J Am Chem Soc* 110: 5892-5896
22. Harvey RG, Geacintov NE (1988) *Acc Chem Res* 21: 66-73
23. Gniazdowski M, Filipski J, Chorąży M (1979) W: Hahn FE (red) *Antibiotics* 5, Springer-Verlag, Berlin, str. 275-297
24. Gniazdowski M, Ciesielska E, Szmigiero L (1981) *Chem Biol Interact* 34: 355-366
25. Cullinane C, Phillips DR (1990) *Biochemistry* 29: 5638-5646
26. Acton EM, Tong GL, Mosher CW, Wolgemuth RL (1984) *J Med Chem* 27: 638-645
27. Jesson MI, Johnston JB, Robotham E, Begleiter A (1989) *Cancer Res* 49: 7031-7036
28. Cullinane C, Phillips DR (1991) *FEBS Letters* 293: 195-198
29. Cullinane C, Phillips DR (1992) *Biochemistry* 31: 9513-9519
30. Song PS, Tapley KJ Jr (1979) *Photochem Photobiol* 29: 1177-1197
31. Rodighiero G, Dall'Acqua F, Pathak MA (1984) W: Smith KC (red) *Topics in photomedicine*, Plenum, New York, str. 319-398
32. Hearst JE (1989) *Chem Res Toxicol* 2: 69-75
33. Czyż M (1989) *Post Biochem* 35: 591-608
34. Singer B, Spengler SJ, Kuśmierk JT (1988) W: Politzer PA, Martin F Jr (red) *Chemical carcinogenesis*, Elsevier, str. 188-207
35. Norman D, Live D, Sastry M, Lipman R, Hingerty BE, Tomasz M, Broyde S, Patel DJ (1990) *Biochemistry* 29: 2861-2875

36. Fuchs RPP, Lefevre JF, Pouyet J, Daune MP (1976) *Biochemistry* **15**: 3347-3351
37. Sage E, Leng M (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 4597-4601
38. Neidle S, Kuroda R, Broyde S, Hingerty BE, Levine RA, Miller DW, Evans FE (1984) *Nucl Acids Res* **12**: 8219-8233
39. Bichara M, Fuchs RPP (1985) *J Mol Biol* **183**: 341-351
40. Kłysik J (1985) *Post Biochem* **31**: 29-52
41. Gniazdowski M, Małagocka E, Wilmańska D, Tolwińska Z (1987) *Stud Biophys* **122**: 209-214
42. Czyż M, Piestrzeniewicz M, Gniazdowski M (1990) *Stud Biophys* **135**: 147-154
43. Nath ST, Lee MS, Romano LJ (1987) *Nucl Acids Res* **15**: 4257-4271
44. Millette RL, Fink LM (1975) *Biochemistry* **14**: 1426-1432
45. Szmigiero L, Gniazdowski M (1981) *Arzneim Forsch/Drug Res* **31** (II): 1875-1877
46. Thrall BD, Mann DB, Smerdon MJ, Springer DL (1992) *Carcinogenesis* **13**: 1529-1534
47. Degrè-Couve M, Mamet-Bratley MD (1973) *Eur J Biochem* **32**: 292-300
48. Mamet-Bratley MD (1971) *Biochim Biophys Acta* **247**: 233-242
49. Yu FL, Bender W, Wu Z (1991) *Mol Cell Biochem* **103**: 1-8
50. Yu FL, Bender W, Wu Z, Chang JCS (1991) *Carcinogenesis* **12**: 997-1002
51. Atwell GJ, Baguley BC, Wilmańska D, Denny WA (1986) *J Med Chem* **29**: 69-74
52. Boulé-Charest I, Mamet-Bratley MD (1972) *Biochim Biophys Acta* **277**: 276-279
53. Singer B (1982) *Biochimie* **64**: 599-601
54. Singer B, Kuśmierk JT (1982) *Ann Rev Biochem* **52**: 655-693
55. Chen YH, Bogenhagen DF (1993) *J Biol Chem* **268**: 5849-5855
56. Mroczkowska MM, Kuśmierk JT (1991) *Mutagenesis* **6**: 385-390
57. Mroczkowska MM, Kuśmierk JT (1993) *Z Naturforsch* **48c**: 63-67
58. Gniazdowski M, Czyż M, Wilmańska D, Studzian K, Frasunek M, Płucienniczak A, Szmigiero L (1988) *Biochim Biophys Acta* **950**: 346-353
59. Ślaska K, Szmigiero L, Jaros-Kamińska B, Ciesielska E, Gniazdowski M (1979) *Mol Pharmacol* **16**: 287-296
60. Kornprobst M, Ramstein J, Leng M (1971) *Eur J Biochem* **21**: 134-136
61. Czyż M, Piestrzeniewicz M, Wilmańska D, Studzian K, Szmigiero L, Gniazdowski M (1988) *Biochem Pharmacol* **37**: 1827-1828
62. Boyer S, Moustacchi E, Sage E (1988) *Biochemistry* **27**: 3011-3018
63. Sage E, Moustacchi E (1987) *Biochemistry* **26**: 3307-3314
64. Nath ST, Romano LJ (1991) *Carcinogenesis* **12**: 973-976
65. Corda Y, Job C, Anin MF, Leng M, Job D (1991) *Biochemistry* **30**: 222-230
66. Corda Y, Anin MF, Leng M, Job D (1992) *Biochemistry* **31**: 1904-1908
67. Leffler S, Pulkrabek P, Grunberger D, Weinstein IB (1977) *Biochemistry* **16**: 3133-3136
68. Chen YH, Matsumoto Y, Shibutani S, Bogenhagen DF (1991) *Biochemistry* **88**: 9583-9587
69. Shi Y, Gamper H, Hearst JE (1987) *Nucleic Acids Res* **15**: 6843-6854
70. Corda Y, Job C, Anin MF, Leng M, Job D (1993) *Biochemistry* **32**: 8582-8588
71. Lemaire MA, Schwartz A, Rahmouni AR, Leng M (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1982-1985
72. Brabec V, Leng M (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 5345-5349
73. Decuyper J, Piette J, Merville-Louis MP, van de Vorst A (1987) *Biochem Pharmacol* **36**: 1069-1076
74. Shi Y, Gamper H, Hearst JE (1988) *J Biol Chem* **263**: 527-534
75. Phillips DR, White RJ, Cullinane C (1989) *FEBS Letters* **246**: 233-240
76. Pieper RO, Futscher BW, Erickson LC (1989) *Carcinogenesis* **10**: 1307-1314
77. Pieper RO, Erickson LC (1990) *Carcinogenesis* **11**: 1739-1746
78. Gray PJ, Cullinane C, Phillips DR (1991) *Biochemistry* **30**: 8036-8040
79. Shi Y, Gamper H, van Houten B, Hearst JE (1988) *J Mol Biol* **199**: 277-293
80. Carpoussis AJ, Gralla JD (1985) *J Mol Biol* **183**: 165-177
81. Sastry SS, Hearst JE (1991) *J Mol Biol* **221**: 1091-1110
82. Sastry SS, Hearst JE (1991) *J Mol Biol* **221**: 1111-1125
83. Htun H, Johnston BH (1992) *Meth Enzymol* **212**: 272-294

**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**

# Molekularne podstawy mutagennego działania chlorku winylu

## Molecular basis of mutagenic activity of vinyl chloride

MAŁGORZATA M. MROCZKOWSKA-SŁUPSKA<sup>1</sup>,  
JAROSŁAW T. KUŚMIEREK<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Chlorek winylu — toksyczny czynnik środowiskowy
- II. Aktywacja metaboliczna chlorku winylu i detoksykacja jego metabolitów
- III. Reakcja metabolitów chlorku winylu z zasadami kwasów nukleinowych
- IV. Molekularna dozymetria adduktów chlorku winylu
- V. Mutagenność i kancerogenność tlenku chloroetylenu i aldehydu chloroocetowego
- VI. Właściwości kodujące adduktów
- VII. Reperacja adduktów

**Wykaz stosowanych skrótów:** chlorek winylu — VC; aldehyd chloroocetowy — CAA; tlenek chloroetylenu — CEO; 7-(2-oxoetylo)guanina — 7oeG; 3,N<sup>4</sup>-etenocytozyna — 3,N<sup>4</sup>εC; 3,N<sup>4</sup>-(N<sup>4</sup>-α-hydroksyetano)cytozyna — 3,N<sup>4</sup>εC · H<sub>2</sub>O; 1,N<sup>6</sup>etenoadenina — 1,N<sup>6</sup>εA; 1,N<sup>6</sup>-(N<sup>6</sup>-α-hydroksyetano)adenina — 1,N<sup>6</sup>εA · H<sub>2</sub>O; N<sup>2</sup>,3-etenoguanina — N<sup>2</sup>,3εG; 1,N<sup>2</sup>etenoguanina — 1,N<sup>2</sup>εG.

### I. Chlorek winylu — toksyczny czynnik środowiskowy

Chlorek winylu (VC-ang. *vinyl chloride*) jest powszechnie stosowanym związkiem chemicznym. Używa się go do produkcji polimerów i kopolimerów wykorzystywanych w przemyśle tworzyw sztucznych. W latach pięćdziesiątych rozpoczęto masową produkcję PCW i kopolimerów VC np. z chlorkiem winilidyny, co spowodowało olbrzymi wzrost produkcji chlorku winylu [1]. Roczna produkcja PCW na świecie przekroczyła w 1988 r. 18 milionów ton [2] w Polsce w 1990 r. wyprodukowano około 200 000 ton PCW [3].

VC należy do rodziny halogenowych pochodnych etylenowych. Jest gazem o przyjemnej woni i w niewielkich stężeniach wywołuje euforię oraz stan przypominający upojenie alkoholowe. W wyższych stężeniach doprowadza do snu narkotycznego, dawniej wykorzystywano go do znieczulenia ogólnego [4]. W zatruciach ostrych wywołuje zaburzenia czynności układu nerwowego: oszołomienie, bóle, zawroty głowy i zaburzenia widzenia. U ludzi narażonych na długotrwałe działanie chlorku winylu stwierdzono zmiany naczyniowe i kostne, charakteryzujące się brakiem

### Contents:

- I. Vinyl chloride — a toxic environmental agent
- II. Metabolic activation of vinyl chloride and detoxication of its metabolites
- III. Reactivity of vinyl chloride metabolites towards nucleic acid bases
- IV. Molecular dosimetry of vinyl chloride adducts
- V. Mutagenicity and carcinogenicity of chloroethylene oxide and chloroacetaldehyde
- VI. Miscoding properties of adducts
- VII. Repair of adducts

czucia w palcach dłoni i stóp, nadwrażliwością na zimno oraz degeneracją końcowych odcinków kości palców [5].

Dobrze udokumentowany jest również związek pomiędzy długotrwałą ekspozycją na VC, a powstawaniem nowotworów u ludzi [1]. W badaniach dotyczących śmiertelności w latach 1940-1974 wśród pracowników zakładów produkcyjnych VC w Wielkiej Brytanii, stwierdzono statystycznie znaczący wzrost śmiertelności z powodu raka wątroby [6]. Podobne badania przeprowadzone w byłym Związku Radzieckim również wykazały związek pomiędzy ekspozycją na VC pracowników przemysłu chemicznego, a wzrostem śmiertelności spowodowanej nowotworami [7]. O zagrożeniu raktworczymi skutkami działania VC szerszej populacji ludzi nie tylko związanych z produkcją VC lub jego polimerów, świadczy fakt, że jest on znajdowany w produktach spożywczych pakowanych w tworzywa zawierające PCW [8].

Niezależnie od badań epidemiologicznych prowadzone są intensywne badania nad mechanizmami kancerogennego i mutagennego działania VC i jego metabolitów. Badania te dotyczą aktywacji metabolicznej VC, specyficzności mutacyjnej jego metabolitów, molekularnej dozymetrii adduktów VC do zasad DNA, identyfikacji tych adduktów, właściwości kodujących adduktów oraz ich reperacji.

### II. Aktywacja metaboliczna chlorku winylu i detoksykacja jego metabolitów

Chlorek winylu metabolizowany jest w wątrobie przy udziale cytochromu P450 II E 1. Enzymy cytochromu P450 katalizują utlenianie wielu czynników egzogennych, w tym toksyn i kancerogenów środowis-

<sup>1</sup> Dr, <sup>2</sup> doc. dr hab., Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

kowych, a także substancji endogennych, takich jak steroidy, kwasy tłuszczowe czy rozpuszczalne w tłuszczach witaminy. W organizmach zwierzęcych istnieje ponad 30 różnych form cytochromu P 450, różniących się między sobą specyficnością substratową i regulacją. Ludzki cytochrom P450 II E 1 jest głównym katalizatorem oksydacji benzenu, styrenu, wielu halogenków alkilowych, chlorku i bromku winylu, karbaminianu winylu i etylu oraz akrylonitrylu. Wiadomo też, że enzym ten u ludzi indukowany jest przez etanol [9-11].

Pierwotnym produktem utleniania VC przez cytochrom P450 II E 1, jest tlenek chloroetyleny (CEO-ang. *chloroethylene oxide*) [9, 12]. CEO jest związkiem wysoce nietrwałym i w roztworach wodnych ulega szybko przegrupowaniu do aldehydu chloroacetalowego (CAA-ang. *chloroacetaldehyde*) oraz hydrolizie do aldehydu glikolowego, które są związkami trwałymi [13] (Ryc. 1).

Sumaryczna stała szybkości rozkładu CEO w D<sub>2</sub>O w temp. 4°C wynosi 1.41 h<sup>-1</sup> (t<sub>1/2</sub>=30 min) przy czym stała przegrupowania CEO do CAA wynosi 0.41 h<sup>-1</sup> (t<sub>1/2</sub>=100 min). Natomiast w temp. 37°C t<sub>1/2</sub> przemiany w CAA i aldehyd glikolowy wynosi około 1 min. Reakcja przegrupowania CEO → CAA jest katalizowana przez jony chlorkowe i w obecności 0.15M NaCl (stężenie fizjologiczne) przebiega kilka razy szybciej [13].

Oba metabolity zawierające chlor, CEO i CAA, są związkami aktywnymi chemicznie i reagują zarówno z kwasami nukleinowymi jak i z białkami [14]. Oba związki posiadają dwie aktywne grupy funkcyjne, chlor i ugrupowanie epoksydowe w przypadku CEO oraz chlor i grupę aldehydową w przypadku CAA, w związku z czym w reakcji z kwasami nukleinowymi tworzą addukty cykliczne zasad (etenopochodne) oraz wiązania krzyżowe (patrz dalej).

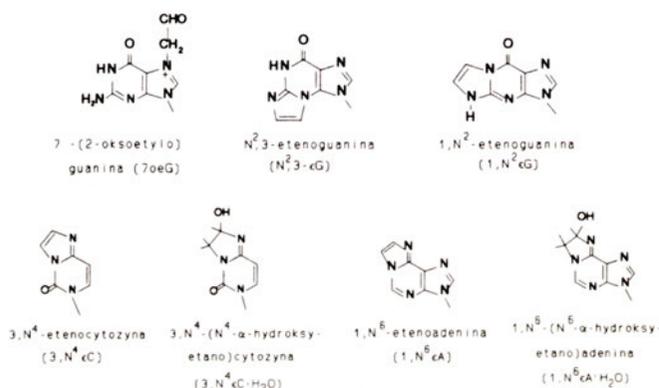
CEO i CAA są produktami metabolizmu nie tylko chlorku winylu, ale również wielu innych związków zawierających chlor (np. 1,2-dichloroetanu), z kolei wiele innych związków (np. akrylonitryl, karbaminian etylu) daje metabolity o strukturze podobnej do CEO i CAA. W rezultacie powoduje to odnajdywanie adduktów charakterystycznych dla chlorku winylu w DNA po-

ddanym działaniu wielu różnych związków [11].

Główna droga detoksykacji obu metabolitów chlorku winylu zachodzi poprzez sprzężenie z glutationem, co prowadzi do wydalania z moczem S-(2-hydroksyetylo)cysteiny i kwasu tioglikolowego [15, 16]. Prawdopodobnie CEO jest również substratem dla hydratazy epoksydowej, która przekształca go w niestabilny diol włączany następnie do cyklu kwasu cytrynowego i wydalony w postaci dwutlenku węgla [2, 17].

### III. Reakcja metabolitów chlorku winylu z zasadami kwasów nukleinowych

Dotychczas zidentyfikowano w DNA zwierząt doświadczalnych poddanych działaniu VC cztery addukty; 7oeG; 1,N<sup>6</sup>εA; 3,N<sup>4</sup>εC i N<sup>2</sup>,3εG [18]. Struktury tych (i innych) adduktów przedstawiono na rycinie 2.

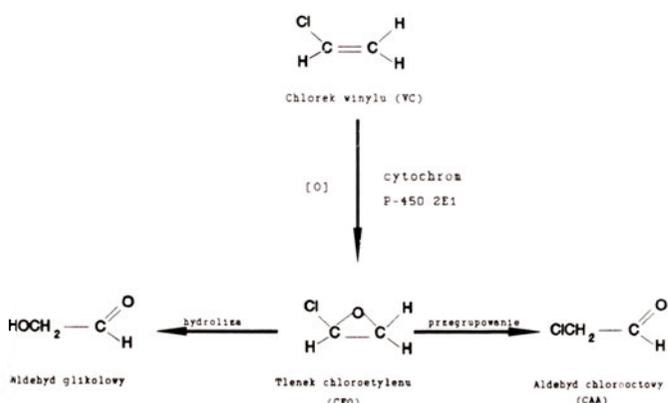


Ryc. 2. Struktura adduktów chlorku winylu do zasad DNA.

Prowadzone od szeregu lat badania *in vitro* reakcji CAA i CEO z DNA oraz modelowymi polinukleotydami i nukleozydami pozwoliły uzyskać informacje o mechanizmach tych reakcji, produktach przejściowych, właściwościach poszczególnych adduktów, a także przewidywać modyfikacje dotychczas niewykryte *in vivo*. Przykładem może być tu wykazanie tworzenia wiązań międzyniciowych w reakcji CAA z DNA [19].

CAA był używany od dawna do syntezy etenopochodnych cytozyny i adeniny [20, 21]. Ze względu na silną fluorescencję 1,N<sup>6</sup>εA i wykorzystanie tego zjawiska w badaniach biochemicznych i biofizycznych wiele prac poświęcono modyfikacji reszty adeninowej w nukleozydach, nukleotydach, koenzymach i polinukleotydach. Wyczerpujący przegląd prac poświęconych syntezie i właściwościom etenopochodnych zawiera praca Leonarda [22].

Prowadzono szczegółowe badania mechanizmu reakcji CAA z resztami adeniny i cytozyny w nukleozydach i w tRNA [23, 24]. We wstępnym etapie następuje wytworzenie zasady Schiffa w reakcji grupy aldehydowej CAA z egzocyklicznymi grupami aminowymi 6-NH<sub>2</sub> adeniny lub 4-NH<sub>2</sub> cytozyny. Następnie zachodzi cyklizacja w wyniku alkilowania przez ugru-



Ryc. 1. Aktywacja metaboliczna chlorku winylu.

powanie  $-CH_2Cl$  endocyklicznego atomu azotu w najbliższym sąsiedztwie grupy  $-NH_2$ . Powstałe w ten sposób stosunkowo stabilne produkty przejściowe (tzw. hydraty)  $1,N^6\epsilon A \cdot H_2O$  i  $3,N^4\epsilon C \cdot H_2O$  (Ryc. 2) w wyniku dehydratacji ulegają przekształceniu odpowiednio w  $1,N^6\epsilon A$  i  $3,N^4\epsilon C$ .

Badania mechanizmu reakcji CEO (i homologicznego tlenku bromoetyleny) z adenozyną i cytydyną wykazały, że odwrotnie niż w przypadku CAA, w pierwszym etapie następuje alkilowanie endocyklicznego atomu azotu, a następnie cyklizacja i dalej, identycznie jak w przypadku reakcji CAA, powstałe hydraty  $1,N^6\epsilon A \cdot H_2O$  i  $3,N^4\epsilon C \cdot H_2O$  ulegają przekształceniu odpowiednio w  $1,N^6\epsilon A$  i  $3,N^4\epsilon C$  [25, 26].

Połowiczny czas dehydratacji w pH 7.25 reszt  $1,N^6\epsilon A \cdot H_2O$  w poli(A) wynosi 1.4 godz. w  $37^\circ C$  natomiast reszt  $3,N^4\epsilon C \cdot H_2O$  w poli(C) 4.9 godziny w  $50^\circ C$ . Szybkość dehydratacji wzrasta znacznie wraz z obniżeniem pH i, co jest oczywiste, wraz ze wzrostem temperatury [27]. Względnie duża stabilność obu produktów przejściowych (szczególnie  $3,N^4\epsilon C \cdot H_2O$ ) sugeruje, że mogą one odgrywać niezależną od  $1,N^6\epsilon A$  i  $3,N^4\epsilon C$  rolę w mutageniezie (patrz dalej).

Guanozyna w pH 6.4 reaguje z CAA bardzo wolno. Po kilku dniach izolowano z mieszaniny reakcyjnej  $1,N^2$ -etenoguanozynę z zaledwie kilkuprocentową wydajnością [28]. Znacznie wyższe wydajności uzyskano w reakcji guanozyny [29] i deoksyguanozyny [30] z haloacetaldehydami w środowisku bezwodnym lub zawierającym niewielkie ilości wody w obecności czynników zasadowych. W żadnym z wymienionych przypadków nie badano mieszanin reakcyjnych na obecność izomerów  $N^2,3$ -etenoguaniny.  $N^2,3$ -etenopochodne syntetyzowano natomiast w reakcji odpowiednich 6-podstawionych pochodnych guaniny z CAA lub bromoacetaldehydem. Po usunięciu grupy chroniącej z pozycji 6 uzyskano w ten sposób  $N^2,3$ -etenopochodne guaniny [28], guanozyny [31] i dezksyguanozyny [32].

Oba izomery  $1,N^2\epsilon G$  i  $N^2,3\epsilon G$  powstają w reakcji CAA z DNA i polinukleotydami, przy czym ich stosunek ilościowy zależy w dużym stopniu od tego czy ulegające modyfikacji reszty guaniny występują w strukturze jednoniciowej czy dwuniciowej [30]. Mechanizm powstawania adduktów guaniny nie był badany. Można jednakże przypuszczać, że analogicznie jak  $1,N^6\epsilon A$  i  $3,N^4\epsilon C$ , powstają one *via*  $\alpha$ -hydroksyetano-pochodne.

W wielu laboratoriach badano reakcję CAA z nukleozydami i nukleotydami zawierającymi reszty uracylu lub tyminy. Wszystkie próby wykazały, że te niezawierające egzocyklicznych grup aminowych zasady nie ulegają modyfikacji przy działaniu CAA, co wydaje się oczywiste w świetle badań nad mechanizmem tej reakcji [22]. Nie są znane jednakże autorom niniejszego przeglądu badania reaktywności reszt tyminy lub uracylu w stosunku do CEO. Możliwości takiej reakcji nie można wykluczyć zważywszy na fakt, że bliski analog CEO, tlenek etylenu reaguje z resztami

tyminy dając 3(2-hydroksyetylo)pochodną [33].

Oba metabolity chlorku winylu, CEO i CAA różnią się w dwu zasadniczych cechach. Reaktywność CEO jest co najmniej dwa rzędy wielkości wyższa od reaktywności CAA i tylko CEO, w przeciwieństwie do CAA powoduje powstawanie 7oeG reakcji z DNA [34]. Addukt ten stanowi ponad 90% liczby adduktów w reakcji CEO z DNA *in vitro* [34] jak również w reakcji VC *in vivo* [18]. W reakcji CEO z DNA *in vitro* 7oeG powstaje około 30 razy szybciej niż  $1,N^6\epsilon A$ , która z kolei powstaje ok. 20 razy szybciej niż  $N^2,3\epsilon G$  (powstawania innych adduktów w tej pracy nie badano) [34]. W analogicznej reakcji CAA z DNA  $N^2,3\epsilon G$  powstaje w ilościach porównywalnych z  $3,N^4\epsilon C$  i  $1,N^6\epsilon A$ , natomiast  $1,N^2\epsilon G$  powstaje w ilościach śladowych ( $3,N^4\epsilon C > 1,N^6\epsilon A > N^2,3\epsilon G \ggg 1,N^2\epsilon G$ ). Stosując modelowe polinukleotydy wykazano, że stosunek  $N^2,3\epsilon G$  do  $1,N^2\epsilon G$  w znacznym stopniu zależy od struktury drugorzędowej kwasu nukleinowego. Sugeruje to, że w odcinkach jednoniciowych DNA (np. w widelkach replikacyjnych)  $1,N^2\epsilon G$  może powstawać z wydajnością podobną do wydajności powstawania innych adduktów [30].

Zależność stopnia modyfikacji zasad od struktury kwasu nukleinowego wykazano już dawno porównując reaktywność natywnego i denaturowanego DNA oraz modelowych jedno i dwuniciowych polinukleotydów [27, 35, 36]. Ostatnio ukazuje się wiele prac, donoszących o użyciu CAA (lub aldehydu bromoocetowego) jako sondy do badania strukturalnych osobliwości DNA takich jak formy krzyżowe [37], Z-DNA [38], formy trójniciowe [39] czy zmiany strukturalne DNA pod wpływem dużych adduktów [40]. Reaktywne miejsca zasad w tych strukturach są bardziej eksponowane niż te same miejsca zasad w B-DNA. Powoduje to, że w reakcji z CAA takie struktury ulegają modyfikacji w znacznie większym stopniu niż B-DNA.

#### IV. Molekularna dozymetria adduktów chlorku winylu

Detekcja i ilościowe oznaczanie adduktów powstających w reakcji CEO i CAA z DNA *in vitro* prowadzona jest zazwyczaj po hydrolizie kwaśnej lub enzymatycznej modyfikowanego DNA (lub też kombinacji obu) i następnie rozdziale produktów przy pomocy HPLC. Do detekcji wykorzystuje się absorpcję UV produktów, jak również fluorescencję  $1,N^6\epsilon A$ , 7oeG i  $N^2,3\epsilon G$ .  $1,N^2\epsilon G$  wykazuje słabą fluorescencję jedynie jako anion, natomiast  $3,N^4\epsilon C$  fluoryzuje słabo jako kation [11, 22, 30, 34].

Zastosowanie metody znakowania  $^{32}P$  w pozycji 5' 3'-nukleotydów (ang.  $^{32}P$ -*postlabelling*) uzyskanych po enzymatycznej hydrolizie DNA traktowanego CAA *in vitro* w połączeniu z rozdziałem metodą HPLC pozwoliło na detekcję pojedynczych adduktów  $1,N^6\epsilon A$  i  $3,N^4\epsilon C$  na  $10^7$ - $10^8$  nukleotydów w 10  $\mu g$  próbce

DNA [41]. Prowadzono także kinetyczne i ilościowe badania  $^{32}\text{P}$  znakowania  $1,\text{N}^6\epsilon\text{A}$ ,  $3,\text{N}^4\epsilon\text{C}$  i  $1,\text{N}^2\epsilon\text{G}$  [42], jednakże jak do tej pory nie ukazały się prace opisujące zastosowanie tej techniki do analizy DNA zwierząt doświadczalnych poddanych działaniu VC.

Stosowanie radioaktywnego  $^{14}\text{C}$ -VC o wysokiej aktywności specyficznej podawanego drogą inhalacji lub iniekcji pozwala wykryć 7oeG w DNA wątroby zwierząt doświadczalnych w ilościach od kilku do 25 adduktów na  $10^6$  niemodyfikowanych reszt guaniny.  $\text{N}^2,3\epsilon\text{G}$  wykryto w ilości 0.25 adduktu /  $10^6\text{G}$  w doświadczeniu gdzie 7oeG wykrywano w ilości 25 adduktów /  $10^6\text{G}$ . Generalnie, stosowanie  $^{14}\text{C}$ -VC pozwala na oznaczenie jedynie 7oeG, adduktu powstającego z największą wydajnością. Addukty etenowe zasad, powstające w znacznie mniejszych ilościach, nie mogą być tą metodą wykryte i oznaczone w sposób nie budzący wątpliwości [14, 43].

$1,\text{N}^6\epsilon\text{A}$  i  $3,\text{N}^4\epsilon\text{C}$  wykryto natomiast w DNA wątroby szczurów, którym podawano przez dwa lata wodę pitną zawierającą nieradioaktywny VC o stężeniu 250 ppm. Addukty te zidentyfikowano stosując chromatografię gazową w połączeniu ze spektrometrią masową. Autorzy nie podają jednak danych ilościowych [44].

Metodą pozwalającą na oznaczenie kilku reszt  $\text{N}^2,3\epsilon\text{G}$  na  $10^8\text{G}$  w DNA szczurów poddanych działaniu VC opracowano w laboratorium S w e n b e r g a [45, 46]. W metodzie tej zastosowano połączenie chromatografii gazowej ze spektrometrią masową w wariancie jonizacji chemicznej w trybie jonów ujemnych (GC — NICI MS). W wyniku badań stwierdzono znaczne różnice w zawartości  $\text{N}^2,3\epsilon\text{G}$  i 7oeG oznaczonej przy pomocy HPLC z detekcją fluoroscencji w zależności od wieku szczurów i analizowanego narządu. Jednak niezależnie od wieku zwierząt i narządu, stosunek  $\text{N}^2,3\epsilon\text{G} : 7\text{oeG}$  mierzony natychmiast po zakończeniu ekspozycji na VC był stały i wynosił ok. 1:100.

Niewątpliwie znacznym postępowaniem w detekcji i ilościowym oznaczaniu adduktów VC do zasad DNA było zastosowanie przeciwciał monoklonalnych. Pierwsze przeciwciała monoklonalne przeciwko  $1,\text{N}^6\epsilon\text{A}$  (IG4) i  $3,\text{N}^4\epsilon\text{C}$  (6F5) otrzymali Y o u n g i S a n t a n e l l a [47]. Przeciwciała te pozwalają wykryć oba addukty testem ELISA w proporcji 1/ $10^7$  zasad. E b e r l e i w s p. [48] również uzyskali przeciwciała monoklonalne przeciwko  $1,\text{N}^6\epsilon\text{A}$  (EM-A-1) i  $3,\text{N}^4\epsilon\text{C}$  (EM-C-1). W teście radioimmunospółzawodnictwa (RIA) granica detekcji dla EM-A-1 wynosi 1 reszta  $1,\text{N}^6\epsilon\text{A}$  na  $2.2 \times 10^8$  A i dla EM-C-1 — jedna reszta  $3,\text{N}^4\epsilon\text{C}$  na  $3.1 \times 10^8$  C. Zastosowanie przeciwciał EM-A-1 i EM-C-1 do analizy DNA różnych organów szczurów poddanych działaniu VC pozwoliło oznaczyć zawartość  $1,\text{N}^6\epsilon\text{A}$  i  $3,\text{N}^4\epsilon\text{C}$  w DNA [48, 49]. Podobnie jak w przypadku oznaczenia zawartości  $\text{N}^2,3\epsilon\text{G}$  i 7oeG [46] również i w tym przypadku stwierdzono różnice zależne od wieku i organu zwie-

rząt. Niezależnie od wykrywanych różnic  $3,\text{N}^4\epsilon\text{C}$  występowała zawsze w ilości 2-4 razy większej niż  $1,\text{N}^6\epsilon\text{A}$ .

S w e n b e r g i w s p. [18] podają zestawienie wyników ilościowego oznaczania adduktów VC różnymi metodami: 7oeG — HPLC i fluoroscencja [46];  $\text{N}^2,3\epsilon\text{G}$ —GC-NICI MS [46] oraz  $1,\text{N}^6\epsilon\text{A}$  i  $3,\text{N}^4\epsilon\text{C}$  — przeciwciała monoklonalne [49]. W porównywalnych warunkach ekspozycji na VC nowonarodzonych szczurów zawartość 7oeG w DNA wątroby jest ok. 100 razy wyższa od zawartości  $\text{N}^2,3\epsilon\text{G}$ , z kolei zawartość  $\text{N}^2,3\epsilon\text{G}$  jest ok. 10 razy wyższa od zawartości  $3,\text{N}^4\epsilon\text{C}$ , a zawartość  $3,\text{N}^4\epsilon\text{C}$  przekracza 4-krotnie zawartość  $1,\text{N}^6\epsilon\text{A}$  (patrz Tabela I). Proporcje adduktów prezentowane w tym zestawieniu nie są sprzeczne z wynikami uzyskanymi wcześniej w doświadczeniach z radioaktywnym VC, gdzie również określono stosunek  $\text{N}^2,3\epsilon\text{G} : 7\text{oeG}$  jako 1:100, a etenopochodnych A i C nie oznaczano, ze względu na ich niską zawartość (patrz wyżej [43]).

Wydaje się, że mimo stosowania diametralnie różnych metod analitycznych dla oznaczenia poszczególnych adduktów, obraz modyfikacji DNA zwierząt doświadczalnych poddanych działaniu VC jest wyjątkowo spójny. Tym bardziej wymaga komentarza sprzeczność widoczna przy porównywaniu tego obrazu z wynikami reakcji CEO i CAA z DNA *in vitro*. Jak już wspomniano  $\text{N}^2,3\epsilon\text{G}$  w reakcji CEO z DNA powstaje z wydajnością ok. 20-krotnie mniejszą niż  $1,\text{N}^6\epsilon\text{A}$  [34]. Podobnie jest w przypadku reakcji CAA z DNA, gdzie różnice są mniej drastyczne, ale  $\text{N}^2,3\epsilon\text{G}$  powstaje także z wydajnością mniejszą od  $3,\text{N}^4\epsilon\text{C}$  i  $1,\text{N}^6\epsilon\text{A}$  [30]. Natomiast w reakcji VC z DNA w organizmach szczurów sytuacja jest odwrotna, t.j.  $\text{N}^2,3\epsilon\text{G}$  jest wykrywana w DNA w ilości ponad 10-krotnie większej od  $3,\text{N}^4\epsilon\text{C}$  i  $1,\text{N}^6\epsilon\text{A}$ . Założenie, że stosunkowo trwałe addukty przejściowe  $3,\text{N}^4\epsilon\text{C} \cdot \text{H}_2\text{O}$  i  $1,\text{N}^6\epsilon\text{A} \cdot \text{H}_2\text{O}$  są szybko reperowane w organizmie szczura jest logicznym, chociaż jak na razie pozbawionym weryfikacji doświadczalnej wytłumaczeniem tego zjawiska. Końcowe produkty reakcji metabolitów VC,  $3,\text{N}^4\epsilon\text{C}$  i  $1,\text{N}^6\epsilon\text{A}$ , nie są raczej przedmiotem efektywnej reperacji w wątrobie szczura. Obserwowane *in vivo* powolne zmniejszanie się wraz z upływem czasu zawartości tych adduktów należy przypisać raczej ich rozcieńczeniu związanym z replikacją DNA, a nie ich aktywnej reperacji [18]. W ten sposób wykrywane addukty  $3,\text{N}^4\epsilon\text{C}$  i  $1,\text{N}^6\epsilon\text{A}$  byłyby tą częścią pierwotnych modyfikacji, które uległy dehydratacji zanim zostały usunięte przez enzym lub enzymy reperujące.

Ostatnio w laboratorium F o i l e s ' a [50] otrzymano przeciwciała monoklonalne przeciwko  $\text{N}^2,3\epsilon\text{G}$  (ETH-1) i  $1,\text{N}^2\epsilon\text{G}$  (ETH-2). Granica detekcji testem ELISA dla ETH-1 wynosi jedna reszta  $\text{N}^2,3\epsilon\text{G}$  na  $1.5 \times 10^6$  zasad, a dla ETH-2 jedna reszta  $1,\text{N}^2\epsilon\text{G}$  na  $2.2 \times 10^5$  zasad. Autorzy zastosowali te przeciwciała wraz przeciwciałami IG4 6F5 [47] do ilościowego

**Tabela 1.**

Powstawanie adduktów chlorku winylu w DNA i właściwości kodujące tych adduktów

Addukt	Częstość występowania adduktów w DNA wątroby szczurów eksponowanych na VC <sup>a</sup>	Właściwości kodujące <sup>b</sup>		
		<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i>
		System	Rodzaj mutacji	Rodzaj mutacji
7- <i>oeG</i>	2.0/10 <sup>4</sup>	pol I	brak	—
N <sup>2</sup> , 3εG	3.8/10 <sup>6</sup>	RNA P AMV RT Klenow <sup>c</sup> pol α <sup>c</sup> HIV RT <sup>c</sup>	G → A	G → A
3, N <sup>4</sup> εC	4.8/10 <sup>7</sup>	RNA P pol I	C → T C → A	C → T (80%) C → A (20%)
1, N <sup>6</sup> εA	1.3/10 <sup>7</sup>	pol I AMV RT Klenow <sup>c</sup>	A → C A → C A → A A → C A → T	brak mutacji (A → A) A → T A → C A → G

a. dane z przeglądowej pracy Swenberga i wsp. (1990). Szczury były eksponowane przez 10 dni na chlorek winylu o stężeniu w powietrzu 500 ppm. Ilości adduktów wyrażone są w stosunku do ilości odpowiedniej niemodyfikowanej zasady

b. skróty oznaczają: pol I — I polimeraza DNA z *E. coli*; AMV RT — odwrotna transkryptaza z wirusa szpiczaka ptasiego AMV; Klenow — fragment Klenowa polimerazy I z *E. coli*; pol α — polimeraza DNA α z *Drosophila melanogaster*; HIV RT odwrotna transkryptaza z wirusa HIV; RNA P — polimeraza RNA z różnych źródeł

c. dane z doświadczeń w których modyfikowana zasada w postaci dezoksytryjfosforanu wstawiana była naprzeciw określonego miejsca w matrycy, przy pomocy różnych enzymów

oznaczania etenoadduktów w DNA komórek G-12 (wariant komórek chińskiego chomika V-79) poddanych działaniu CAA. W analizowanym DNA stwierdzono najwyższą zawartość 1,N<sup>6</sup>εA, 2-3 razy mniej 3,N<sup>4</sup>εC i około 10 razy mniej N<sup>2</sup>,3εG. Nie stwierdzono natomiast obecności 1,N<sup>2</sup>εG, co jest zapewne wynikiem z jednej strony niskiej czułości przeciwciał ETH-2, a z drugiej — znikomej wydajności reakcji powstawania tego adduktu w DNA [30]. W tym przypadku proporcje adduktów są zbliżone do proporcji tych adduktów w reakcji CAA z DNA *in vitro* [30], natomiast różnią się znacznie od proporcji określonych dla DNA wątroby szczurów poddanych działaniu VC (Tabela I). Różnice te są najprawdopodobniej odbiciem różnic w poziomie enzymów reperujących w organizmie zwierzęcia i w kulturze komórkowej.

## V. Mutagenność i kancerogenność tlenku chloroetyleny i aldehydu chlorooctowego

Mutagenność obu metabolitów, CEO i CAA, była badana intensywnie w wielu laboratoriach, zarówno w systemach bakteryjnych jak i w komórkach eukariotycznych [51-55]. CAA stosowany w porównywalnych dawkach jest słabszym mutagenem od CEO i w niektórych typach testów nie wykazuje mutagenności. Wykazano na przykład, że CAA jest aktywnym mutagenem w szczepie TA 100 *Salmonella typhimurium* o podwyższonej wrażliwości na mutageny, natomiast

nie powoduje mutacji w szczepie TA 1535 tego samego gatunku [56].

Oba metabolity wykazują podobną specyfikę mutacji. Badania indukowanych przez CEO rewersji różnych mutantów *trpA* u *E. coli* wykazały, że dominującym typem mutacji jest tranzycja GC → AT, a następnie transwersja AT → TA [55]. Podobnie badania rewertantów *Arg+* u *E. coli*, wykazały, że najczęstszym typem mutacji powodowanym przez CAA jest tranzycja GC → AT (65%) i następnie transwersja AT → TA (12%) [57].

Warto zauważyć, że żaden z etenowych adduktów nie powoduje mutacji, gdy jest dodawany do hodowli bakterii w postaci zasady, nukleozydu lub nukleotydu. Rybo- i deoksyrybonukleozydy 3,N<sup>4</sup>εC i 1,N<sup>6</sup>εA nie powodują powstawania mutacji w szczepie *S. typhimurium* T100 [58]. Podobnie rybo- i deoksyrybonukleozydy oraz nukleotydy N<sup>2</sup>,3εG i 1,N<sup>2</sup>εG dodawane do hodowli *E. coli* nie powodują podwyższenia mutacji w stosunku do hodowli kontrolnych [59, A. Bukowska i J.T. Kuśmierk dane nieopublikowane].

Kancerogenne działanie CEO podawanego drogą iniekcji podskórnej, stwierdzono u myszy. Ze względu na silne działanie nekrotyzujące CAA nie mógł być podawany przez iniekcję i jego kancerogenność badano w teście naskórnym. Podczas gdy CEO również i w tym teście wykazywał silną kancerogenność, liczba nowotworów powodowanych przez CAA nie przewyż-

szała liczby nowotworów u zwierząt kontrolnych [60]. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze badania, w których CAA stosowano w teście naskórnym oraz podawano dożołądkowo [61].

## VI. Właściwości kodujące adduktów

Właściwości kodujące adduktów powstających w reakcji metabolitów VC z kwasami nukleinowymi są przedmiotem badań wielu laboratoriów. Badania te są prowadzone zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. *In vitro*, w układach bezkomórkowych, polimery zawierające modyfikowane zasady są kopiowane przez różne enzymy polimeryzujące kwasy nukleinowe. W innym typie doświadczeń, addukty występują w reakcji polimeryzacji w postaci trójfosforanów stanowiąc potencjalne substraty dla enzymów prowadzących reakcję. W kolejnym typie doświadczeń DNA modyfikowany *in vitro* np. CAA, wprowadzany jest do komórek bakteryjnych, w których podlega naprawie i powielaniu. Ostatni typ eksperymentów to doświadczenia z mutagenizacją sterowaną, w których w zdefiniowanym miejscu genomu bakteryjnego lub fagowego, umieszczona jest badana zasada.

Spośród siedmiu modyfikacji powstających w reakcji metabolitów VC z kwasami nukleinowymi (Ryc. 2), 7oeG jest adduktem, który uważa się za niemutageny. W układzie bezkomórkowym, w którym poli(dG-dC) zawierające 7oeG było kopiowane przez polimerazę I DNA z *E. coli*, stwierdzono inkorporację jedynie komplementarnych do matrycy G i C [62]. Brak znacznych różnic w spektrum mutacji u *E. coli* indukowanych przez CEO, który powoduje powstawanie głównie 7oeG oraz przez CAA, który w ogóle nie daje 7oeG w reakcji z DNA również sugerują, że rola tego adduktu w mutagenizie VC nie jest istotna [55, 57]. Do powstawania mutacji prowadzić może natomiast depurynacja w miejscu występowania 7oeG, gdyż dołączenie grupy oksoetylowej do 7 pozycji guaniny zwiększa labilność wiązania glikozydowego, poza tym addukt ten może być substratem dla glikozylaz naprawiających DNA.

1,N<sup>6</sup>εA jest modyfikacją wykazującą niejednoznaczne właściwości kodujące. Wyniki dotyczące jej właściwości kodujących różnią się między sobą, w zależności od układu doświadczalnego w którym były uzyskane. 1,N<sup>6</sup>εA obecna w matrycy poli(dA) w układzie polimerazy I DNA *E. coli* (fragment Klenowa) i odwrotnej transkryptazy wirusa ptasiego szpiczaka (AMV), powodowała słabą inkorporację G [63]. Zasada ta, obecna w matrycy poli(rC) w układzie polimerazy RNA z *E. coli*, powodowała głównie inkorporację A, w mniejszym stopniu U [64]. Stosując natomiast 1,N<sup>6</sup>εdATP w układzie polimerazy I DNA wykazano, że trójfosforan ten może zastępować dATP oraz z mniejszą częstością dCTP i dTTP [65]. Podobnie niejednoznaczne wyniki w odniesieniu do 1,N<sup>6</sup>εA, uzyskano w grupie H u m a y u n a, gdzie modyfikowa-

ny *in vitro* przy pomocy CAA, jednoniciowy fragment genu faga M13, był replikowany *in vivo*. Na 170 znalezionych mutantów tylko 9 dotyczyło zmian w miejscu występowania A. Chociaż poziom modyfikacji adeniny, był porównywalny z poziomem modyfikacji cytozyny, 3,N<sup>4</sup>εC powodowała występowanie mutacji z częstością znacznie większą, co wskazuje na to, że 1,N<sup>6</sup>εA czytana jest często jako A [66, 67].

Chociaż 1,N<sup>6</sup>εA w porównaniu z innymi etenowymi modyfikacjami nie ma silnie wyrażonych właściwości błędnego kodowania, jej rola w mutagenizie nie może być pomijana. W badaniach kancerogenności działania karbaminianu winylu u myszy (karbaminian winylu po aktywacji reaguje z adeniną w DNA dając 1,N<sup>6</sup>εA) stwierdzono, że w sześciu z siedmiu badanych nowotworów, zaszła transwersja AT do TA w drugiej pozycji 61-ego kodonu onkogenu resH, za co odpowiadać może 1,N<sup>6</sup>εA [68].

Nie prowadzono badań właściwości kodujących adduktu 1,N<sup>6</sup>εA · H<sub>2</sub>O ze względu na jego dużą nietrwałość ( $t_{1/2} = 1,4$  godz, 37°, pH 7 [27], patrz rozdział III).

W porównaniu do właściwości kodujących 1,N<sup>6</sup>εA właściwości kodujące 3,N<sup>4</sup>εC są bardziej jednoznaczne, choć również w tym przypadku występują pewne różnice zależne od modelu doświadczalnego. Błędną inkorporację nukleotydów powodowaną obecnością 3,N<sup>4</sup>εC w matrycach poli(C) lub poli(dC) badano w układzie DNA-zależnej polimerazy RNA z *E. coli* i grasicy cielęcej, a także polimerazy I DNA z *E. coli* [70, 71]. Obserwowano głównie inkorporację U lub T naprzeciw badanego adduktu, chociaż w przypadku polimeraz RNA stwierdzono również porównywalną inkorporację A. Natomiast w przypadku dwuniciowej matrycy poli(dG—dC) · poli(dG—dC) modyfikowanej CAA, w układzie polimerazy I DNA obserwowana inkorporacja A była wyższa od inkorporacji T [72].

W nowszych pracach cytowanego już zespołu H u m a y u n a, modyfikowano *in vitro* aldehydem chloro-octowym jednoniciowy fragment genu lac Z w dwuniciowej formie replikatywnej faga M13AB28, a następnie tak przygotowanym DNA transfekowano komórki *E. coli* uzyskując *in vivo* replikację DNA zawierającego 3,N<sup>4</sup>εC i 1,N<sup>6</sup>εA. Sekwencjonowanie DNA pozwoliło stwierdzić, że mutacje wywołane przez CAA powstają głównie w następstwie modyfikacji cytozyny oraz, że 80% tych mutacji to tranzykcje C → T, a pozostałe to głównie transwersje C → A [66, 67]. Świadczy to, że *in vivo* obecność 3,N<sup>4</sup>εC w DNA powoduje przede wszystkim inkorporację A, a następnie inkorporację T.

W dalszych pracach tego zespołu badano inkorporację nukleotydów naprzeciw 3,N<sup>4</sup>εC, w zdefiniowanym miejscu syntetycznego oligodezoksynukleotydu i stwierdzono również, że addukt ten powoduje przede wszystkim inkorporację A, potem T, podczas gdy G i C inkorporowane były w nieznacznym stopniu [73]. Podobne wyniki uzyskano przeprowadzając mutagenizację sterowaną, gdy badaną zasadę umieszczono

w określonym miejscu genomu faga M13AB28 i obserwowano powstałe w tym miejscu mutacje. Również w tym doświadczeniu głównym typem obserwowanych mutacji były tranzycja C→T, za którą szła transwersja C→A [74].

Duża trwałość powstającej w pierwszym etapie reakcji CEO lub CAA hydratowanej pochodnej  $3,N^4\epsilon\text{CH}_2\text{O}$  ( $t_{1/2}$  ok. 24 h, 37°C, pH 7.0 [27], patrz rozdział III) pozwala na porównanie jej właściwości kodujących z właściwościami  $3,N^4\epsilon\text{C}$ . Przy użyciu polimerazy RNA z *E. coli* stwierdzono, że  $3,N^4\epsilon\text{C} \cdot \text{H}_2\text{O}$  powoduje wyższą inkorporację A od U, natomiast dehydratowany addukt odwrotnie, wyższą inkorporację U niż A [69]. Z kolei w układzie polimerazy I DNA nie stwierdzono inkorporacji T powodowanej przez  $3,N^4\epsilon\text{C} \cdot \text{H}_2\text{O}$ , podczas gdy dehydratacja powodowała inkorporację T proporcjonalną do stopnia dehydratacji [71]. Natomiast w cytowanych wyżej pracach grupy Humayna [66, 67], gdzie zawierający addukty fagowy DNA był replikowany w komórkach *E. coli*, nie stwierdzono istotnego wpływu dehydratacji na spektrum mutacji.

Modyfikacją o najbardziej jednoznacznie wyrażonych właściwościach kodujących jest  $N^2,3\epsilon\text{G}$ . Modyfikacja ta zarówno w doświadczeniach *in vitro* jak i *in vivo* powoduje głównie mutacje typu G→A, poprzez tworzenie pary  $\epsilon\text{G-U}$  lub  $\epsilon\text{G-T}$ . W badaniach transkrypcji matrycy poli(C;  $N^2,3\epsilon\text{G}$ ) przy pomocy odwrotnej transkryptazy z wirusa szpiczaka ptasiego [75] stwierdzono, że  $N^2,3\epsilon\text{G}$  powoduje inkorporację C i T w stosunku około 4:1. W układzie polimerazy RNA z *E. coli*  $N^2,3\epsilon\text{G}$  obecna w matrycy poli(C) powodowała inkorporację C i U w stosunku około 1:1. Dodatkowo w tym układzie obserwowano powodowaną przez  $N^2,3\epsilon\text{G}$  inkorporację ATP [59]. W przeciwieństwie do matrycy poli(C) addukt ten, w matrycach poli(A) powoduje jedynie inkorporację U, gdy matryce są kopiowane przez polimerazę RNA i dTTP gdy używa się odwrotnej transkryptazy. Autorzy postulują, że obserwowany *in vitro* wpływ rodzaju sąsiadujących zasad na właściwości kodujące  $N^2,3\epsilon\text{G}$  może również mieć miejsce podczas replikacji DNA *in vivo* [76].

Przy pomocy różnych enzymów polimerazujących DNA (patrz Tabela I) badano insercję  $N^2,3\epsilon\text{dGTP}$  naprzeciwko C lub T umiejscowionych w zdefiniowanej sekwencji syntetycznego oligodezoksynukleotydu. W badaniach tych stwierdzono również, że  $N^2,3\epsilon\text{G}$  może tworzyć parę z C i z T [77].

Badania  $N^2,3\epsilon\text{G}$  w matrycach dezoksy utrudnia fakt, że wiązanie glikozydowe w  $N^2,3\epsilon\text{dGuo}$  jest nietrwałe [32] i nie jest możliwe uzyskanie tych matryc standardowymi metodami chemicznej syntezy oligodezoksynukleotydów. Za pomocą opisanej wyżej techniki insercji możliwe było jednak wstawienie  $N^2,3\epsilon\text{dGTP}$  w określone miejsce genomu faga M13G\*1. Fag ten był następnie replikowany w komórkach *E. coli*. Sekwencjonowanie DNA powstałych mutantów wykazało, że najczęstszym typem mutacji

(134 mutacje na 135 znalezionych) była tranzycja GC→AT [78]. Tak więc we wszystkich przeprowadzonych badaniach  $N^2,3\epsilon\text{G}$  wykazuje jednoznaczne właściwości kodujące.

Najmniej poznana ze wszystkich modyfikacji jest  $1,N^2\epsilon\text{G}$ . Ze wstępnych badań wynika jednak, że  $1,N^2\epsilon\text{G}$  obecna w matrycy poli(C) hamuje syntezę komplementarnej nici przez DNA — zależną polimerazę RNA z *E. coli* i odwrotną transkryptazę z wirusa szpiczaka ptasiego w stopniu znacznie większym, niż  $N^2,3\epsilon\text{G}$ . Z powodu niskiej wydajności reakcji trudno jest stwierdzić jakie właściwości kodujące posiada ten addukt. Wydaje się jednak, że w systemie polimerazy RNA nie preferuje on inkorporacji żadnego z nukleotydów do nowo syntetyzowanej nici (A. B u k o w s k a i J. T. K u ś m i e r e k — dane niepublikowane).

Informacje na temat właściwości kodujących adduktów omawiane w tym rozdziale, zebrane są w Tabeli 1.

## VII. Reperacja adduktów

Reperacja adduktów VC do DNA nie została jeszcze zbadana w sposób pozwalający na wyciągnięcie ogólnych wniosków. Swenberg i wsp. [18] podają zestawienie zmian zawartości adduktów w DNA wątroby szczurów poddanych działaniu VC, po zakończeniu ekspozycji przez 14 dni. Z zestawienia tego wynika, że zanik  $1,N^6\epsilon\text{A}$  i  $3,N^4\epsilon\text{C}$  następuje bardzo wolno i należy raczej przypisywać to zjawisko rozcieńczeniu związanemu z replikacją DNA niż aktywnej reperacji adduktów. Natomiast usuwanie  $N^2,3\epsilon\text{G}$  ( $t_{1/2} > 30$  dni), a szczególnie  $7\text{oeG}$  ( $t_{1/2} = 62\text{h}$ ) przebiega szybciej [46]. Okresy te są jednakże porównywalne z czasami spontanicznego uwalniania  $N^2,3\epsilon\text{G}$  z poli(dC-dG,  $N^2,3\epsilon\text{G}$ ) ( $t_{1/2} > 30$  dni [32]) oraz 7-metyloguaniny z DNA ( $t_{1/2} = 105$  h [79]), co świadczy, że usuwanie tych adduktów w wątrobie szczura ma charakter nieenzymatyczny.

Obserwowane różnice w zawartości adduktów w DNA w zależności od narządu i od wieku szczurów eksponowanych na VC [46, 48, 49] mogą świadczyć o różnicach w reperacji. Z drugiej strony mogą być one odzwierciedleniem zróżnicowanej aktywacji VC w różnych tkankach jak również wynikiem różnic w transporcie VC i/lub jego metabolitów do poszczególnych narządów.

Z powyższych rozważań wynika, że nie ma przekonujących dowodów na istnienie efektywnej reperacji adduktów VC w organizmie szczura. Obecność enzymów reperujących tego typu addukty stwierdzono natomiast w homogenatach tkankowych jak również u bakterii.

Oesch i wsp. [80] stwierdzili, że po inkubacji DNA modyfikowanego CAA z ekstraktem komórek raka mózgu szczurzego, można zaobserwować wycinanie  $1,N^6\epsilon\text{A}$  i  $N^2,3\epsilon\text{G}$ . Sugeruje to istnienie w tych komórkach glikozylaz specyficznych dla naprawy adduktów etenowych.

W pracowni Singer wykryto w homogenatach różnych ludzkich linii komórkowych i różnych narządów ludzkich, a następnie częściowo oczyszczono z łożyska ludzkiego białko silnie wiążące się z dwuniciowym DNA zawierającym 1,N<sup>6</sup>εA. Stała wiązania z oligodeoksynukleotydem o długości 25 par zasad zawierającym parę 1,N<sup>6</sup>εA·T lub 1N<sup>6</sup>εA·C wynosi 10<sup>9</sup>M<sup>-1</sup>. Wykazano również, że białko to posiada właściwości nukleazy nacinającej 25-mer za strony 5' 1,N<sup>6</sup>εA. W dalszych badaniach stwierdzono, że białko to wycina 1,N<sup>6</sup>εA i jest prawdopodobnie identyczne z ludzką glikozylazą 3-metyloadenina-DNA [81-83].

Z kolei w pracowni Ludluma wykazano, że glikozylaza II 3-metyloadenina-DNA z *E. coli* usuwa N<sup>2</sup>,3εG z DNA modyfikowanego CAA [84]. Enzym ten wycina też N<sup>2</sup>,3-etanoguaninę, bliski analog strukturalny N<sup>2</sup>,3εG z DNA modyfikowanego przy pomocy chloroetylonitrozomocznika [85].

Glikozylaza II 3-metyloadenina-DNA jest indukwalnym enzymem wchodzącym w skład systemu odpowiedzi adaptacyjnej *E. coli* na środki alkilujące, kodowanym przez gen *alkA*. Enzym ten wykazuje szerokie spektrum aktywności i usuwa N-3- i HN-7-podstawione puryny oraz O<sup>2</sup>-podstawione pirymidyny z alkilowanego DNA [86].

Badania naszego zespołu wykazały, że indukcja systemu odpowiedzi adaptacyjnej znacznie obniża częstość tranzycji GC → AT powodowanych przez CAA zarówno u *E. coli* [87] jak i w dwuniciowej replikatywnej formie faga M13*glyU* [88]. Doświadczenia z mutantami *alkA* oraz z bakteriami, w których mutacja ta była komplementowana przez wprowadzenie plazmidu niosącego *alkA* wykazały, że obniżenie częstości tranzycji GC → AT zależy od genu *alkA* [57]. Badano również wpływ odpowiedzi adaptacyjnej na mutację pochodzącą wyłącznie z modyfikacji C. W tym celu traktowano CAA jednoniciowego faga M13*glyU*, co umożliwiło selektywną detekcję tranzycji C → T [88]. Wykazano, że indukcja systemu adaptacyjnego w komórkach *E. coli* transfekowanych modyfikowanym fagiem M13*glyU* znacznie obniża częstość fagowych tranzycji C → T. Nie stwierdzono istotnych różnic w zależności od tego, czy źródłem obserwowanego efektu jest 3,N<sup>4</sup>εC·H<sub>2</sub>O, czy też dehydratowana forma 3,N<sup>4</sup>εC. Sugeruje to, że zarówno 3,N<sup>4</sup>εC·H<sub>2</sub>O jak i 3,N<sup>4</sup>εC usuwane są w komórkach *E. coli* przez glikozylazę II 3-metyloadenina-DNA. W obecnym stadium zaawansowania badań nie jest możliwe stwierdzenie w jakim stopniu zachodzące w wyniku adaptacji obniżenie częstości tranzycji GC → AT jest skutkiem usuwania przez glikozylazę II adduktu G, a w jakim adduktu C (E. Borys, M. Mroczkowska-Słupska i J. T. Kuśmierzek — dane niepublikowane).

Artykuł otrzymano 9 listopada 1993 r.  
Zaakceptowano do druku 9 grudnia 1993 r.

## Piśmiennictwo

1. Van Duuren B L (1989) *Environ Res* **49**: 143-151
2. Green T (1990) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**: 73-89
3. Rocznik Statystyczny 1991
4. Sierakowski S J, Kucharz E J (1988) *Post Higieny i Med Doświadczalnej* **42**: 619-640
5. Gromiec J P, Dobecki M (1989) *Medycyna Pracy* **40**: 369-375
6. Jones R D, Smith D M, Thomas P G (1988) *Scand J Work Envir Health* **14**: 153-160
7. Smulewicz V B, Fedotowa I V, Filatowa V S (1988) *Brit J Indust Medicine* **45**: 83-97
8. Benefenati E, Natangelo M, Davoli E, Fanelli R (1991) *Fd Chemic Toxicol* **29**: 131-134.
9. Barbin A, Bresil H, Croisy A, Jacquignon P, Malaveille C, Montesano R, Bartsch H (1975) *Biochem Biophys Res Commun* **67**: 596-602
10. Guengerich F P, Crawford Jr W M, Watanabe P G (1979) *Biochemistry* **18**: 5177-5182.
11. Guengerich F P, Kim D-H, Iwasaki M (1991) *Chem Res Toxicol* **4**: 168-179
12. Gothe R, Callerman C J, Ehrenberg L, Wachmeister C A (1974) *Ambio* **3**: 234-236
13. Barbin A, Berezat J-C, Croisy A, O'Neil I K, Bartsch H (1990) *Chem-Biol Interact* **73**: 261-277
14. Osterman-Golkar S, Hultmark D, Segerback D, Callerman C J, Gothe R, Ehrenberg L, Wachmeister C A (1977) *Biochem Biophys Res Commun* **76**: 259-266
15. Green T, Hathway D E (1975) *Chem Biol Interact* **11**: 542-546
16. Watanabe P G, McGown G R, Gehring P J (1976) *Toxicol Appl Pharmacol* **36**: 339-352
17. Watanabe P G, Gehring P J (1976) *Environ Health Perspect* **17**: 145-152
18. Swenberg J A, Fedtke N, Fennell T R, Walker V E (1990) W: Claydon D B, Munro I C, Shubik P, Swenberg J A (red) *Progress in Predictive Toxicology*, Elsevier Science Publishers B V (Biomedical Division) str 161-184
19. Spengler S J, Singer B (1988) *Cancer Res* **48**: 4804-4806
20. Kochetkov N K, Shibaev V W, Kost A A (1971) *Tetrahedron Lett* 1993-1996
21. Barrio J R, Secist J A, Leonard N J (1972) *Biochem Biophys Res Commun* **46**: 597-604
22. Leonard N J (1984) *Critical Rev Biochem* **15**: 125-199
23. Biernat J, Ciesiołka J, Górnicki P, Adamiak R W, Krzyżosiak W J, Wiewiórowski M (1978) *Nucleic Acid Res* **5**: 789-804
24. Krzyżosiak W J, Biernat J, Ciesiołka J, Górnicki P, Wiewiórowski M (1979) *Polish J Chem* **53**: 243-252
25. O'Neil I, Barbin A, Friesen M, Bartsch H (1986) W: Singer B, Bartsch H (red) *The role of cyclic nucleic acid adducts in carcinogenesis and mutagenesis*. IARC, Lyon str: 57-76
26. Guengerich F P, Raney V M (1992) *J Am Chem Soc* **114**: 1074-1080
27. Kuśmierzek J T, Singer B (1982) *Biochemistry* **21**: 5717-5722
28. Sattangi P D, Leonard N J, Frihart C R (1977) *J Org Chem* **42**: 3292-3296
29. Boryski J (1990) *Nucleosides Nucleotides* **9**: 803-813
30. Kuśmierzek J T, Singer B (1992) *Chem Res Toxicol* **5**: 634-638
31. Kuśmierzek J T, Jensen D E, Spengler S J, Stolarzski R, Singer B (1986) *J Org Chem* **52**: 2374-2378
32. Kuśmierzek J T, Folkman W, Singer B (1989) *Chem Res Toxicol* **2**: 230-233
33. Li F, Segal A, Solomon J J (1992) *Chem-Biol Interact* **83**: 35-54
34. Guengerich F P (1992) *Chem Res Toxicol* **5**: 2-5
35. Kimura K, Nakanishi M, Yamamoto T, Tsuboi M (1977) *J Biochem* **81**: 1699-1703
36. Kayasuga-Mikado K, Hasimoto T, Neigishi T, Neigishi K, Hayatsu H (1980) *Chem Pharm Bull* **28**: 932-938
37. Dayn A, Malkosyian S, Duzhy D, Lyamichev V, Panchenko Y, Mirkin S (1991) *J Bacteriol* **173**: 2658-2664

38. Vogt N, Marrot L, Rousseau N, Malfoy B, Leng M (1988) *J Mol Biol* **201**: 773-776
39. Kohwi Y, Kohwi-Shigenmatsu T (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 3781-3788
40. Schwartz A, Marrot L, Leng M (1989) *J Mol Biol* **207**: 445-450
41. Watson W P, Crane A E (1989) *Mutagenesis* **4**: 75-77
42. Szyfter K, Hemminaki K, Crane A E, Watson W P (1991) *Chem-Biol Interactions* **80**: 99-107
43. Laib R J (1986) W: Singer B, Bartsch H (red) *The role of cyclic nucleic acid adducts in carcinogenesis and mutagenesis*. IARC, Lyon str: 101-108
44. Green T, Hathway D E (1978) *Chem-Biol Interact* **22**: 211-223
45. Fedtke N, Boucheron J A, Turner M J Jr, Swenberg J A (1990) *Carcinogenesis* **8**: 1279-1285
46. Fedtke N, Boucheron J A, Walker V E, Swenberg J A (1990) *Carcinogenesis* **11**: 1287-1290
47. Young T L, Santanella R M (1989) *Carcinogenesis* **9**: 589-592
48. Eberle G, Barbin A, Laib R J, Ciroussel F, Thomale J, Bartsch H, Rajewsky M F (1989) *Carcinogenesis* **10**: 209-212
49. Ciroussel F, Barbin A, Eberle G, Bartsch H (1990) *Biochem Pharmacol* **39**: 1109-1113
50. Foiles P G, Miglietta L M, Nishikawa A, Kuśmierk J T, Singer B, Chung F-L (1993) *Carcinogenesis* **14**: 113-116
51. Huberman E, Bartsch H, Sachs L (1975) *Int J Cancer* **16**: 639-644
52. Rannug U, Gothe R, Wachtmeister C A (1976) *Chem-Biol Interact* **12**: 251-263
53. Hussain S, Osterman-Golkar S (1976) *Chem-Biol Interactions* **12**: 265-267
54. Elmore J D, Wong J L, Laumbach A D, Streips U N (1976) *Biochim Biophys Acta* **442**: 405-419
55. Barbin A, Besson F, Perrard M-H, Bereziat J-C, Kaldor J, Michel G, Bartsch H (1985) *Mutat Res* **152**: 147-156
56. McCann J, Simmon V, Streitwieser D, Ames B (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 3190-3193
57. Mroczkowska M M, Kolasa I K, Kuśmierk J T (1993) *Mutagenesis* **8**: 341-348
58. Negishi K, Oohara K, Urushidani H, Ohara Y, Hayatsu H (1986) W: Singer B, Bartsch H (red) *The role of cyclic nucleic acid adducts in carcinogenesis and mutagenesis*. IARC, Lyon str: 293-299.
59. Mroczkowska M M, Kuśmierk J T (1991) *Mutagenesis* **6**: 385-390
60. Zajdela F, Croisy A, Barbin A, Malaveille C, Tomatis L, Bartsch H (1980) *Cancer Res* **40**: 352-356
61. Van Duuren B L, Goldschmidt B M, Loewengart G, Smith A C, Melchlonne S, Seldman I, Roth D (1979) *J Natl Cancer Inst* **63**: 1433-1439
62. Barbin A, Laib R J, Bartsch H (1985) *Cancer Res* **45**: 2440-2444
63. Singer B, Abbot L G, Spengler S J (1984) *Carcinogenesis* **5**: 1165-1171
64. Spengler S, Singer B (1981) *Nucleic Acid Res* **9**: 365-373
65. Revich G G, Beattie K L (1986) *Carcinogenesis* **7**: 1569-1576
66. Jacobsen J S, Humayun M Z (1990) *Biochemistry* **29**: 496-504
67. Jacobsen J S, Perkins C P, Callahan J T, Sambamurti K, Humayun M Z (1989) *Genetics* **121**: 213-222
68. Wiseman R W, Stowers S J, Miller E C, Anderson M W, Miller J A (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 5825-5829
69. Kuśmierk J T, Singer B (1982) *Biochemistry* **21**: 5723-5728
70. Barbin A, Bartsch H, Lecomte P, Radman M (1981) *Nucleic Acids Res* **9**: 375-387
71. Singer B, Kuśmierk J T, Fraenkel-Conrat H (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 969-972
72. Hall J A, Saffhill R, Green T, Hathway D E (1981) *Carcinogenesis* **2**: 141-146
73. Simha D, Palejwala V A, Humayun M Z (1991) *Biochemistry* **30**: 8727-8735
74. Palejwala V A, Simha D, Humayun M Z (1991) *Biochemistry* **30**: 8736-8742
75. Singer B, Spengler S J, Chavez F, Kuśmierk J T (1987) *Carcinogenesis* **8**: 745-747
76. Mroczkowska M M, Kuśmierk J T (1993) *Z Naturforsch* **48c**: 63-67
77. Singer B, Kuśmierk J T, Folkman W, Chavez F, Dosanjh M K (1991) *Carcinogenesis* **12**: 745-747
78. Cheng K C, Preston B D, Cahill D S, Dosanjh M K, Singer B, Loeb L A (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9974-9978
79. Lawley P D, Warren W (1976) *Chem-Biol Interact* **12**: 211-220
80. Oesch F, Adler S, Rettelbach R, Doerjter G (1986) W: Singer B, Bartsch H (red) *The role of cyclic nucleic acid adducts in carcinogenesis and mutagenesis*. IARC, Lyon str: 373-379
81. Rydberg B, Dosanjh M K, Singer B (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6839-6842
82. Rydberg B, Qiu Z-H, Dosanjh M K, Singer B (1992) *Cancer Res* **52**: 1377-1379
83. Singer B, Antoccia A, Basu A K, Dosanjh M K, Frankel-Conrat H, Gallagher P E, Kuśmierk J T, Qiu Z-H, Rydberg B (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9386-9390
84. Matijasevic Z, Sekiguchi M, Ludlum D B (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9331-9334
85. Habraken Y, Carter C A, Sekiguchi M, Ludlum D B (1991) *Carcinogenesis* **12**: 1971-1973
86. Lindhal T, Sedgwick B, Sekiguchi M, Nakabep-pu Y (1988) *Ann Rev Biochem* **57**: 133-157
87. Śledziwska-Gójska E, Grzesiuk E, Płachta A, Janion C (1992) *Mutagenesis* **7**: 41-46
88. Cieśla Z, O'Brien P, Clark A J (1987) *Mol Gen Genet* **207**: 1-8

## 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 status studenta winni wносить roczną opłatę w wysokości 50 000 zł.

Zachęcamy także do zaprenumerowania „Postępów Biochemii”.

# Funkcja białkowych kinaz tyrozynowych podczas aktywacji płytek krwi

## Role of protein tyrosine kinases during platelets activation

Urszula Kralisz\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa niereceptorowych kinaz tyrozynowych
- III. Zawartość i lokalizacja białkowych kinaz tyrozynowych w płytkach krwi
- VI. Wytwarzanie kompleksów kinaz tyrozynowych z receptorami błonowymi
- V. Udział GpIIb-IIIa w fosforylacji tyrozyny w białkach
- VI. Mechanizm aktywacji kinaz tyrozynowych przez GpIIb-IIIa
- VII. Identyfikacja substratów białkowych kinaz tyrozynowych
- VIII. Uwagi końcowe

### Contents:

- I. Introduction
- II. Structure of nonreceptor tyrosine kinases
- III. Concentration and localization of protein tyrosine kinases in platelets
- IV. Association of tyrosine kinases with membrane receptors
- V. Role of GpIIb-IIIa in protein tyrosine phosphorylation
- VI. Mechanism of activation of tyrosine kinases by GpIIb-IIIa
- VII. Identification of tyrosine kinases substrates
- VIII. Concluding remarks

**Wykaz stosowanych skrótów:** EGF—naskórkowy czynnik wzrostowy (ang. *Epidermal Growth Factor*); PDGF—czynnik wzrostowy pochodzący z płytek (ang. *Platelet Derived Growth Factor*); PAF—czynnik aktywujący płytki (ang. *Platelet Activating Factor*); PLC- $\gamma$ —fosfoliaza c- $\gamma$ ; pp—fosfoproteina; GAP—białko aktywujące GTPazę (ang. *GTPase activating protein*); IP<sub>3</sub>—trifosforan inozytolu (ang. *inositol triphosphate*); RSV—wirus mięsaka Rausa (ang. *Rous sarcoma virus*); Gp—glikoproteina; SH— (ang. *src-homology*); vWF—czynnik von Willebranda (ang. *von Willebrand Factor*); kinaza PI-3—kinaza 3'-fosfatydyloinozytolu (ang. *PI-3 kinase*).

### I. Wstęp

Białkowe kinazy tyrozynowe, selektywnie fosforylujące tyrozynę w białkach, biorą udział w regulowaniu normalnego wzrostu i rozwoju komórek oraz w procesach ich transformacji wywołanej przez większość retrowirusów [1-6].

Wysoka zawartość białkowych kinaz tyrozynowych w płytkach krwi, a także w innych w pełni zróżnicowanych komórkach (np. neurony czy neutrofile), nie jest związana z procesami różnicowania się i wzrostu [7-9]. Coraz więcej danych doświadczalnych wskazuje na udział kinaz tyrozynowych w przewodzeniu informacji w komórce, umożliwiając jej prawidłową odpowiedź na działanie wielu fizjologicznych stymulatorów. Mechanizm przewodzenia informacji w płytkach krwi za pośrednictwem białkowych kinaz tyrozy-

nowych jest słabo poznany mimo tego, że są one doskonałym obiektem do tego typu badań. Odpowiedzi płytek na działanie wielu aktywatorów takich jak, np. trombina, ADP, kolagen, płytkowy czynnik aktywujący (PAF) towarzyszy gwałtowna fosforylacja reszt tyrozynowych w białkach [10-15].

Kinazy tyrozynowe występujące w płytkach krwi należą do klasy kinaz niereceptorowych. Budowa i działanie kinaz receptorowych, których przykładami są receptory czynników wzrostowych i insuliny została omówiona uprzednio na łamach *Postępów Biochemii* [16-17].

Celem tego artykułu jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy o białkowych kinazach tyrozynowych występujących w płytkach krwi ze szczególnym uwzględnieniem ich funkcji w przewodzeniu informacji wewnątrz komórki.

### II. Budowa niereceptorowych kinaz tyrozynowych

Niereceptorowe kinazy tyrozynowe nie zawierają domeny zewnątrzkomórkowej zdolnej do wiązania ligandu i domeny transbłonowej. Kinazy te występują w cytoplazmie komórek i mogą łączyć się z niektórymi receptorami błonowymi, rozpoznając krótką sekwencję ich domen cytoplazmatycznych [3, 18-19]. N-końcowy aminokwas kinaz połączony jest wiązaniem amidowym z resztą mirystynową, która zwiększa hydrofobowość tego regionu i ułatwia połączenie cząsteczki z błoną [3, 16]. Wszystkie niereceptorowe

\* Dr, Zakład Biofizyki, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna, ul. Lindleya 3, 90-131 Łódź

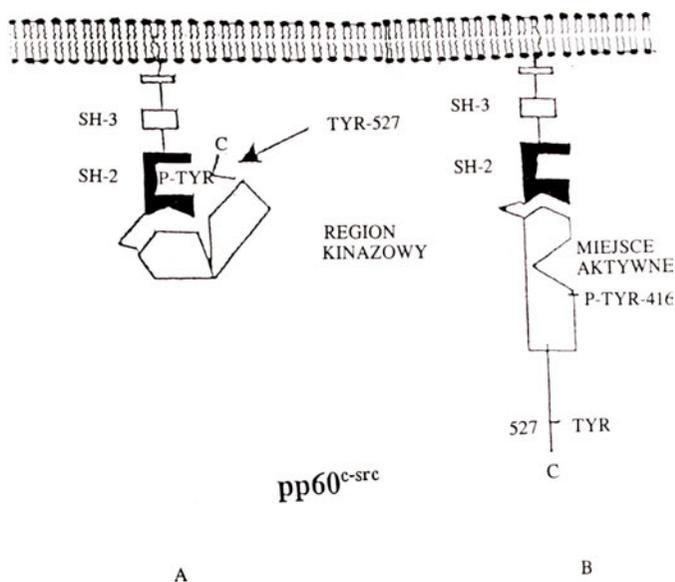
białkowe kinazy tyrozynowe zawierają bardzo podobną domenę utworzoną z 250-300 reszt aminokwasowych, odpowiedzialną za aktywność enzymatyczną. Białka kodowane przez geny rodziny *src*, które są najlepiej poznanymi kinazami niereceptorowymi, zawierają dwa krótkie regiony o wysokiej homologii nazwane regionami SH-2 i SH-3 (SH-ang. *src* homology). Regiony te występują również w niektórych białkach nie wykazujących aktywności kinaz tyrozynowych, np. w fosfolipazie C $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) czy w białku GAP (GTPase activating protein). Region SH-3 występuje z kolei w białkach wiążących aktyne, np. w spektrynie i miozynie. Ponieważ delecja regionu SH-3 eliminuje wiązanie się tych białek z aktyną oraz wywołuje transformację komórek wydaje się, że region SH-3 odpowiada za połączenie kinaz z białkami cytoszkieletu. Region SH-2 kinazy uczestniczy w represji aktywności kinazowej, a region SH-2 substratu np. PLC- $\gamma$ , jest miejscem rozpoznającym fosfotyrozynę w kinazie. Segment GSFLVRES regionu SH-2 stanowi minimalną sekwencję zdolną do rozpoznawania fosfotyrozyny [3, 20].

Transformujące białko wirusowe pp60<sup>v-src</sup>, ma znacznie większą aktywność kinazy tyrozynowej niż jego normalny komórkowy analog, białko pp60<sup>c-src</sup>. Porównanie budowy tych dwóch białek umożliwiło znalezienie mechanizmu regulującego ich aktywność.

W C-końcowym regionie białka pp60<sup>c-src</sup> w pozycji 527 znajduje się ufosforylowana tyrozyna. Defosforylacja Tyr 527 zwiększa aktywność kinazową. Białko pp60<sup>v-src</sup> w tej pozycji zawiera fenyloalaninę. Punktowa mutacja Tyr-Phen uniemożliwiająca fosforylację białka w pozycji 527 jest więc przyczyną zwiększonej aktywności pp60<sup>v-src</sup>. Wg. ostatnio wysuniętej hipotezy działania kinazy pp60<sup>c-src</sup> domena SH-2 wiąże C-końcowy region tej samej cząsteczki kinazy w miejscu, gdzie występuje ufosforylowana Tyr 527 (*head to tail self association*) [3], co przedstawiono na (Ryc. 1). Połączenie takie uniemożliwia łączenie kinazy z substratem. Reszty Tyr 527 są całkowicie ufosforylowane *in vivo*, co wyjaśnia obniżoną aktywność pp60<sup>c-src</sup>. Kinaza fosforylująca pp60<sup>c-src</sup>, nazywana kinazą c-src, została wyizolowana z mózgu płodów szczura. Charakteryzuje się ona niezwykle wysoką specyficznością — fosforyluje tylko Tyr 527 białka pp60<sup>c-src</sup>; nie fosforyluje innych substratów i innych reszt tyrozynowych [21]. Kinaza pp60<sup>c-src</sup> także zawiera Tyr 416, która również uczestniczy w regulowaniu aktywności cząsteczki. Autofosforylacja Tyr 416, (Tyr 416 jest zupełnie zdefosforylowana *in vivo*) zwiększa aktywność kinazy pp60<sup>c-src</sup> [3].

### III. Zawartość i lokalizacja białkowych kinaz tyrozynowych w płytkach krwi

Dotychczas poznane geny kodujące niereceptorowe kinazy tyrozynowe zawarte są w tabeli 1. Kinazy tyrozynowe występujące w płytkach krwi należą do



Ryc. 1. Schemat ilustrujący aktywację kinazy pp60<sup>c-src</sup> (wg Cantley i wsp. [3], zmodyfikowano). W cząsteczce kinazy nieaktywnej (A) Tyr 527 jest ufosforylowana, co powoduje jej wiązanie z regionem SH-2 tej samej cząsteczki. W kinazie aktywnej (B) defosforylacja Tyr 527 uniemożliwia wytwarzanie wewnętrznych kompleksów w cząsteczce kinazy; region SH-2 kinazy jest więc uwolniony i może łączyć się z substratem.

białek kodowanych przez geny rodziny *src* i *fak* [22-26]. W płytkach krwi stwierdzono obecność następujących ich produktów—pp60<sup>c-src</sup>, pp60<sup>lyn</sup>, pp62<sup>yes</sup>, pp61<sup>hck</sup>, pp54/58<sup>lyn</sup>, pp125<sup>fak</sup>, [7, 25-26]. Zawartość kinazy pp60<sup>c-src</sup> w płytkach jest szczególnie wysoka i stanowi 0.2-0.4% wszystkich białek płytkowych [7, 11]. Stężenie pp60<sup>c-src</sup> w płytkach krwi jest prawie takie samo jak w limfocytach krwi obwodowej, komórkach nerwowych (mózg szczura), fibroblastach mysich transformowanych wirusem mięsaka Rausa (*Rous sarcoma virus*, RSV), ale jest kilkadziesiąt razy wyższe niż w mięśniach, nerce, grasicy, erytrocytach i aż 150 razy wyższe niż w fibroblastach [11]. Wysoki poziom pp60<sup>c-src</sup> w płytkach krwi odpowiada za dużą ilość białek płytkowych zawierających ufosforylowaną tyrozynę. Stanowią one aż 80% wszystkich ufosforylowanych białek błony cytoplazmatycznej. Dla porównania w fibroblastach i błonach erytrocytarnych białka z ufosforylowanymi resztami tyrozynowymi stanowią odpowiednio 0.3% i 13% wszystkich fosforylowanych białek [7]. Zawartość pozostałych białkowych kinaz tyrozynowych w płytkach krwi jest znacznie niższa. Kinazy pp60<sup>lyn</sup> i pp62<sup>yes</sup> występują w ilościach około 5-10 razy mniejszych niż pp60<sup>c-src</sup>. Ilość ta jest 20-40 razy większa niż w fibroblastach [25-27]. Dostępność

#### Tabela 1.

Przykłady genów kodujących niereceptorowe białkowe kinazy tyrozynowe

1. rodzina <i>src</i>	<i>src</i> , <i>yes</i> , <i>fgr</i> , <i>fyn</i> , <i>lyn</i> , <i>lck</i> , <i>hck</i> , <i>blk</i>
2. rodzina <i>fes</i>	<i>fer</i> , <i>fes</i> / <i>fps</i>
3. rodzina <i>abl</i>	<i>abl</i> , <i>arg</i>
4. rodzina <i>fak</i>	<i>fak</i>

Opracowano na podstawie (22-24)

i łatwość izolowania płytek krwi oraz duża w nich zawartość kinazy pp60<sup>c-src</sup> umożliwiła wyodrębnienie tego enzymu przez F e d e r i B i s h o p a [28]. Autorzy ci otrzymali 0.5 mg kinazy z 30 koncentratów płytkowych (około  $3 \times 10^{12}$  płytek). Wyizolowane białko o masie 60 kDa odznaczało się dużą czystością. Pozbawione było nie tylko zawartości innych białek, ale również proteolitycznych produktów degradacji o masie 47-57 kDa, które nieodłącznie mu towarzyszą [29]. Charakterystyka wyizolowanej kinazy podana jest w tabeli 2. Porównanie wyizolowanego preparatu pp60<sup>c-src</sup> z płytek krwi z kinazami innych komórek jest jak dotychczas niemożliwe z powodu różnej czystości otrzymanych enzymów oraz stosowania odmiennych warunków doświadczalnych [28-30].

Badania lokalizacji pp60<sup>c-src</sup> w płytkach krwi przy

**Tabela 2.**

Charakterystyka kinazy pp60<sup>c-src</sup> z płytek krwi.

Mcz	szybkość fosforylacji enolazy	donory grupy fosforanowej	wymagania jonowe
60 kDa	25 nMol P x min <sup>-1</sup> x mg <sup>-1</sup>	ATP GTP	Mg <sup>+2</sup> 20 mmol Mn <sup>+2</sup> 3 mmol

Opracowano wg. [28]

użyciu przeciwciał wykazały, że występuje ono tuż pod powierzchnią błony komórkowej oraz w pobliżu błon systemu kanalikowego związanego z powierzchnią [31]. Taka lokalizacja doskonale umożliwia pp60<sup>c-src</sup> przewodzenie informacji od transbłonowych białek receptorowych do wnętrza komórki.

Białko pp125<sup>lak</sup> zawiera domenę kinazową, ale w odróżnieniu od białek kodowanych przez geny *src*, nie zawiera domen SH-2 i SH-3 [24]. Lokalizacja tego białka oraz jego zawartość w płytkach nie jest jeszcze poznana.

#### IV. Wytwarzanie kompleksów kinaz tyrozynowych z receptorami błonowymi

Ponieważ aktywacja płytek krwi wywołuje gwałtowny wzrost fosforylacji wielu białek uważa się, że kinazy odpowiedzialne za ich fosforylacje są stymulowane przez białka receptorowe. Typowym przykładem takiej stymulacji jest oddziaływanie pp56<sup>lck</sup> z receptorami CD 4 i CD 8 w limfocytach, w wyniku którego kinaza tworzy niekowalencyjny kompleks z cytoplazmatyczną domeną receptorów. Przeciwciała wiążące się z receptorami wywołują wzrost aktywności kinazowej pp56<sup>lck</sup>, co z kolei powoduje fosforylacje tyrozyny wielu białek wewnątrzkomórkowych [18-19].

W płytkach krwi kinazy pp60<sup>lyn</sup>, pp<sup>54/58lyn</sup> i pp62<sup>yes</sup> łączą się z glikoproteiną IV (GpIV/CD 36) i taki kompleks można znaleźć w immunoprecypitatach otrzymanych po użyciu przeciwciał dla GpIV [26]. Wytwarzanie kompleksów tych kinaz z GpIV sugeruje, iż pełnią one funkcję w przewodzeniu informacji podczas interakcji GpIV z ligandami, którymi naj-

prawdopodobniej są kolagen i trombospondyna [32-34]. GpIV tworzy kompleksy z tymi samymi kinazami w komórkach czerniaka C 32 i komórkach erytroleukemicznych [26]. O stabilności kompleksów GpIV z kinazami świadczy ich trwałość w buforach zawierających jonowe i niejonowe detergenty, a o specyficzności fakt, że inne glikoproteiny płytkowe, np. GpIIb-IIIa, których zawartość w błonie przewyższa około 4 krotnie GpIV, nie tworzyły podobnych połączeń. F e d e r i B i s h o p [35] zidentyfikowali cztery białka błonowe o masach 32, 50, 92 i 105 kDa, które łączyły się ze znakowanymi peptydami pochodzącymi z N-końcowego odcinka kinazy pp60<sup>c-src</sup>. Nie podano bliższej charakterystyki tych białek oraz nie udowodniono, że łączą się one z rodzimą cząsteczką kinazy. Tak więc, dotychczas wykazano, że z wielu receptorów występujących w błonie cytoplazmatycznej, jedynie GpIV łączy się z kinazami tyrozynowymi. Cytoplazmatyczna domena GpIV odpowiedzialna za połączenie z kinazami nie została dotychczas zidentyfikowana. Odcinek C-końcowy łańcucha białkowego GpIV posiada motyw sekwencji Cys-X-Cys-zasadowy aminokwas-X-zasadowy aminokwas-X-X-Lys, który jest taki sam jak motyw sekwencji receptora CD 4 i CD 8 w limfocytach. Motyw ten jest odpowiedzialny za wiązanie receptora CD 4 i CD 8 z dwiema grupami sulfhydrylowymi występującymi w kinazie pp56<sup>lck</sup>. Kinazy płytkowe nie zawierają jednak wolnych grup sulfhydrylowych i najprawdopodobniej ich łączenie z GpIV nie przebiega zgodnie z mechanizmem opisanym dla limfocytów [19, 36].

#### V. Udział GpIIb-IIIa w fosforylacji tyrozyny w białkach

GpIIb-IIIa, integryna  $\alpha_{11b}\beta_3$  jest specyficznym dla płytek receptorem, odgrywającym zasadniczą rolę podczas adhezji i agregacji [37]. Stężenie GpIIb-IIIa w błonie komórkowej wielokrotnie przewyższa zawartość innych glikoprotein. Na powierzchni nieaktywowanych płytek występuje około 40 000 cząsteczek GpIIb-IIIa, 10 000 cząsteczek GpIV i 1 000 cząsteczek GpIa-IIa [38-41]. GpIIb-IIIa swoiście wiąże wiele ligandów białkowych zawierających sekwencje RGD, tj. głównie fibrynogen, a także czynnik von Willebranda (vWF), fibronektynę i witronektynę [42-45]. Wiązanie fibrynogenu i czynnika vWF z GpIIb-IIIa jest niezbędne dla normalnej adhezji i agregacji płytek krwi [46-47]. Płytki nieaktywowane nie wiążą tych białek, pomimo występowania w ich błonie wielu cząsteczek GpIIb-IIIa. Dopiero po aktywacji płytek trombiną, ADP czy kolagenem wywołane zostają w cząsteczce GpIIb-IIIa zmiany konformacyjne, które powodują udostępnienie miejsc receptorowych dla wspomnianych ligandów [43-46, 48]. Mechanizmy odpowiedzialne za aktywację GpIIb-IIIa nie są dokładnie poznane. Jednym z nich może być bezpośrednia fosforylacja cytoplazmatycznej domeny kompleksu

GpIIb-IIIa. Rzeczywiście wykazano, że podjednostka GpIIIa zawiera ufosforylowaną serynę i treoninę po aktywacji płytek trombiną i nadtlenkami prostaglandyn [49], ale bardzo niska wydajność tej reakcji (około 2-4% cząsteczek ufosforylowanych) i brak zależności od przyłączania fibrynogenu z receptorem wskazuje na jej znikome znaczenie fizjologiczne [50]. Cytoplazmatyczna domena GpIIIa zawiera Tyr w pozycji 747, która ze względu na podobne sąsiedztwo aminokwasowe do tego, które otacza reszty Tyr ufosforylowane w receptorach EGF i insuliny, może być kandydatem do fosforylacji [51-52]. Tyr 747 była ufosforylowana po inkubacji wyizolowanej GpIIIa z  $\gamma$ -ATP, ale jak dotychczas nie wykazano fosforylacji Tyr 747 w całych płytkach [49-50]. Doświadczenia z zastosowaniem tyrfostyny, inhibitora kinaz tyrozynowych, również nie dostarczyły przekonujących dowodów wskazujących na bezpośrednią rolę kinaz w regulowaniu aktywacji GpIIb-IIIa [53]. Wyniki doświadczeń wskazują na zależność odwrotną, tj. na regulowanie aktywności kinaz przez GpIIb-IIIa. GpIIb-IIIa reguluje fosforylację tyrozyny w trzech białkach o mcz. 126, 108 i 100 kDa w płytkach stymulowanych trombiną [13, 14]. Świadczą o tym następujące dane:

1. Peptydy RDGS i H12 oraz przeciwciała blokujące wiązanie łańcuchów  $\alpha$  i  $\gamma$  fibrynogenu z GpIIb-IIIa hamowały fosforylację tych białek,
2. Fosforylacji tych białek nie obserwowano w płytkach osób chorych z Trombastenią Glanzmanna, charakteryzujących się brakiem lub obniżoną liczbą GpIIb-IIIa, oraz w płytkach, gdzie natywny receptor rozdysocjowano za pomocą EDTA.

Aktywacja GpIIb-IIIa i wiązanie fibrynogenu nie są wystarczające do fosforylacji tych białek, ponieważ nie obserwowano jej wtedy, gdy płytki nie agregowały bez mieszania w kuwecie agregacyjnej. Tak więc, zależny od obecności receptora GpIIb-IIIa kontakt między płytkami podczas agregacji, wywołany aktywacją GpIIb-IIIa i związaniem fibrynogenu, jest niezbędny dla fosforylacji tych trzech białek.

Następnego przykładu udziału GpIIb-IIIa w aktywacji białkowych kinaz tyrozynowych dostarczyły doświadczenia z komórkami embrionalnymi ludzkich nerek (HEK 293). Komórki te po transfekcji cDNA dla podjednostek  $\alpha_{11b}$  i  $\beta_3$ , nabierały zdolność przylegania do fibrynogenu. Towarzyszyła temu fosforylacja tyrozyny w białku o masie 125 kDa. Adhezji tych komórek do kolagenu, pośredniczonej przez integrynę  $\alpha_3\beta_1$ , towarzyszyła fosforylacja białka o tej samej masie cząsteczkowej [54]. Adhezja płytek krwi do kolagenu również była połączona ze specyficzną fosforylacją białka o masie 120 kDa [55]. Przypuszcza się, że to fosforylowane białko może odpowiadać ostatnio opisaną przez Schaller i w s p. kinazie tyrozynowej nazwanej pp125<sup>fa</sup> (*focal adhesion kinase*) [24].

Adhezji komórek raka nabłonka (*human epidermoid carcinoma cells*, *KB cells*), oraz fibroblastów myszy i szczura do kolagenu, fibronektyny, lamininy i wit-

ronektyny towarzyszyła fosforylacja kinazy pp125<sup>fa</sup> [56, 57]. Fosforylacja była zależna od integryn obecnych na powierzchni tych komórek, a w przypadku komórek raka nabłonka głównie integryn zawierających podjednostki  $\alpha_3$  i  $\beta_1$  [58].

Fosforylacja kinazy pp125<sup>fa</sup> jest więc specyficzną odpowiedzią na sygnał przekazywany przez integryny, w tym receptora GpIIb-IIIa, podczas adhezji wielu typów komórek do różnych substratów. Fosforylacja tej kinazy w płytkach krwi, jak wykazały ostatnio badania L i p f e r t a i w s p. [59], jest silnie związana z aktywacją GpIIb-IIIa tj. z wiązaniem fibrynogenu i agregacją płytek.

## VI. Mechanizm aktywacji kinaz tyrozynowych przez GpIIb-IIIa

Mechanizm aktywacji białkowych kinaz tyrozynowych przez integrynę  $\alpha_{11b}$  i  $\beta_3$  (GpIIb-IIIa) nie jest wyjaśniony. Ponieważ nie wykazano bezpośrednio połączenia tej integryny z kinazami [13, 25] uważa się, że w aktywacji kinaz biorą udział cząsteczki pośredniczące. Fosforylacja białka o masie 125 kDa, zależna od GpIIb-IIIa, uwarunkowana była mobilizacją wewnątrzkomórkowego wapnia [54]. Jony wapnia są z kolei uwalniane przez 1, 4, 5-trifosforan inozytolu (IP<sub>3</sub>), który powstaje dzięki aktywacji fosfolipazy c- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) i kinazy PI-3 [60, 61]. Enzymy te są powiązane z cytoszkieletem płytki, a ich zawartość we frakcji cytoszkieletu zwiększa się kilkukrotnie po aktywacji płytek [62, 63]. Aktywacja płytek wywołuje również translokację pp60<sup>c-src</sup>, przypuszczalnego regulatora aktywności tych enzymów, do frakcji cytoszkieletu [3, 6, 63, 64]. W związku z tym, że GpIIb-IIIa wiąże się z białkami cytoszkieletu [59, 65] wielu autorów sugeruje rolę białek systemu cytoszkieletarnego w pośredniczeniu aktywacji białkowych kinaz tyrozynowych [53, 55, 63, 66]. Przemawia za tym również występowanie na powierzchni wielu komórek podczas ich adhezji do różnych substratów tzw. ognisk adhezji (ang. *focal adhesions*), w których gromadzą się integryny, białka cytoszkieletu i skupiska ufosforylowanych białek [24, 56].

Zaznaczyć należy, że białka cytoszkieletu nie są jedynie miejscem gdzie przebiegają te reakcje, ale biorą one aktywny w nich udział. Aktywacja płytek wywołuje ich reorganizację, a wiele z nich jest substratami kinaz białkowych, głównie serynowo-treoninowych [67-68].

## VII. Identyfikacja substratów białkowych kinaz tyrozynowych

Technika zwana „pułapkowaniem kinaz”, wykorzystująca stabilność kompleksów kinaz ze swoimi substratami, umożliwia identyfikację substratów wraz z kinazami odpowiedzialnymi za ich fosforylację. Technika ta polega na immunoprecypitacji całego kom-

pleksu utworzonego przez kinazę z substratem za pomocą przeciwciał dla jednego z białek kompleksu. Po raz pierwszy, stosując przeciwciała dla GAP, zastosowano ją do wyodrębnienia kompleksu przewodzącego informację podczas działania PDGF na fibroblasty. W skład tego kompleksu wchodzi: receptor PDGF, PLC, kinaza PI-3, kinaza Raf-1, serynowo-treoninowa i białko GAP [2, 6, 69]. Zastosowanie przeciwciał przeciwko GAP pozwoliło na wyodrębnienie kompleksu kinaz wraz z substratami biorącymi udział w przewodzeniu informacji podczas stymulacji płytek trombiną. W kompleksie tym poza białkiem GAP znajdowały się trzy kinazy tyrozynowe pp60<sup>lyn</sup>, pp54/58<sup>lyn</sup>, pp62<sup>yes</sup> oraz dwa białka o masach 59 i 68 kDa. Wszystkie te białka miały ufosforylowaną tyrozyne, a obecność w/w kinaz w otrzymanym kompleksie sugeruje, że są one odpowiedzialne za ich fosforylację. Inny kompleks, powstający również podczas działania trombiny na płytkę, utworzony z kinazy pp60<sup>c-src</sup> i pp54/58<sup>lyn</sup> z kinazą PI-3 wyizolowano stosując do immunoprecypitacji przeciwciała przeciwko kinazom tyrozynowym. Kinazy te są najprawdopodobniej odpowiedzialne za regulowanie aktywności kinazy PI-3, poprzez jej fosforylację [63, 66, 70]. Znaczną rolę w tworzeniu tych kompleksów przypisuje się białkom cytoszkieletu.

### VIII. Podsumowanie

W pracy tej dokonano przeglądu bieżących wiadomości dotyczących białkowych kinaz tyrozynowych w płytkach krwi. Dane doświadczalne, omówione tutaj, wskazują na ogromną rolę kinaz tyrozynowych w przewodzeniu informacji w płytkach krwi, umożliwiając im odpowiedź na działanie zewnątrzkomórkowych stymulatorów. Bezpośrednia aktywacja kinaz, polegająca na ich połączeniu się z receptorem, jest odpowiedzialna za przesyłanie informacji od GpIV, receptora kolagenu i trombospondyny. Pośrednia aktywacja kinaz, nie wymagająca łączenia się kinaz z receptorem, ale wymagająca min. białek cytoszkieletu jako pośredników pomiędzy receptorem a kinazami, odpowiada za przesyłanie informacji od GpIIb-IIIa. Uaktywnione kinazy, działając w sposób kaskadowy, wywołują aktywację wielu enzymów i w końcowym efekcie doprowadzają do fizjologicznych odpowiedzi płytek, takich jak np. adhezja czy agregacja. Pomimo ogromnego postępu badań informacje o udziale kinaz tyrozynowych w regulacji funkcji płytek są ciągle niepełne. W chwili obecnej większość białek zawierających ufosforylowaną tyrozyne określa się przez podanie mas cząsteczkowych. Tylko niektóre z tych białek zostały zidentyfikowane np. GAP czy białka kodowane przez geny *src*. Tak więc jednym z ważnych celów przyszłych badań będzie identyfikacja substratów kinaz tyrozynowych.

Artykuł otrzymano 24 listopada 1993 r.  
Zaakceptowano do druku 4 stycznia 1994 r.

### Piśmiennictwo

1. Setfton BM, Hunter T, Beemon K, Eckhart W (1980) *Cell* **20**: 807-816
2. Yarden Y, Axel U (1988) *Biochemistry* **27**: 3113-3118
3. Cantley L C, Auger K R, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S (1991) *Cell* **64**: 281-302
4. Hamaguchi M, Hanafusa H (1987) *Cell Biol* **84**: 2312-2313
5. Gomez-Cambronero J, Haang Ch-K, Bonak VA, War E, Casnellie JE, Shiraishi T, Sha'afi RJ (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **162**: 1478-1481
6. Ulrich A, Schlessinger J (1990) *Cell* **61**: 203-212
7. Golden A, Nemeth SP, Brugge JS (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 852-856
8. Berkov RL, Dodson RW, Kraft AS (1989) *Biochem Biophys Acta* **997**: 292-302
9. Brugge JS, Cotton PC, Queral AF, Barret JV, Nonner D, Keane R W (1985) *Nature (Lond)* **316**: 554
10. Ferrel JE, Martin SG (1988) *Mol Cell Biol* **8**: 3603-3610
11. Golden A, Brugge JS (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 901-905
12. Nakamura S, Yamamura H (1989) *J Biol Chem* **264**: 7089-7091
13. Ferrel JE, Martin SG (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2234-2238
14. Golden A, Brugge JS, Shattil SJ (1990) *J Cell Biol* **111**, 3117-3127
15. Dhar A, Paul AK, Shakla SD (1990) *Mol Pharmacol* **37**: 519-529
16. Kamińska B (1989) *Post Bioch* **35**: 219-230
17. Jakubowicz T, Gąsior E (1993) *Post Bioch* **39**: 2-7
18. Turner JM, Brodsky MH, Irving BA, Levin SD, Perlmutter R M, Littman DR (1990) *Cell* **60**: 755
19. Yoshida H, Koga Y, Nakamura K, Kimura G, Nomoto K (1992) *Biochim Biophys Acta* **1137**: 321-33
20. Hidaka M, Hommsa Y, Takenawa T (1991) *Biochim Biophys Res Commun* **180**: 1490-1497
21. Okada M, Nakagawa H (1989) *J Biol Chem* **264**: 20886-20893
22. Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988) *Science* **241**: 42-52
23. Chang Ch - J, Geahlen RL (1992) *J Natural Products* **54**: 1529-1560
24. Schaller MD, Borgman CA, Cobbs BS, Reynolds Ab, Parsons JT (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5192-5196
25. Horak JD, Corcoran ML, Thompson PA, Wahl LM, Bolen JB (1990) **5**: 597-602
26. Huang M-M, Bolen JB, Barnwell JW, Shattil JS, Brugge JS (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7844-7848
27. Zhao YH, Krueger JG, Sudal M (1991) *Oncogene* **5**: 1629-1635
28. Feder D, Bishop JM (1990) *J Biol Chem* **265**: 8205-8211
29. Varshney GC, Henry J, Kahn A, Phan-Dinh-Tuy F (1986) *FEBS Lett* **205**: 97-103
30. Sugimoto Y, Erikson E, Grazioani Y, Erikson RL (1989) *J Biol Chem* **260**: 13838-13843
31. Ferrel JE, Noble JA, Martin GS, Jacques YV, Bainton DF (1990) *Oncogene* **5**: 1033-1036
32. Ash AS, Barnwell J, Silverstein RL, Nachmann RL (1987) *J Clin Invest* **79**: 1054-1061
33. Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA (1989) *J Biol Chem* **264**: 7576-7583
34. Beisso P, Pidard D, Fournier D, Dubernard V, Legrand Ch (1990) *Biochim Biophys Acta* **1033**: 7-12
35. Feder D, Bishop JM (1991) *J Biol Chem* **266**: 19040-19046
36. Shattil SJ, Brugge JS (1991) *Curr Opin Cell Biol* **3**: 869
37. Plow EF, Ginsberg MM (1989) *Prog Hemostas Thromb* **9**: 117-156
38. Collier BS, Peersheke EI, Scudder LE (1983) *J Clin Invest* **72**: 325-338.
39. Ginsberg MH, Lightsey A, Kunicki TJ, Kaufmann A, Marguerie G, Plow EF (1986) *J Clin Invest* **78**: 1103-1111

40. Collier BS, Beer JH, Scudder LE, Steinberg MH (1989) *Blood* **74**: 182-192
41. Yamamoto N, Ikeda H, Tandon NN, Herman J, Tomiyama Y, Takaka M, Sekiguchi S, Lipsky R, Kralisz U, Jamieson GA (1990) *Blood* **76**: 1698-1703
42. Plow EF, Marguerie G (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 3711-3715
43. Plow EF, Srouji AH, Meyer D, Marguerie G, Ginsberg MH (1984) *J Biol Chem* **259**: 5388-5391
44. Parise LV, Philips DR (1985) *J Biol Chem* **260**: 10698-10776
45. Plow EF, McEver RP, Collier BS, Woods VL, Marguerie G, Ginsberg MH (1985) *Blood* **66**: 724-727
46. Edington FS, Plow EF (1980) *J Biol Cell* **255**: 154-161
47. Weiss HJ, Turito VT, Baumgartner HR (1986) *Blood* **67**: 332-330
48. Frojmovic M, Wong T, Van De Ven T (1991) *Biophys J* **59**: 815-827
49. Parise LV, Criss AB, Nannizzi L, Wardeu MR (1990) *Blood* **75**: 2363-2368
50. Hillery Cha, Smyth SS, Parise LV (1991) *J Biol Chem* **266**: 14663-14669
51. Tamkun JW, De Simone DW, Fonda D (1986) *Cell* **46**: 271-282
52. Fitzgerald LA, Steiner B, Rall SC, Lo SS, Philips DR (1987) *J Biol Chem* **262**: 3936-3939
53. Shattil SJ, Cunningham M, Wiedmer T, Zhao J, Sims PJ, Brass LF (1992) *J Biol Chem* **267**: 18424-18431
54. Pelletier AJ, Bodary SC, Levinson AD (1992) *Mol Biol Cell* **3**: 989-998
55. Kralisz U, Tandon NN, Jamieson GA (1993) *Thrombos Haemostas* **69**: 529
56. Kornberg L, Earp HS, Parsons JT, Schaller M, Juliano RL (1992) *J Biol Chem* **267**: 23439-23442
57. Burrige K, Turner CE, Romer LH (1992) *J Cell Biol* **119**: 893-903
58. Kornberg LJ, Earp HS, Turner CE, Prockop C, Juliano RL (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8392-8396
59. Lipfert L, Haimovich B, Schaller MD, Cobb BS, Parsons JT, Brugge JS (1992) *J Cell Biol* **119**: 905-912
60. Kroll MH, Schaffer AJ (1989) *Blood* **74**: 1181-1195
61. Siess W (1989) *Phys Rev* **69**: 58-178
62. Nakano T, Hanasaki K, Arita H (1990) *J Biol Chem* **264**: 5400-5406
63. Grondin P, Plantavid M, Sultan C, Breton M, Mauco G, Chap H (1991) *J Biol Chem* **266**: 15705-15709
64. Dhar A, Shukla S (1991) *J Biol Chem* **266**: 18797-18801
65. Beckerle MC, Miller DE, Bertagnolli ME, Locke SJ (1989) *J Cell Biol* **109**: 3333-3346
66. Gutkind SJ, Lacal PM, Robbins KC (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 3806-3809
67. Feinstein MB, Egan JJ, Opas EE (1983) *J Biol Chem* **258**: 1260-1267
68. Hagmann J, Burger MM (1992) *J Cell Biochem* **50**: 237-244
69. Kaplan DR, Morrison DK, Wong G, McCormick F, Williams LT (1990) *Cell* **61**: 125-133
70. Cichowski K, McCormick F, Brugge JS (1992) *J Biol Chem* **267**: 5025-5028

## Budowa i funkcja receptorów integrynowych na przykładzie płytkowego receptora fibrynogeny

### Structure and function of integrin receptors based on platelet receptor for fibrinogen

CZESŁAW S. CIERNIEWSKI\*

Spis treści:

- I. Ogólna charakterystyka receptorów integrynowych
- II. Płytkowy receptor integrynowy
  - II-1. Budowa płytkowego receptora fibrynogeny
  - II-2. Oddziaływanie płytkowego receptora fibrynogeny z ligandami białkowymi i peptydowymi
  - II-3. Aktywacja płytkowego receptora fibrynogeny
- III. Sygnały wewnątrzkomórkowe a aktywacja integryny
  - III-1. Aktywacja integryny pod wpływem sygnałów przesyłanych z wnętrza komórki (*inside-out signalling*)
  - III-2. Przesyłanie sygnału do wnętrza komórek za pośrednictwem integryny (*outside-in signalling*)
- IV. Regulacja powinowactwa i specyficzności wiązania ligandu przez integryny
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. General characteristics of integrin receptors
- II. Platelet-integrin receptor
  - II-1. Structure of the platelet receptor for fibrinogen
  - II-2. Interaction of the platelet receptor for fibrinogen with protein and peptide ligands
  - II-3. Activation of the platelet for fibrinogen
- III. Inside-out signalling and integrin activation
  - III-1. Activation of integrins by signals from the inside of cells (*inside-out signalling*)
  - III-2. Signal transduction mediated by integrins (*outside-in signalling*)
- IV. Regulation of affinity and binding specificity of other integrins
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów:  $\alpha$  i  $\beta$  — podjednostki integryny; CD — wiązka antygenów różnicowania (*cluster differentiation antigens*); GPIIb/IIIa lub  $\alpha_{IIb}\beta_3$  — płytkowa glikoproteina IIb/IIIa; VLA — bardzo późno pojawiający się antygen (*very late antigen*); VNR — receptor witronektyny; ICAM i VCAM — komórkowe białka adhezyjne; C3b — składnik dopełniacza; ADP — adenylozynodifosforan. LAD — Leukocyte Adhesion Deficiency.

\* Prof. dr hab., Zakład Biofizyki, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna, ul. Lindleya 3, 90-131 Łódź

Receptory integrynowe są to białka odpowiedzialne za rozpoznawanie i przyleganie komórek do elementów matriksu zewnątrzkomórkowego oraz oddziaływanie komórek między sobą. Szczególną cechą receptorów integrynowych jest to, iż w wyniku aktywacji zmienia się odwracalnie ich powinowactwo wiązania cząsteczek ligandu. Reagują one wówczas z określonymi białkami obecnymi w macierzy zewnątrzkomórkowej, w błonie innych komórek, lub rozpuszczonymi w płynach ustrojowych. Dzięki temu, integryny umożliwiają swoistą adhezję komórek, ich agregację lub ukierunkowaną migrację. Ma to miejsce podczas takich procesów jak embriogeneza, organogeneza, hemostaza, czy też procesów składających się na odpowiedź immunologiczną organizmu.

Badania ostatnich kilku lat wykazały, że integryny pośredniczą nie tylko w biernym oddziaływaniu komórek, ale także w przesyłaniu informacji w obu kierunkach, tj. ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórek (ang. *outside-in signalling*) oraz z wnętrza komórek na zewnątrz (ang. *inside-out signalling*).

## I. Ogólna charakterystyka receptorów integrynowych

Cząsteczki receptorów integrynowych są heterodimerami, utworzonymi z dwóch podjednostek o masie 120-180 kD oraz 90-110 kD, określanymi odpowiednio  $\alpha$  i  $\beta$ . Do chwili obecnej opisano 14 podjednostek  $\alpha$  oraz 8  $\beta$ , które łącząc się mogą tworzyć 21 odmiennych receptorów. Sekwencja cDNA wszystkich podjednostek integrynowych została już ustalona (1-6). Znane do tej pory podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  wykazują odpowiednio 20% i 40% homologii w strukturze pierwszorzędowej [1-7]. Szczególnie w podjednostkach  $\beta$  spotyka się długie fragmenty o silnie konserwatywnej sekwencji aminokwasowej. Nazwę receptorów integrynowych tworzy się zestawiając typy podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  składające się na cząsteczkę. Niektórzy autorzy używają również nazw potocznych lub pochodzących z klasyfikacji antygenów różnicowania komórek (systemu CD, *cluster differentiation antigens*) [4]. I tak np. płytkowy receptor dla fibrynogenu może być opisany jako integryna  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , kompleks CD41/CD61, albo najczęściej jako GPIIb/IIIa [8]. Podjednostki  $\alpha$  w większości tworzą kompleks wyłącznie z jednym typem łańcucha  $\beta$ . Niektóre z nich, np.  $\alpha_v$ , występują w kompleksie z wieloma podjednostkami  $\beta$  (Tab. 1).

Poszczególne receptory integrynowe mogą rozpoznawać więcej niż jeden ligand białkowy i odwrotnie — różne białka mogą reagować z kilkoma odmiennymi integrynami. Prawdopodobnie wynika to stąd, że niektóre integryny rozpoznają krótkie sekwencje aminokwasowe, obecne w cząsteczkach ligandów białkowych. I tak, integryny  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_6$  rozpoznają sekwencję Arg-Gly-Asp (RGD). Sekwencję tę, jako miejsce wiązania z integrynami, po raz

pierwszy wykryto w fibronektynie [9]. Później okazało się, iż występuje ona również w cząsteczkach, wielu niespokrewnionych z fibronektyną białek, nie zawsze jednak w takiej konfiguracji, aby mogła reagować z integrynami [10-17]. Cząsteczki receptorów reagujące z sekwencją RGD mają podobną budowę. Przypuszcza się, że segmenty cząsteczki o szczególnie konserwatywnej strukturze pierwszorzędowej poszczególnych podjednostek tworzą miejsca, które bezpośrednio uczestniczą w wiązaniu ligandów białkowych. Integryna  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , znana jako płytkowy receptor fibrynogenu, reaguje również z sekwencją Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (KQAGDV) występującą wyłącznie w C-końcu łańcucha  $\gamma$  fibrynogenu [13]. Ostatnio wykazano, że inne receptory integrynowe również mogą reagować z krótkimi segmentami peptydowymi, np. integryna  $\alpha_2\beta_1$  wiąże segment o sekwencji Asp-Gly-Glu-Ala (DGEA) występujący w kolagenie typu I (14),  $\alpha_4\beta_1$  reaguje z Glu-Ile-Leu-Asp-Val (EILDV) obecną w fibronektynie [1], a integryna  $\alpha_X\beta_2$  rozpoznaje Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP), tj. sekwencję pochodzącą z fibrynogenu [15]. Wiadomo także, iż integryny reagujące z białkami błonowymi należącymi do grupy białek o budowie podobnej do immunoglobulin, np. z ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, NCAM lub PECAM-1, swoicie rozpoznają jedną z ich domen białkowych [16, 17]. Sekwencja rozpoznawanych segmentów w tym przypadku nie jest jeszcze poznana.

## II. Płytkowy receptor integrynowy

### II-1. Budowa płytkowego receptora fibrynogenu

Kompleks glikoprotein płytkowych IIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ), ze względu na duże stężenie oraz funkcję, jaką pełni podczas agregacji płytek, jest najwcześniej i najlepiej poznanym przedstawicielem receptorów integrynowych (Ryc. 1).

Otrzymany w mikroskopie elektronowym obraz cząsteczki  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , wbudowanej w dwuwarstwę lipidową, przedstawia strukturę globularną o wymiarach  $8 \times 12-15$  nm, utworzoną przez N-końcowe regiony skompleksowanych podjednostek  $\alpha_{IIb}$  i  $\beta_3$ , zakotwiczoną w błonie dwiema odnóżkami o długości 12-15 nm [18].

Łańcuch polipeptydowy  $\beta_3$  (GPIIIa) zawiera 762 reszty aminokwasowe formujące następujące regiony: (a) cytoplazmatyczny C-końcowy fragment zbudowany z 41 aminokwasów, (b) hydrofobowy fragment transbłonowy, (c) centralny fragment obejmujący około 25% podjednostki, w którym zlokalizowana jest większość wiązań disiarczkowych, oraz (d) N-końcowy region tworzący wielką pętlę dzięki powiązaniu mostkiem disiarczkowym z częścią centralną podjednostki [19-22].

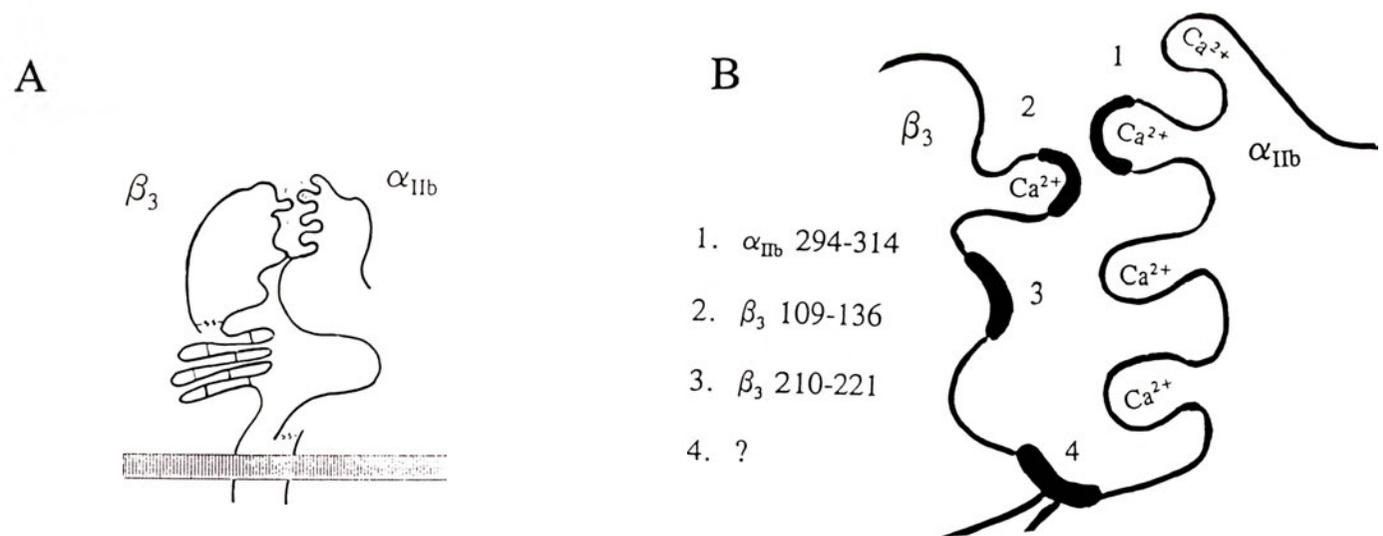
Podjednostka  $\alpha_{IIb}$  utworzona z 1170 reszt aminokwasowych syntetyzowana jest jako pojedynczy łańcuch, z którego podczas modyfikacji potranslacyjnej wycięty zostaje krótki fragment peptydowy [19, 21].

**Tabela 1.**

Receptory integrynowe

Integryna*			Rozpoznawane	
a	b	c	Białko	Sekwencja
<b>Podrodzina <math>\beta_1</math></b>				
$\alpha_1\beta_1$	CD49a/CD29	VLA-1	kolagen, laminina	
$\alpha_2\beta_1$	CD49b/CD29	VLA-2	kolagen, laminina	DGEA
$\alpha_3\beta_1$	CD49c/CD29	VLA-3	kolagen, laminina, fibronektyna	RGD
$\alpha_4\beta_1$	CD49d/CD29	VLA-4	fibronektyna, VCAM-1	EILDV
$\alpha_5\beta_1$	CD49e/CD29	VLA-5	fibronektyna	RGD
$\alpha_6\beta_1$	CD49f/CD29	VLA-6	laminina	
$\alpha_7\beta_1$			laminina	
$\alpha_8\beta_1$			?	
$\alpha_v\beta_1$	CD51/CD29		fibronektyna, witronektyna	RGD
<b>Podrodzina <math>\beta_2</math></b>				
$\alpha_L\beta_2$	CD11a/CD18	LFA-1	ICAM-1, ICAM-2	
$\alpha_M\beta_2$	CD11b/CD18	Mac-1	ICAM-1, C3b, czynnik X, fibrynogen	
$\alpha_X\beta_2$	CD11c/CD18	p150,95	fibrinogen, C3b	GPRP
<b>Podrodzina <math>\beta_3</math></b>				
$\alpha_{IIb}\beta_3$	CD41/CD61	GPIIb/IIIa	fibrinogen, fibronektyna, witronektyna, trombospondyna czynnik von Willebranda	RGD, KQAGDV RGD RGD RGD
$\alpha_v\beta_3$	CD51/CD61		fibrinogen, fibronektyna witronektyna, trombospondyna czynnik von Willebranda osteoontina, kolagen	RGD RGD RGD RGD
<b>Inne</b>				
$\alpha_6\beta_4$		VLA-6 <sub>alt</sub>	laminina	
$\alpha_v\beta_5$		VNR	witronektyna, fibronektyna	RGD
$\alpha_v\beta_6$			fibronektyna	RGD
$\alpha_4\beta_7$		VLA-4 <sub>alt</sub>	fibronektyna, VCAM-1	EILDV
$\alpha_{IEL}\beta_7$		?		
$\alpha_v\beta_8$		?		

\* Nazwa integryny podana zgodnie z ostatnio przyjętą nomenklaturą (a), według klasyfikacji CD (b) oraz jako nazwa zwyczajowa (c)



**Ryc. 1.** Schemat cząsteczki receptora fibrynogenu  $\alpha_{IIb}\beta_3$  utworzonej przez kompleks dwóch podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  (rycina A).  $NH_2$ -końcowe regiony podjednostek znajdują się we wnętrzu płytki krwi, w C-końcowym regionie obu podjednostek zlokalizowana jest kieszeń wiążąca cząsteczkę fibrynogenu. Na rycinie B przedstawione jest miejsce wiążące cząsteczkę fibrynogenu utworzone przez kilka fragmentów peptydowych podjednostek  $\alpha_{IIb}$  i  $\beta_3$ . Dwa fragmenty peptydowe  $\alpha_{IIb}$  294-314 i  $\beta_3$  109-136 wchodzące w skład tego miejsca pochodzą z regionów oddziałujących z jonami  $Ca^{2+}$ . Natura czwartego fragmentu budującego miejsce wiążące ligand w cząsteczce  $\alpha_{IIb}\beta_3$  nie jest jeszcze poznana.

Tak więc, dojrzałą podjednostkę  $\alpha_{11b}$  stanowią dwa łańcuchy związane jednym mostkiem disiarczkowym. Łańcuch ciężki, o masie 115 kD jest w całości ułożony na zewnątrz komórki, podczas gdy łańcuch lekki, o masie 22 kD jest zakotwiczony w błonie płytkowej, a jego 21 reszt aminokwasowych zanurzonych jest w cytoplazmie.

Struktura i funkcja kompleksu  $\alpha_{11b}\beta_3$  jest ściśle uzależniona od obecności jonów  $Ca^{2+}$ . Po zastosowaniu różnorodnych metod (dializa wyrównawcza, utlenianie jonów izotopu kobaltu  $^{58}Co$  związanych z receptorem, metoda spektrometryczna) wykazano, że  $\alpha_{11b}\beta_3$  wiąże z różnym powinowactwem pięć jonów  $Ca^{2+}$  [23, 24]. Jeden jon reaguje z miejscem o wysokim powinowactwie wiązania ( $K_d = 80 \pm 30$  nM), a cztery z miejscami o niskim powinowactwie wiązania ( $K_d = 40 \pm 15$   $\mu$ M). Wypełnianie jonem  $Ca^{2+}$  miejsca o wysokim powinowactwie wiązania w kompleksie  $\alpha_{11b}\beta_3$  ma decydujące znaczenie dla stabilności cząsteczki. Podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  zawierają odpowiednio cztery i dwa segmenty utworzone przez 12 reszt aminokwasowych o sekwencji charakterystycznej dla pętli "EF hand" wiążącej jony  $Ca^{2+}$ , tj. 1(X)-3(Y)-5(Z)-7(-Y)-9(-X)-11(-Z), w których X, Y i Z określają pozycję reszt najczęściej Asp i Glu. Budowa pętli wiążących jony  $Ca^{2+}$  w  $\alpha_{11b}$  i  $\beta_3$  jest tylko częściowo zgodna z ogólnym planem miejsc "EF hand", ponieważ nie mają one reszt koordynujących jon  $Ca^{2+}$  w pozycji X lub -Z. Ponadto, w troponinie C, kalmodulinie oraz innych białkach wiążących jony  $Ca^{2+}$  pętle te ograniczone są krótkimi odcinkami  $\alpha$ -helikalnymi, których brakuje w przypadku  $\alpha_{11b}\beta_3$ . Spektroskopia fluorescencyjna z zastosowaniem jonów terbu ( $Tb^{3+}$ ) wykazała, że pięć syntetycznych peptydów, które odpowiadały 4 segmentom  $\alpha_{11b}$  (242-255, 296-309, 364-377, 425-438) oraz jednemu z  $\beta_3$  (118-131) wiąże jony  $Ca^{2+}$  [25].

## II-2. Mechanizm oddziaływania płytkowego receptora dla fibrynogenu z ligandami białkowymi i peptydowymi

W cząsteczce integryny  $\alpha_{11b}\beta_3$ , po zastosowaniu różnorodnych metod chemicznych i biofizycznych oraz użyciu bardzo wielu przeciwciał monoklonalnych, zidentyfikowano regiony cząsteczki, które tworzą miejsce wiążące ligand białkowy. Integryna  $\alpha_{11b}\beta_3$  rozpoznaje dwie sekwencje peptydowe, tj. RGD oraz KQAGDV. Krótkie peptydy zawierające tę sekwencję hamują przyleganie komórek do fibronektyny, a także blokują wiązanie fibronektyny, fibrynogenu, czynnika von Willebranda oraz witronektyny z płytkami krwi i innymi komórkami [10-15]. W dimerycznej cząsteczce fibrynogenu sekwencja RGD występuje w czterech miejscach, tj. podwójnie w pozycjach 95-97 (RGD-F) i 572-574 (RGD-S) łańcucha  $A\alpha$ , a sekwencja KQAGDV dwa razy w łańcuchach  $\gamma$  w pozycjach 406-411. Mimo, że tetrapeptydy RGDS i RGDF są

odpowiednio pięć i dziesięć razy silniejszymi inhibitorami od KQAGDV istnieją dowody na to, że sekwencja KQAGDV odgrywa bardzo ważną rolę w oddziaływaniu fibrynogenu z płytkami krwi [26, 27]. Peptyd KQAGDV, chociaż nie występuje w cząsteczkach fibronektyny, witronektyny oraz czynnika von Willebranda, hamuje wiązanie tych białek do aktywowanych płytek [28]. Można by sądzić, że RGD i KQAGDV oddziałują z tym samym miejscem obecnym w cząsteczce  $\alpha_{11b}\beta_3$  albo też miejsca, do których przyłączają się oba peptydy powiązane są allosterycznie (Ryc. 1).

W celu identyfikacji miejsc integryny  $\alpha_{11b}\beta_3$ , które wiążą peptydowe ligandy, płytki preinkubowano z peptydami GRGDSPKY lub HHLGGAKQAGDV znakowanymi izotopem jodu ( $^{125}J$ ). Peptydy związane z receptorem sprzęgano następnie kowalencyjnie z cząsteczką  $\alpha_{11b}\beta_3$  przy pomocy odczynników „spinających”, np. DMS. Te ostatnie, ze względu na obecność dwóch aktywnych grup reagujących z resztami  $NH_2$ , tworzą mostki wiążące kowalencyjnie peptyd wówczas, gdy tworzy on kompleks z receptorem. Po wyodrębnieniu integryny  $\alpha_{11b}\beta_3$  z tak potraktowanych płytek krwi i jej hydrolizie enzymatycznej, zidentyfikowano fragmenty receptora zawierające peptyd znakowany izotopem jodu. Ligand peptydowy z sekwencją RGD wykryto przede wszystkim w podjednostce  $\beta_3$ , kowalencyjnie związany z fragmentem 109-171, prawdopodobnie z resztą Lys w pozycji 125 [30]. W podobnych badaniach integryny  $\alpha_v\beta_3$ , wyodrębniono fragment  $\beta_3$  65-220 zawierający związany kowalencyjnie peptyd ze sekwencją RGD [31]. Udział fragmentu 109-171 podjednostki  $\beta_3$  w budowie miejsca wiążącego ligand peptydowy potwierdzają także następujące obserwacje: (a) stężenie integryny  $\alpha_{11b}\beta_3$  w płytkach krwi chorych z trombastenią Glanzmanna typu CAM jest prawie normalne, a mimo to płytki nie wiążą fibrynogenu i innych białek oddziałujących z tym receptorem. Takie płytki nie agregują [32]. U chorych z trombastenią, analiza sekwencji cDNA kodującego podjednostkę  $\beta_3$ , wykazała obecność mutacji punktowej. W pozycji 119 reszta Asp zastąpiona została w nieaktywnym receptorze resztą Tyr; (b) mutanty receptora  $\alpha_{11b}\beta_3$  otrzymane w komórkach CHO metodą rekombinacji, w których reszta Asp<sub>119</sub> podstawiona została innymi aminokwasami, utraciły zdolność wiązania peptydu RGD [29]; (c) przeciwciała monoklonalne rozpoznające epitopy zlokalizowane w tym regionie podjednostki  $\beta_3$  hamowały wiązanie peptydu RGD i fibrynogenu z płytkami [33-35]; (d) syntetyczny fragment  $\beta_3$  118-131 tworzy kompleks stechiometryczny 1:1 z peptydami zawierającymi sekwencję RGD (GRGDSP, RGDF), opisany stałą  $K_D$  równą 75  $\mu$ M. Kompleks taki można wykryć za pomocą spektrometrii masowej [36]; (e) warunkiem oddziaływania regionu  $\beta_3$  118-131 z cząsteczką ligandu jest wiązanie przez ten region jonów  $Ca^{2+}$ . Po zastosowaniu spektrometrii fluorescencyjnej opartej na pomiarze przepływu

energii z reszt aromatycznych peptydu  $\beta_3$  118-131 do jonów  $Tb^{3+}$  wykazano, że peptyd ten wiąże jony  $Ca^{2+}$ . Oddziaływanie to ulega wielokrotnemu osłabieniu wówczas, gdy Asp<sub>119</sub> zastąpiona zostaje resztą Ala [25].

W podjednostce  $\beta_3$ , po zastosowaniu w badaniach wielu krótkich peptydów syntetycznych składających się na sekwencję 1/3 łańcucha podjednostki, wykryto jeszcze jeden region oddziałujący z ligandem [37]. Stwierdzono, że zwłaszcza dwa peptydy 204-222 oraz 211-229 silnie hamowały wiązanie fibrynogenu z integryną  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Peptyd 211-222 nie tylko hamował wiązanie fibrynogenu i pozostałych białek adhezywnych z integryną  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ale i wiązał się z fibrynogenem, a swoiste przeciwciała dla tego peptydu hamowały agregację płytek.

Powierzchnia miejsca wiążącego cząsteczkę fibrynogenu w integrynie  $\alpha_{IIb}\beta_3$  utworzona jest również przez reszty aminokwasowe innych segmentów podjednostki  $\alpha_{IIb}$ . Jednym z nich jest region 296-306, z którym wiąże się peptyd HHLGGAKQAGDV znakowany izotopem jodu  $^{125}J$  [38]. Fragment peptydowy  $\alpha_{IIb}$  296-306 ma kilka charakterystycznych właściwości wskazujących na to, że uczestniczy on w oddziaływaniu z fibrynogenem: (a) syntetyczny peptyd  $\alpha_{IIb}$  296-306 bezpośrednio wiąże się z fibrynogenem i hamuje jego wiązanie z integryną  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , a także agregację płytek krwi [40]. Aktywność hamująca tego peptydu znika po podstawieniu reszty Asp<sub>302</sub> przez Glu; (b) przeciwciała dla peptydu  $\alpha_{IIb}$  296-306 hamuje oddziaływanie fibrynogenu zarówno z tym peptydem, jak i z integryną  $\alpha_{IIb}\beta_3$  i z płytkami krwi; (c) zawiera typowy motyw aminokwasowy "EF hand" białek wiążących jony  $Ca^{2+}$  i wiąże jony metali; (d) w pozycji 302-304 ma segment z sekwencją DGR, tj. odwróconą RGD. Oligopeptydy z tą sekwencją hamują adhezję komórek; (e) w jego pobliżu znajduje się segment o sekwencji GAPL (reszty 309-312), który jest hydrofobowo komplementarny do sekwencji RDGS [39].

Niektóre z wymienionych regionów zgodnie z teorią hydrofobowości, są predysponowane do łączenia się w kompleksy z peptydami zawierającymi sekwencję RGD i KQAGD [41]. Według tej teorii, reszty aminokwasowe kodowane przez komplementarne nici cDNA mają właściwości tworzenia kompleksów ze sobą. Na podstawie analizy sekwencji DNA przewidziano, które z fragmentów cząsteczki  $\alpha_{IIb}\beta_3$  mogą oddziaływać z peptydami RGD i KQAGDV [42-44]. Udział wykrytych w ten sposób sekwencji peptydowych w oddziaływaniu receptorów integrynowych z ligandami białkowymi potwierdzono eksperymentalnie: (a) syntetyczny peptyd NLGT o komplementarnej hydrofobowości do sekwencji RGDS obecnej w fibronektynie hamuje adhezję komórek do fibronektyny i agregację płytek krwi, a przeciwciała antypeptydowe reagują z podjednostką  $\beta_1$  receptora fibronektyny  $\alpha_5\beta_1$  oraz  $\beta_3$  receptora fibrynogenu  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [39]; (b) syntetyczne peptydy APLRV i GAPL, tj. fragmenty peptydu GAPLRV o sekwencji komplementarnej hyd-

rofobowo do segmentu PRGDSQ, który występuje w cząsteczce czynnika von Willebranda, hamują agregację płytek, retrakcję skrzepu i przylaczają się bezpośrednio do fibrynogenu [39]. Segmenty o sekwencji hydrofobowo komplementarnej do peptydów zawierających reszty RGD występują w regionach 128-132, 129-133 i 109-113 podjednostki  $\beta_3$ , a także w 309-314 podjednostki  $\alpha_{IIb}$ . We wszystkich przypadkach zlokalizowane są w pobliżu reszt aminokwasowych, których oddziaływanie z sekwencją RGD wykazano również za pomocą innych metod.

Wykrycie kilku fragmentów peptydowych integryny  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , które hamują funkcję receptora przemawia za obecnością w cząsteczce receptora więcej niż jednego obszaru kontaktującego się z ligandem. W świetle różnych obserwacji mało prawdopodobny jest model, według którego tylko jeden z opisanych regionów cząsteczki receptora jest aktywny, a pozostałe są zamaskowane w natywnej cząsteczce  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Duża powierzchnia obszarów kontaktujących się w kompleksie receptora z ligandem jest typowa dla oddziaływań o wysokim powinowactwie [45]. Taka złożona struktura miejsca wiążącego cząsteczkę ligandu w  $\alpha_{IIb}\beta_3$  tłumaczy dlaczego powinowactwo wiązania całej cząsteczki białkowej jest 30-100 razy wyższe od tego, które charakteryzuje oddziaływanie receptora z krótkimi fragmentami peptydowymi zawierającymi sekwencję RGD lub KQAGDV.

Na podstawie dotychczasowych badań można wskazać trzy regiony  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , które biorą udział w oddziaływaniu z cząsteczką ligandu. Są to: (1)  $\alpha_{IIb}$  294-314, (2)  $\beta_3$  109-136, oraz (3)  $\beta_3$  212-222. Pierwszy z tych regionów preferencyjnie reaguje z sekwencją KQAGDV, drugi z RGD, a ostatni z nich z nieopisaną jeszcze sekwencją fibrynogenu. Peptydy RGD i KQAGDV wzajemnie hamują swoje wiązanie z integryną  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Jedną z teorii tłumaczy to tym, iż oba peptydy przyjmują podobną konformację i dzięki temu możliwa jest ich krzyżowa reakcja z obu miejscami receptora. Zgodnie z drugą, wiązanie jednego z peptydów z  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wywołuje zmiany konformacyjne receptora, które wykluczają przyłączenie drugiego peptydu.

Można sądzić, iż oprócz głównych miejsc kontaktu w cząsteczce  $\alpha_{IIb}\beta_3$  występuje jeszcze wiele innych, o niższym powinowactwie wiązania. Wynika to z analizy struktury i specyficzności receptorowej poszczególnych integryn. Dotychczas opisane miejsca pochodzą z regionów podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ , które charakteryzują się niewielką zmiennością ewolucyjną i występują prawie w tej samej postaci w większości podjednostek. Mimo to, receptory utworzone z dimerów różnych podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ , wybiórczo rozpoznają ligandy białkowe. W poszczególnych integrynach muszą więc istnieć regiony odpowiedzialne za taką specyficzność rozpoznawania. Po dysocjacji heterodimeru  $\alpha\beta$  zanika aktywność receptorowa i żadna z podjednostek indywidualnie nie reaguje z ligandem. Wynika

stał wniosek, iż miejsca oddziałujące z RGD lub KQAGDV utworzone są wyłącznie przez kompleks  $\alpha_{11b}\beta_3$  występujący we właściwej konformacji. W odpowiednim układzie eksperymentalnym można wykazać, że wiązanie ligandu z receptorem integrynowym zachodzi fazowo. Początkowo luźno związany z receptorem integrynowym ligand tworzy z czasem nieodwracalny, stabilny kompleks.

### II-3. Aktywacja płytkowego receptora fibrynogenu

Liczba cząsteczek integryny  $\alpha_{11b}\beta_3$  w błonie płytkowej nie zmienia się po aktywacji płytek krwi wywołanej trombiną, ADP lub kolagenem. Zmienia się natomiast ich stan. Cząsteczki te przechodzą w postać czynną, tj. nabierają zdolności wiązania fibrynogenu i innych ligandów białkowych. Istotną rolę w regulacji aktywności receptorowej integryny  $\alpha_{11b}\beta_3$  odgrywają fragmenty cytoplazmatyczne obu podjednostek. Dowodów na to dostarczyły badania, w których zastosowano mutanty cząsteczek receptorów integrynowych. Okazało się, że zdolność do wiązania ligandu przez poszczególne receptory jest regulowana oddziaływaniem ich domen cytoplazmatycznych z białkami wewnątrzkomórkowymi oraz z elementami cytoszkieletu. Wszystkie podjednostki  $\beta$  mają podobne domeny cytoplazmatyczne podczas gdy poszczególne podjednostki  $\alpha$  zawierają bardzo różnorodne domeny wewnątrzkomórkowe. Obserwacje w mikroskopie świetlnym i elektronowym wykazały, że receptory integrynowe mają ograniczoną ruchliwość w ogniskach kontaktowych (ang. *focal contacts*), tj. w obszarach błony komórkowej, poprzez które komórki przylegają do siebie lub podłoża. Wykazano, że fragmenty pochodzące z cytoplazmatycznych domen podjednostek  $\beta$  oddziałują z takimi białkami jak talina lub  $\alpha$ -aktylina [46]. Podjednostka  $\beta_1$  pozbawiona domeny cytoplazmatycznej nie gromadzi się w ogniskach kontaktowych [47]. Receptory reagujące z tym samym ligandem w różnym stopniu oddziałują z cytoszkieletem, np. receptory fibronektyny  $\alpha_5\beta_1$  gromadzą się w ogniskach kontaktowych, a  $\alpha_3\beta_1$  nie tworzą takich skupisk [48]. Podobnie receptory witronektyny  $\alpha_v\beta_3$  występują w ogniskach, a  $\alpha_v\beta_5$  w nich nie występują [49]. Oznacza to, że różne integryny po utworzeniu kompleksu z tym samym ligandem białkowym wywołują odmienne reakcje w komórkach. Delecja fragmentu cytoplazmatycznego  $\alpha_{11b}$  prowadzi do uzyskania zmutowanej cząsteczki receptora, która jest nieodwracalnie aktywna [50]. Zamiana cytoplazmatycznej domeny  $\alpha_{11b}$  na taką, która występuje w  $\alpha_5$ , także prowadzi do powstania stale aktywnego mutanta. Oznacza to, że cytoplazmatyczna domena  $\alpha_{11b}$  w szczególności sposób kontroluje stan zewnątrzkomórkowych regionów cząsteczki, tj. utrzymuje receptor  $\alpha_{11b}\beta_3$  w stanie nieczynnym. Wpływ podjednostki  $\alpha_{11b}$  zostaje wyeliminowany z chwilą aktywacji płytek krwi. Trudno wyjaśnić w jaki

sposób się to odbywa. Jedną z możliwości jest zmiana w strukturze receptora wywołana fosforylacją cząsteczki integryny  $\alpha_{11b}\beta_3$  lub białek z nią powiązanych. Integryna  $\alpha_{11b}\beta_3$  w niewielkim stopniu ulega fosforylacji, dlatego przypuszcza się, że wywołana w ten sposób modyfikacja cząsteczki receptora nie ma wpływu na jego funkcję [51, 52].

Proces aktywacji płytek wiąże się z przesłaniem informacji do wnętrza komórki przy pomocy przenośników biologicznych, powstałych podczas metabolizmu fosfatydyloinozytolu i kwasu arachidonowego, a także pośredniczony jest wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $Ca^{2+}$  i zmianą pH [52]. Towarzyszy temu także aktywacja kilku białek G i kinaz białkowych. Nie wiadomo jednak, czy wymienione szlaki przyprływu informacji są powiązane z aktywacją  $\alpha_{11b}\beta_3$ . Zmiana stężenia ww. przekaźników w komórkach eukariotycznych, do których wprowadzono metodami inżynierii genetycznej integrynę  $\alpha_{11b}\beta_3$ , nie aktywuje tego receptora [53]. O złożoności mechanizmu aktywacji  $\alpha_{11b}\beta_3$  świadczy też fakt, że różne ilości aktywnych kompleksów receptora pojawiają się na powierzchni płytek krwi w zależności od tego jak silny czynnik wywołuje agregację płytek krwi. W wyniku działania trombiny na powierzchni płytek pojawia się prawie 50% więcej aktywnych receptorów niż pod wpływem ADP [54].

W badaniach mechanizmu aktywacji cząsteczki  $\alpha_{11b}\beta_3$  powszechnie używane są przeciwciała monoklonalne, które rozpoznają epitopy specyficzne dla poszczególnych stanów kompleksu  $\alpha_{11b}\beta_3$ , tj. reagujące wyłącznie z postacią aktywną lub nieczynną receptora, albo też z poszczególnymi podjednostkami. Niezwykle pomocne okazały się przeciwciała monoklonalne reagujące z epitopem zlokalizowanym w miejscu przyłączenia fibrynogenu. Blokują one wiązanie tego białka, a ich wiązanie z płytkami jest hamowane przez fibrynogen i jego aktywne fragmenty peptydowe. Przeciwciała monoklonalne np. PAC-1, ze względu na wyższe powinowactwo wiązania i szybszą kinetykę przyłączania, umożliwiają badania aktywacji receptora przy użyciu cytometru przepływowego.

Przejęcie integryny  $\alpha_{11b}\beta_3$  w stan aktywny obserwuje się nie tylko podczas aktywacji płytek czynnikami agregującymi, ale można wywołać je też w inny sposób, np. (a) rozbięciem ciągłości błony komórkowej [51]; (b) adsorpcją wyodrębnionego kompleksu na powierzchni plastikowej [37]; (c) przyłączeniem pewnych przeciwciał monoklonalnych [50-58]; (d) związaniem peptydu zawierającego sekwencję RGD lub KQAGDV [59]. Oba peptydy zachowują się więc nie tylko jako ligandy, ale również jako aktywatory integryny  $\alpha_{11b}\beta_3$ . Peptydy te wiążą się z receptorem będącym w stanie nieczynnym i wywołują zmianę konformacyjną w cząsteczce kompleksu  $\alpha_{11b}\beta_3$  typową dla receptora w stanie aktywnym. Nowy stan cząsteczki charakteryzuje się względną stabilnością. Po oddysocjowaniu ligandu peptydowego receptor pozostaje przez krótki czas

w stanie aktywnym i powraca do stanu nieczynnego.

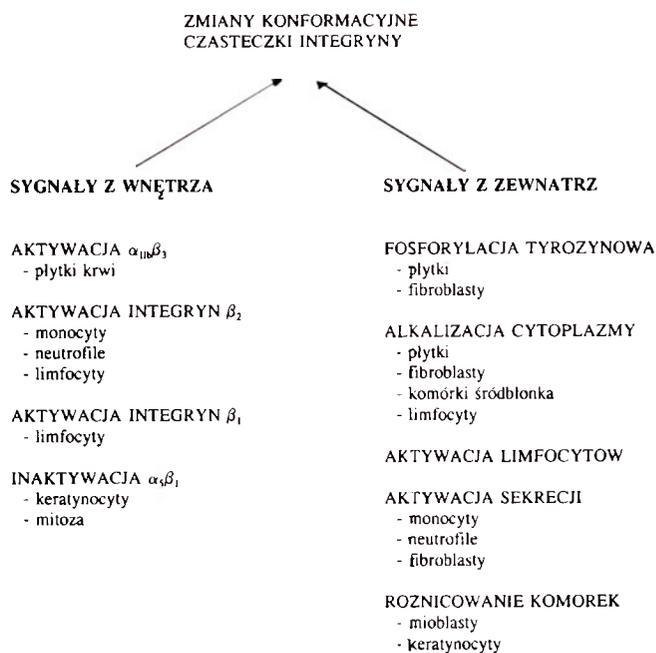
Niektóre przeciwciała monoklonalne otrzymane dla kompleksu  $\alpha_{11b}\beta_3$  z peptydem GRGDSP, selektywnie rozróżniają epitopy pojawiające się w cząsteczce aktywnego receptora [58]. Przeciwciała te, określane anty-LIBS (ang. *ligand induced binding site*), można podzielić na trzy grupy: (a) przeciwciała hamujące agregację płytek krwi, (b) przeciwciała aktywujące agregację oraz (c) przeciwciała, których związanie z receptorem nie wpływa na funkcję płytek. W przypadku dwóch przeciwciał aktywujących, tj. anty-LIBS-1 i anty-LIBS-2, zlokalizowano rozpoznawane przez nie epitopy w regionie  $\beta_3$  600-700. Oznacza to, że związanie małych ligandów peptydowych z „kieszenią wiążącą” receptora pobudza zmiany konformacyjne w regionie podjednostki  $\beta_3$ , odległym o kilkaset reszt aminokwasowych od miejsca wiązania. Można też sądzić, że przyłączenie przeciwciał do regionu 600-700 podjednostki  $\beta_3$  wywołuje przejście konformacyjne receptora do stanu, typowego dla jego aktywnej postaci.

### III. Sygnały wewnątrzkomórkowe a aktywacja integrzyn

#### III-1. Aktywacja integrzyn pod wpływem sygnałów przesyłanych z wnętrza komórek (*inside-out signalling*)

Wiele obserwacji wskazuje na to, że podwyższenie powinowactwa integrzyn  $\alpha_{11b}\beta_3$  do cząsteczek ligandu białkowego odbywa się dzięki sygnałom przesyłanym z wnętrza komórki (Ryc. 2.). Aktywacja receptora, która zachodzi w wyniku zmian konformacyjnych indukowanych wzdłuż łańcucha  $\alpha$  i  $\beta$ , prawdopodobnie prowadzi do odsłonięcia lub utworzenia kieszeni wiążącej ligand. W płytkach krwi i leukocytach, aktywacja większości receptorów, np.  $\alpha_{11b}\beta_3$ ,  $\alpha_M\beta_2$ ,  $\alpha_1\beta_2$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  i  $\alpha_6\beta_1$ , nie wiąże się ze zmianą ich stężenia w błonie komórkowej [60-62]. Tylko niektóre integryny z podrodziny  $\beta_1$ , np.  $\alpha_1\beta_1$  i  $\alpha_2\beta_1$  w limfocytach T, występują w błonie komórkowej w znacznie podwyższonych ilościach po aktywacji komórek antygenem lub estrami forbolu [63].

Aktywne receptory integrzynowe po pewnym czasie „zamykają się”, tj. powracają do wyjściowego stanu nieczynnego. Oprócz płytkowej integrzyn  $\alpha_{11b}\beta_3$  zaobserwowano to także w przypadku integrzyn  $\alpha_5\beta_1$ . Ten ostatni receptor, podczas rozwoju keratynocytów oraz komórek chłoniaka złośliwego, traci zdolność reagowania z fibronektyną [64]. Równocześnie z utratą aktywności receptorowej  $\alpha_5\beta_1$  obserwowano zahamowanie fosforylacji receptora. Powiązanie fosforylacji integrzyn  $\beta_1$  z ich inaktywacją także w komórkach transformowanych wirusem wywołującym zmianę w budowie pp60<sup>src</sup>. Zmutowana kinaza pp60<sup>src</sup> traci zdolność fosforylowania pojednostki  $\beta_1$  a transformowane komórki nie przylegają do fibronektyny [65]. Również w komórkach podlegających podziałowi mi-



Ryc. 2. Zmiany wywołane w komórkach w wyniku sygnałów przesyłanych za pośrednictwem integrzyn ze środowiska zewnętrznego do komórek oraz z wnętrza komórek na zewnątrz.

totycznemu, jedna z reszt serynowych receptora  $\alpha_5\beta_1$  ulega fosforylacji i takie komórki także tracą zdolność przylegania do fibronektyny. Powyższe przykłady wykazują, że regulacja aktywności receptorów integrzynowych, może być pod kontrolą procesów zachodzących we wnętrzu komórki, w tym także oddziaływaniem domen cytoplazmatycznych receptora z elementami cytoszkieletu lub innymi białkami komórkowymi.

#### III-2. Przesyłanie sygnału do wnętrza komórek za pośrednictwem integrzyn (*outside-in signalling*)

Integryny mogą przesyłać informację również do wnętrza komórki wpływając na wewnątrzkomórkowe stężenie jonów  $Ca^{2+}$ , zmianę cytoplazmatycznego pH, przemianę inozytolową oraz fosforylację białek komórkowych.

W płytkach krwi aktywowanych trombiną lub ADP zachodzi fosforylacja reszt tyrozynowych niektórych białek płytkowych, ale tylko wówczas, gdy integryna  $\alpha_{11b}\beta_3$  skompleksowana jest z fibrynogenem [66]. Wymienione czynniki aktywujące płytki rozpoznawane są przez ten sam typ receptora, który wyróżnia się obecnością siedmiu transbłonowych segmentów, charakterystycznych dla receptorów oddziałujących z białkami G. Przy braku  $\alpha_{11b}\beta_3$ , np. w płytkach trombastenicznych, lub po zahamowaniu wiązania fibrynogenu przez przyłączenie do kompleksu przeciwciał lub peptydów, mimo aktywacji płytek w/w czynnikami, zahamowana jest również fosforylacja reszt tyrozynowych.

W płytkach krwi tylko glikoproteina IV (GPIV) występuje w kompleksie z kinazami tyrozynowymi,

należącymi do rodziny src [68, 69]. GPIV jest nieintegrynowym receptorem trombospodiny, a prawdopodobnie również kolagenu. Wiadomo, że trombospodyna i fibrynogen oddziałują ze sobą swoiście i tworzą kompleksy także podczas agregacji płytek. Reakcja między tymi białkami może więc ułatwiać występowanie w kompleksie ich receptorów, tj.  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , GPIV, a być może i  $\alpha_2\beta_1$ . Ta ostatnia integryna reaguje z kolagenem i bierze udział w adhezji i agregacji płytek krwi. Można sądzić więc, że wszystkie te receptory współdziałają z receptorami aktywatorów płytkowych w przesyłaniu sygnału do wnętrza płytek.

Białka błony komórkowej z ufosforylowanymi tyrozynami skupiają się głównie w strefach, w których komórki kontaktują się ze sobą lub z podłożem. Rozpoznawanie fosforylowanych przez kinazy białek zawierających domenę SH2 (*src homology 2*) umożliwia tworzenie swoistych kompleksów białek strukturalnych i regulatorowych z elementami cytoszkieletu w ogniskach kontaktowych [70].

Adhezja fibroblastów, komórek śródbłona oraz limfocytów do fibronektyny, a także rozpostarcie komórek wywołuje zmiany we wnętrzu komórki podobne do tych, które indukowane są przez substancje wzrostowe lub onkogeny [71]. Obserwuje się wówczas, oprócz zmian stężenia wewnątrzkomórkowego jonów  $Ca^{2+}$  i podwyższenia cytoplazmatycznego pH, fosforylację różnych białek. Pozwala to przypuszczać, że w wielu komórkach po związaniu ligandów białkowych, integryny działają synergistycznie z receptorami aktywatorów komórkowych i wzmacniają przesyłany sygnał do wnętrza komórki.

Zgodnie z tym poglądem sygnał stymulujący proliferację komórek, wysyłany do wnętrza po związaniu receptora limfocyta T z białkiem CD3, w wyniku przyłączenia ligandu białkowego do integryn  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  i  $\alpha_1\beta_2$  ulega wzmocnieniu [72, 73]. Wiadomo też, że przyłączenie fibronektyny do  $\alpha_5\beta_1$  indukuje czynnik AP-1 niezbędny do transkrypcji interleukiny 2. Z kolei integryna  $\alpha_v\beta_3$  bierze udział w przesyłaniu sygnału stymulującego syntezę interleukiny 4 w komórkach  $\gamma T$ . Dowodzi to, że adhezja komórek do elementów matriksu zewnątrzkomórkowego wywiera istotny wpływ na aktywację limfocytów T oraz, że odbywa się to za pośrednictwem integryn.

Przyleganie monocytów do składników matriksu zewnątrzkomórkowego indukuje geny kodujące mediatory stanu zapalnego [74]. Adhezja neutrofilii pośredniczona integrzynami  $\beta_2$  jest bodźcem współdziałającym z cytokinami podczas wybuchu tlenowego (*ang. respiratory burst*) [75]. Taka adhezja pobudza również ruchliwość komórek oraz przemieszczanie jonów  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie [76].

Nieznanym jest mechanizm uczynniania integryn pod wpływem sygnałów przekazywanych z wnętrza komórki. Integryny nie mają wewnętrznej aktywności kinaz tyrozynowych, a także brak dowodów na to, aby swoiście tworzyły kompleksy z rozpuszczalnymi kina-

zami lub innymi białkami sygnałnymi. Mechanizm ten poznany jest dla receptorów z domenami SH2, np. dla receptorów czynników wzrostu. Po związaniu cząsteczek czynnika wzrostu, receptory tworzą kompleksy dwu- lub więcej-cząsteczkowe i wzajemnie fosforylują odpowiednie swoje reszty tyrozynowe. Dzięki temu następuje dalsza aktywacja kinaz i fosforylacja kolejnych substratów białkowych. Można sądzić, że mechanizm przekazywania sygnału przez integryny uwzględnia, po agregacji kilku cząsteczek receptorów, także utworzenie miejsc wiążących z wysokim powinowactwem rozpuszczalne kinazy tyrozynowe, wzajemnie aktywujące się w wyniku fosforylacji. Jak do tej pory, brakuje dowodów potwierdzających ten model.

Z powyższych przykładów wynika, że integryny biorą udział w przesyłaniu sygnału w obu kierunkach, oraz, że skompleksowanie ligandu białkowego lub przeciwciała przez odpowiednie receptory integrynowe może modulować ekspresję genową oraz proces różnicowania komórek.

#### IV. Regulacja powinowactwa i specyficzności wiązania ligandu przez inne integryny

Komórki regulują swoje właściwości adhezyjne, dzięki selektywnej ekspresji poszczególnych receptorów integrynowych na powierzchni błony, a także modulacji ich powinowactwa wiązania ligandu białkowego. Poszczególne integryny mają wyraźnie zaznaczoną swoistość wytwarzania kompleksów z określonymi białkami. W przypadku niektórych receptorów swoistość ta ujawnia się w różnym stopniu w zależności od typu komórki. Przykładem może być receptor kolagenu w płytkach krwi —  $\alpha_2\beta_1$ , który w innych komórkach dodatkowo rozpoznaje lamininę [77]. Może to wynikać z bardzo niewielkiej różnicy strukturalnej, np. spowodowanej punktową mutacją cząsteczki  $\alpha_2\beta_1$ . Za innym mechanizmem przemawiają obserwacje, według których integryny po wyodrębnieniu z komórek mają odmienną specyficzność ligandową w zależności od rodzaju lipidów lub jonów metali występujących w środowisku [78].

Zmienność specyficzności i powinowactwa wiązania cząsteczek ligandu jest najistotniejszą cechą wszystkich integryn, przy czym mechanizm tej zmienności jest najlepiej poznany w przypadku płytkowej integryny  $\alpha_{IIb}\beta_3$  oraz integryn z podjednostką  $\beta_2$ , obecnych w neutrofilach, monocytach i limfocytach. Integryny te występują w stanie nieczynnym, a ich aktywność receptorowa ujawnia się dopiero po aktywacji komórki. Zachodzą wówczas zmiany konformacyjne w cząsteczce integryn, które można rejestrować przy pomocy przeciwciał monoklonalnych. Podobnie jak w przypadku integryny  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , przeciwciała aktywują lub rozpoznają tylko aktywną postać integryny  $\alpha_1\beta_2$  [79].

Szczególną właściwością receptorów integrynowych jest to, że ich funkcja może być regulowana sygnałami, tak ze środowiska zewnętrznego, jak i z wnętrza

komórki. Przykładem jest receptor  $\alpha_M\beta_2$ , który ulega aktywacji w monocytach pod wpływem estrów forbolu [80] albo też w wyniku przylegania komórek do fibronektyny [81]. Mechanizm działania receptorów rodziny  $\beta_2$  najlepiej poznany jest w przypadku granulocytów i limfocytów. Integryny rodziny  $\beta_2$  odgrywają niezwykle istotną rolę podczas pozanaczyniowej migracji komórek. Przy ich braku, leukocyty nie przylegają do śródbłonna, co jest przyczyną choroby dziedzicznej LAD (ang. *Leukocyte Adhesion Deficiency*). W normalnie przebiegającym procesie migracji leukocytów z krążenia, w pierwszej fazie komórki te toczą się po śródbłonku dzięki oddziaływaniu selektyn, tj. receptorów, których ekspresja na powierzchni komórek śródbłonna pojawia się w stanach zapalnych [82, 83]. Luźny kontakt leukocytów z powierzchnią śródbłonna pośredniczony selektynami nie wystarcza do adhezji. W tym celu niezbędna jest aktywacja leukocytów i uaktywnienie integryn, np. różnymi mediatorami procesu zapalnego — czynnikiem nekrotycznym (TNF), C5a, czynnikiem aktywującym płytki (PAF) lub tripeptydem fMet-Leu-Phe. Niedawno opisano mediator lipidowy, wyodrębniony ze stymulowanych neutrofilii, który aktywował integryny  $\alpha_M\beta_2$  oraz  $\alpha_1\beta_2$ , nie tylko obecne w błonie komórek, ale także po ich wyodrębnieniu [78]. Wiadomo, że specyficzność działania receptorów rodziny  $\beta_2$  zależy od składu lipidowego liposomów, w które są wbudowane.

Integryny z podjednostką  $\beta_2$  pełnią także istotną funkcję podczas reakcji limfocytów T z komórkami prezentującymi antygen. Za specyficzność takiego oddziaływania odpowiedzialne są receptory T, które rozpoznają peptydy skompleksowane z cząsteczkami głównego kompleksu zgodności tkankowej. Adhezja limfocytów odbywa się wtedy za pośrednictwem integryny  $\alpha_1\beta_2$ , która wiąże się z ICAM-1 [1].

W odróżnieniu od integryny  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , która po syntezie w komórkach heterologicznych w celu wiązania ligandu wymaga aktywacji, receptor  $\alpha_1\beta_2$  syntetyzowany w tych samych warunkach jest aktywny. Po transfekcji tego receptora do linii komórek limfoblastycznych charakteryzujących się niedoborem podrodziny  $\beta_2$ , typowym dla wrodzonego zespołu LAD, pojawia się ekspresja receptora  $\alpha_1\beta_2$ . W celu wiązania ligandu (ICAM-1), receptor ten wymaga aktywacji komórek estrami forbolu. Po usunięciu metodą rekombinacyjną domeny cytoplazmatycznej i podjednostki  $\beta_2$ , receptor traci aktywność, którą można było odtworzyć przy

udziale przeciwciała monoklonalnego NKI-L16 lub po aktywacji komórek estrami forbolu. W monocytach i neutrofilach, cytoplazmatyczna domena  $\beta_2$  ulega fosforylacji, ale nie wiadomo, czy ma to związek z mechanizmem aktywacji receptora.

## Uwagi końcowe

Szczególną właściwością integryn jest to, że po zaktywowaniu umożliwiają swoistą adhezję komórek. Integryny uczestniczą również w przepływie informacji w obu kierunkach, tj. ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki oraz w kierunku przeciwnym. W większości komórek, receptory integrynowe mogą funkcjonować synergistycznie z receptorami, których działanie powiązane jest z systemem białek G lub z receptorami zawierającymi domeny kinazowe SH2. W przypadku większości integryn, rozpoznanie swoistych ligandów białkowych i utworzenie kompleksu jest sygnałem do aktywacji fosfolipaz, przemiany fosfatydyloinozytolu, alkalizacji wnętrza komórek, wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $Ca^{2+}$  oraz aktywacji białkowej kinazy C. Przypuszcza się, że agregacja cząsteczek integryn w błonie, spowodowana przyłączeniem wielowartościowych ligandów białkowych lub przeciwciał, umożliwia aktywację rozpuszczalnych kinaz tyrozynowych.

Artykuł otrzymano 6 listopada 1993 r.  
Zaakceptowano do druku 7 stycznia 1994 r.

## Piśmiennictwo

1. Hynes RO (1992) *Cell* **69**: 11-25
2. Albelda SM, Buck CA (1990) *FASEB J* **4**: 2868-2880
3. Arnaout MA (1990) *Blood* **75**: 1035-1050
4. Hemler ME (1990) *Annu Rev Immunol* **8**: 365-400
5. Springer TA (1990) *Nature (Lond)* **346**: 425-434
6. Springer TA (1990) *Annu Rev Cell Biol* **6**: 359-402
7. Ruoslahti E (1990) *J Clin Invest* **87**: 1-5
8. Phillips DR, Charo I.F, Scarborough RM (1991) *Cell* **65**: 359-362
9. Pierschbacher M, Hayman EG, Ruoslahti E (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 1224-1227
10. Ruoslahti E, Pierschbacher MD (1986) *Cell* **44**: 517-518
11. Ploew E.F, Pierschbacher MD, Ruoslahti E, Marguerie GA, Ginsberg MN (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 8057-8061
12. Haverstick DM, Cowan JF, Yamada KM, Santoro SA (1985) *Blood* **66**: 946-952
13. Tranqui L, Andreiux A, Hudry-Clergeon G, Ryckewaert JI, Soye S, Chapel A, Ginsberg MH, Ploew EF (1989) *J Biol Chem* **108**: 2519-2527
14. Staatz WD, Fok KF, Zutter MM, Adams SP, Rodriguez BA, Santoro SA (1991) *J Biol Chem* **266**: 7363-7367
15. Loike JD, Sodeik B, Cao L, Leucona S, Weitz JI, Detmers PA, Wright SD, Silverstein SC (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1044-1048
16. Staunton DE, Dustin ML, Erickson HP, Springer TA (1990) *Cell* **61**: 243-254
17. Diamond MS, Staunton DE, Martin SD, Springer TA (1991) *Cell* **65**: 961-971
18. Carrell NA, Fitzgerald LA, Steiner B, Erickson HP, Phillips DR (1985) *J Biol Chem* **260**: 1743-1749

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

19. Poncz M, Eisman R, Heidenreich R, Silver SM, Vilaire G, Surrey S, Schwartz E, Beunett JS (1987) *J Biol Chem* **262**: 8476-8482
20. Fitzgerald LA, Steiner B, Rall Jr, SC, Lo SS, Philips DR (1987) *J Biol Chem* **262**: 3936-3939
21. Uzan G, Frachet P, Lajmanowich A, Prandini MH, Denarier E, Duperray, A, Loftus J, Ginsberg M, Plow E, Marguerie G (1988) *Eur J Biochem* **308**: 1-7
22. Zimrin AB, Eisman R, Vilaire G, Schwartz E, Bennett JS, Poncz M (1988) *J Clin Invest* **81**: 1470-1477
23. Rivas GA, Gonzalez-Rodriguez J (1991) *Biochem J* **276**: 35-40
24. Piotrowicz RS, Plow EF, Smith JW (1993) w druku
25. Cierniewski CS, Plow E.F, Smith JW (1993) w druku
26. Kloczewiak MS, Timmons S, Hawiger J (1983) *Thromb Res* **29**: 249-255
27. Kloczewiak MS, Timmons S, Lukas TJ, Hawiger J (1984) *Biochemistry* **23**: 1767-1774
28. Plow EF, Srouji AH, Meyer D, Marguerie G, Ginsberg MH (1984) *J Biol Chem* **259**: 5388-5391
29. Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH (1992) *Seminars in Thromb and Hemost* **18**: 324-332
30. D'Souza SE, Ginsberg MH, Lom SC-T, Plow EF (1988) *J Biol Chem* **263**: 3943-3951
31. Smith JW, Cheresh DA (1988) *J Biol Chem* **263**: 18726-18731
32. Loftus JC, O'Toole TE, Plow EF, Glass A, Frelinger AL, Ginsberg MH (1990) *Science* **249**: 915-918
33. Andrieux A, Rabiet MJ, Chapel A, Concord E, Marguerie G (1991) *J Biol Chem* **266**: 14202-14207
34. Calvete JJ, Rivas G, Maurui M, Alvarez MV, McGregor IL, Hew CL, Gonzalez-Rodriguez J (1989) *Biochem J* **250**: 697-704
35. Niewiarowska J, Sobocka M, Cierniewski CS (1993) *Thromb Haemost* w druku
36. Haas TA, D'Souza SE, Cierniewski CS, Kent SBH, Plow EF (1993) *Thromb Haemost* w druku
37. Charo IF, Nannizzi L, Phillips DR, Hsu MA, Scarborough RM (1991) *J Biol Chem* **266**: 1415-1421
38. D'Souza SE, Ginsberg MH, Borke TA, Plow EF (1990) *J Biol Chem* **265**: 3440-3446
39. Gartner TK, Taylor DB (1990) *Throm Res* **60**: 291-309
40. Amrani DL, Kirschbaum N (1991) *FASEB J* **5**: 902
41. Blalock JE, Smith EM (1984) *Biochem Biophys Res Commun* **121**: 203-207
42. Brentani RR, Riberiro SF, Potocnjak P, Pasqualini R, Lopez JD, Nakaie CR (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 364-364
43. Pasqualini R, Chamone DF, Brentani RR (1989) *J Biol Chem* **264**: 14566-14570
44. Calvete JJ, Arias J, Alvarez MV, Lopez MM, Heuschen A, Gonzalez-Rodriguez J (1991) *Biochem J* **273**: 767-775
45. Tulinsky A (1991) *Thromb Haemost* **66**: 16-31
46. Horwitz A, Duggan E, Bucle C, Beckerle MC, Burrige K (1986) *Nature (Lond)* **320**: 531-533
47. Morcantonio EE, Guan JL, Trevithick JE, Hynes RO (1990) *Cell Regul* **1**: 597-604
48. Elices MJ, Urry LA, Hemler ME (1991) *J Cell Biol* **112**: 169-181
49. Wayner EA, Orlando RA, Cheresh DA (1991) *J Cell Biol* **113**: 919-929
50. O'Toole TE, Mandelmon D, Forsyth J, Shattil SJ, Plow EF (1991) *Science* **254**: 845-847
51. Hillery CA, Smyth SS, Paris LV (1991) *J Biol Chem* **266**: 14663-14669
52. Shattil SJ, Bruggie JS (1991) *Curr Opin Cell Biol* **3**: 869-879
52. Shattil SJ, Bruggie JS (1991) *Curr Opin Cell Biol* **3**: 869-879
53. O'Toole TE, Loftus JC, Du XP, Glass AA, Rugeri ZM, Shattil SJ, Plow EF, Ginsberg MH (1991) *Cell Regul* **1**: 883-893
54. van Willigen G, Akkerman JWN (1992) *Blood* **79**: 82-90
55. Cierniewski CS, Kowalska MA, Krajewski T, Janiak A (1982) *Biochim Biophys Acta* **714**: 543-548
56. Gulino D, Ryckewaert JJ, Andrieux A, Rabiet MJ, Marguerie G (1990) *J Biol Chem* **265**: 9575-9585
57. Kouns WC, Wall CD, White MM, Fox C, Jennings LK (1990) *J Biol Chem* **265**: 20594-20601
58. Frelinger AL III, Du XP, Plow EF, Ginsberg MH (1991) *J Biol Chem* **266**: 17106-17111
59. Du XP, Plow EF, Frelinger AL III, O'Toole TE, Loftus JC, Ginsberg MH (1991) *Cell* **65**: 409-416
60. Shimizu Y, von Seventer G, Horgan KJ, Shaw S (1990) *Nature (Lond)* **345**: 250-253
61. Chan BM, Wong JG, Rao A, Hemler ME (1991) *J Immunol* **147**: 398-404
62. Wilkins JA, Stupack D, Stewart S, Caixia S (1991) *Eur J Immunol* **21**: 517-522
63. Hemler ME (1990) *Annu Rev Immunol* **8**: 365-400
64. Dahl SC, Grabel LB (1989) *J Cell Biol* **108**: 183-190
65. Tapley P, Horwitz AF, Buck CA, Burrige K, Dugg K, Hirst R, Rohrschneider L (1989) *Oncogene* **4**: 325-333
66. Lipfert L, Haimovich B, Schaller MD, Cobb BS, Parsons JT, Brugge JS (1992) *J Cell Biol* **119**: 9521-9525
67. Manning DR, Brass LF (1991) *Thromb Haemost* **66**: 393-399
68. Shattil SJ, Brugge JS (1991) *Curr Opin Cell Biol* **3**: 869-879
69. Huang MM, Bolen JB, Bornwell JW, Shattil SJ, Brugge JS (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7844-7848
70. Koch CA, Anderson D, Morou MJ, Ellis C, Pawson T (1991) *Science* **252**: 668-674
71. Schwartz MA, Lechene C, Ingber IE (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7849-7853
72. Matsuyama Y, Yamada A, Kay J, Yamada KM, Akiyama SK, Schlossman SF, Morimoto C (1989) *J Exp Med* **170**: 1133-1148
73. Burkly LC, Jakubowski A, Newman BM, Rosa MD, Chi-Rosso G, Lobb R (1991) *Eur J Immunol* **21**: 2871-2875
74. Sporn SA, Eierman DF, Johnson CE, Morris J, Martin G, Ladner M, Haskill S (1990) *J Immunol* **144**: 4434-4441
75. Nathan C, Srimal S, Farber C, Sauchez E, Kabbash L, Asch A, Gailit J, Wright SD (1988) *J Cell Biol* **109**: 1341-1349
76. Jacini MEE, Theler JM, Schlegel W, Appel RD, Wright SD, Lew PD (1991) *J Cell Biol* **112**: 1249-1257
77. Staatz WD, Rajpara SM SM, Wayner EA, Carter WC, Santoro SA (1989) *J Cell Biol* **108**: 1917-1924
78. Hermanowski-Vosatha A, Van Strips JAG, Swiggard WJ, Wright SD (1992) *Cell* **68**: 341-352
79. Keizer GD, Vissar W, Vliem M, Figdor CG (1988) *J Immunol* **140**: 1393-1400
80. Wright SD, Silverstein GC (1982) *J Exp Med* **156**: 1149-1164
81. Wright SD, Rao PE, Van Voorhis WC, Craigmyl LS, Jida K, Talle M, Westberg EF, Goldstein G, Silverstein SC (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 5699-5703
82. Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, Galletin M, Harlan J, Kishimoto K, Lasky L, McEver R, Paulson J, Rosen S, Seed B, Siegelruan M, Springer T, Stoolman L, Teelder T, Varki A, Wagner D, Weissman I, Zimmerman G (1991) *Cell* **67**: 233
83. Lawrence MB, Springer TA (1991) *Cell* **65**: 859-873
84. Larson RH, Hibbs ML, Springer TA (1991) *Cell Regul* **1**: 359-367
85. Hibbs ML, Xu H, Stacker SA, Springer TA (1991) *Science* **215**: 1611-1613

# Agryna — budowa i rola w tworzeniu synaps nerwowo-mięśniowych

## Agrin — structure and role in neuromuscular junction

ANNA FILIPEK\*

### Spis treści:

- I. Wstęp — odkrycie agryny
- II. Budowa i właściwości cząsteczki agryny
- III. Izoformy agryny i ich występowanie
- IV. Mechanizm działania agryny
- V. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: ACh — acetylocholina; AChR(s) — receptor (y) acetylocholino.

### I. Wstęp — odkrycie agryny

Poznanie mechanizmów przekazywania informacji między komórkami jest od dawna przedmiotem intensywnych badań. Dotyczy to zarówno przekazywania sygnału pomiędzy komórkami nerwowymi w mózgu, jak też pomiędzy neuronami i komórkami mięśniowymi. Przesyłanie sygnału związane jest z transportem wzdłuż aksonu cząsteczek przekaźników, tzw. neurotransmiterów, które są następnie uwalniane na zewnątrz z zakończenia komórki nerwowej. Z uwagi na fakt, że połączenia między neuronami w mózgu charakteryzują się dużą gęstością i różnorodnością, wcześniejsze badania skupiały się na lepiej poznanym układzie, jakim jest połączenie neuronu z komórką mięśniową. Połączenie to zwane jest synapsą nerwowo-mięśniową.

Jednym z najwcześniej poznanych związków uczestniczących w przekazywaniu informacji jest acetylocholina (ACh), syntetyzowana i wydzielana m.in. przez neuron ruchowy. Acetylocholina, po związaniu się z receptorem acetylocholino (AChR) w błonie komórki mięśniowej, wywołuje kaskadę reakcji prowadzących do skurczu mięśnia. Receptor acetylocholino jest pentamerem zbudowanym z dwóch podjednostek  $\alpha$  oraz polipeptydów  $\beta\gamma\delta$ . W błonie nieunerwionych włókien tzn. włókien mięśniowych zarodka lub w błonie odnerwionych włókien dojrzałego mięśnia, receptory acetylocholino przemieszczają się swobodnie i rozmieszczają w błonie równomiernie. W kilka godzin po wytworzeniu synapsy nerwowo-mięśniowej, receptory acetylocholino tworzą agregaty w błonie postsynap-

### Contents:

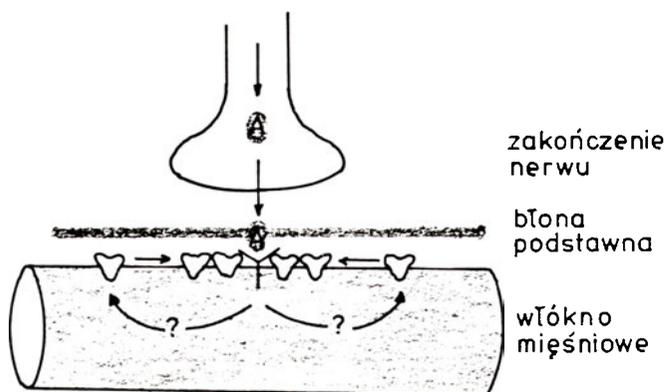
- I. Introduction — discovery of agrin
- II. Structure and properties of the agrin molecule
- III. Isoforms of agrin and their distribution
- IV. Mechanism of agrin action
- V. Final remarks

tycznej, gdzie jest ich około 1000 razy więcej niż w pozostałych obszarach błony mięśniowej.

W latach siedemdziesiątych McManis i wsp. [1] zaobserwowali, że w błonie włókien mięśniowych hodowanych *in vitro* receptory acetylocholino skupiają się w tych miejscach, gdzie znajduje się połączenie włókna z neuronem. Te obserwacje skłoniły badaczy do poszukiwania substancji odpowiedzialnej za agregację receptorów. Przypuszczano, że substancja taka może znajdować się w błonie podstawowej mięśnia — błonie, która zwykle pozostaje nieuszkodzona mimo zniszczenia zarówno włókna mięśniowego jak i dochodzącego do niego zakończenia nerwowego.

W 1984 roku udało się wyodrębnić z narządu elektrycznego drętwy *Torpedo californica* białko, które powodowało agregację receptorów acetylocholino w hodowanych *in vitro* włóknach mięśniowych kurczęcia [2, 3]. Białko to ze względu na posiadaną zdolność agregowania białek postsynaptycznych nazwano agryną. Wkrótce potem wykazano, że białko o podobnych właściwościach występuje w błonie podstawnej otaczającej włókna mięśniowe żaby i kurczęcia [4]. Badania immunocytochemiczne wykazały, że agryna jest transportowana wzdłuż aksonu do zakończeń komórki nerwowej [5, 6], a następnie jest uwalniana i wbudowywana w błonę podstawną włókna mięśniowego (Ryc. 1). Obecność agryny w błonie powoduje agregację receptorów acetylocholino [7, 8]. Przedstawiony powyżej mechanizm działania agryny, zaproponowany przez McManisa [8], poddano w wątpliwość, kiedy okazało się, że agryna występuje także w innych tkankach [9]. Następne badania, prowadzone przez Reist i wsp. [10], miały więc na celu stwierdzenie, która agryna (pochodząca z tkanki nerwowej czy mięśniowej) ma własności agregujące receptory acetylocholino. Przekonujących danych dostarczyły wyniki doświadczeń przeprowadzonych na hodowlach włókien mięśniowych *in vitro*. Zaobserwowano, że w hodowli mieszanej komórek mięśni-

\* Dr, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Biochemii Mięśni, 02-093 Warszawa ul. Pasteura 3



Ryc. 1. Schemat działania agryny w agregacji receptorów acetylocholino.

wych kurczenia z motoneuronami kurczenia lub szczura, agregacja receptorów acetylocholino w błonie postsynaptycznej występuje w obu przypadkach. Natomiast, kiedy do obu hodowli dodano przeciwciał, które hamują jedynie aktywność agryny z kurczenia, stwierdzono brak agregatów AChRs tylko w hodowli, w której były obecne motoneurony kurczenia. Te wyniki wskazywały, że agryna pochodząca z neuronów (a nie z mięśni) powoduje agregację receptorów acetylocholino w błonie komórek mięśniowych. Rola agryn pochodzących z tkanek nienerwowych pozostaje niewyjaśniona. Sądzi się jedynie [10], że mogą one pełnić pomocnicze funkcje w tworzeniu połączeń nerwo-mięśniowych.

## II. Budowa i właściwości cząsteczki agryny

Zastosowanie metod inżynierii genetycznej w badaniach cząsteczki agryny datuje się od 1990 roku. Metody te, z zastosowaniem cDNA komplementarnego z mRNA przyczyniły się do poznania pierwszorzędowej struktury agryny pochodzącej z różnych źródeł [8, 11-13]. Na podstawie analizy sekwencji zasad w mRNA wykazano, że cząsteczka agryny kurczenia i szczura jest zbudowana z około 1900 reszt aminokwasowych i ma masę około 200 kDa. Schematycznie strukturę tego białka przedstawiono na rycinie 2. Analiza sekwencji agryny wskazuje na obecność w niej wielu domen, które są homologiczne z domenami występującymi w innych znanych białkach, np. w lamininach (białkach występujących w dużych ilościach w błonie podstawowej mięśnia) czy inhibitorach proteaz z grupy Kazala.

Najbliżej N-końca cząsteczki agryny znajduje się hydrofobowy fragment (reszty 22-50) zawierający głównie walinę, leucynę i izoleucynę. Przypuszcza się, że fragment ten może utrzymywać cząsteczkę agryny w błonie presynaptycznej. Usunięcie reszt 22-50 wskutek trawienia proteolitycznego może uwalniać cząsteczkę agryny z błony presynaptycznej i powodować jej migrację w kierunku błony podstawnej.

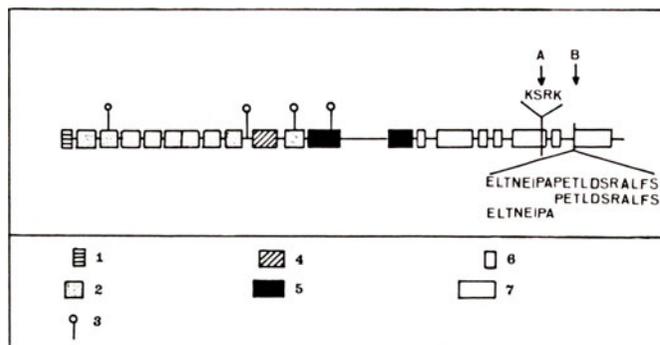
W dalszej części sekwencji agryny wyróżnia się 9 domen, które wykazują wysoki stopień homologii z domenami występującymi w inhibitorach proteaz

z grupy Kazala. Domeny te charakteryzują się następującym motywem struktury:  $CX_6CX_7CX_{10}CX_2CX_{17}C$ , gdzie litera C oznacza resztę cysteiny a X — inne reszty aminokwasowe. Reszty cysteiny w domenach inhibitorów proteaz tworzą wiązania dwusiarczkowe pomiędzy sobą: pierwsza cysteina z czwartą ( $C_1-C_4$ ), druga z piątą ( $C_2-C_5$ ) oraz trzecia z szóstą ( $C_3-C_6$ ) [14, 15]. Ponieważ cząsteczka agryny zawiera aż 9 domen homologicznych z domenami występującymi w inhibitorach proteaz, przypuszcza się, że może ona regulować aktywność różnych białek enzymatycznych.

Pomiędzy 8 i 9 domeną podobną do domen występujących w inhibitorach proteaz, w cząsteczce agryny wyróżnia się fragment polipeptydowy składający się z dwóch połączonych ze sobą homologicznych domen, podobnych do tzw. domeny III występującej w lamininach. Domena ta w cząsteczce agryny charakteryzuje się obecnością 18 reszt cysteiny oraz dużą liczbą reszt glicyny. Reszty cysteiny, podobnie jak w domenach homologicznych z domenami występującymi w inhibitorach proteaz, mogą tworzyć mostki S-S. Reszty glicyny prawdopodobnie zapewniają giętkość strukturze białka i umożliwiają powstawanie małych pętli na skutek utworzenia wiązań dwusiarczkowych. Trzy domeny o wysokim stopniu homologii z lamininą A występują w cząsteczce agryny w pobliżu C-końca. Przypuszcza się, że domeny te mogą wykazywać aktywność mitogenną oraz wpływać na adhezję komórkową.

Centralną część cząsteczki agryny zajmują dwie domeny bogate w reszty serynowe i treoninowe. Pierwsza domena składa się ze 123 reszt aminokwasowych i zawiera 16 reszt treoniny, 29 reszt seryny i 19 reszt proliny. Na drugą domenę składa się 69 aminokwasów, a wśród nich jest 18 reszt treoniny, 5 reszt seryny i 11 reszt proliny.

W części cząsteczki położonej w pobliżu C-końca znajdują się cztery fragmenty homologiczne z domena-



Ryc. 2. Organizacja domen w obrębie cząsteczki agryny szczura.

1 — N-końcowy fragment hydrofobowy; 2 — domeny homologiczne z domenami w inhibitorach proteaz; 3 — potencjalne miejsca N-glikozylacji; 4 — domena homologiczna z domeną III w lamininach; 5 — domeny serynowo-treoninowe; 6 — domeny EGF; 7 — domeny homologiczne z lamininą A.

Literami A i B oznaczono pozycje w cząsteczce agryny, w których mogą występować dodatkowe fragmenty polipeptydowe. Reszty aminokwasowe w tych fragmentach przedstawiono w kodzie jednoliterowym.

mi EGF. Motyw EGF składa się z sześciu reszt cysteiny oddzielonych innymi aminokwasami zgodnie ze wzorem:  $CX_{4-6}CX_{5-6}CX_{4-15}CXCX_{3-8}C$ . W domenach EGF pierwsza cysteina łączy się z trzecią, druga z czwartą, a piąta z szóstą. Domeny EGF zwykle występują w zewnątrzkomórkowych fragmentach białek błonowych oraz w białkach wydzielonych w procesie egzocytozy.

Agryna zawiera również w swej sekwencji cztery miejsca, które mogą ulegać N-glikozylacji oraz dwa fragmenty łańcucha o składzie leucyna-arginina-kwas glutaminowy (LRE). Jedna sekwencja LRE znajduje się wewnątrz siódmej domeny homologicznej z domenami występującymi w inhibitorach proteaz. Drugi taki tripeptyd występuje pomiędzy fragmentami bogatymi w serynę i treoninę. Przypuszcza się, że sekwencje LRE mogą oddziaływać z błoną presynaptyczną neuronu jak i błoną postsynaptyczną komórki mięśniowej [16].

### III. Izoformy agryny i ich występowanie

Badania genetyczne wykazały, że w wyniku różnicowej obróbki pre-mRNA (procesu zwanego "alternative splicing") powstaje wiele izoform agryny [12, 17-19], różniących się w pobliżu C-końca cząsteczki. Analiza sekwencji izoform agryny szczura wskazała na możliwość występowania dwóch fragmentów polipeptydowych w pozycji A i B (Ryc. 2). Pierwszy fragment (pozycja A) odpowiada sekwencji 4 aminokwasów, a drugi (pozycja B) — sekwencji 19 aminokwasów. W rzeczywistości na fragment w pozycji B składają się dwie krótsze sekwencje zawierające 8 i 11 reszt aminokwasowych. Izoformy agryny, w których występują fragmenty 8- lub 11-aminokwasowe w pozycji B nazywane są odpowiednio  $B_8$  i  $B_{11}$ . Izofорма nie zawierająca żadnego fragmentu w pozycji B oznaczona jest symbolem  $B_0$ , a izofорма posiadająca obydwa fragmenty w pozycji B — symbolem  $B_{19}$ . Podczas obróbki pre-mRNA agryny, sekwencje w pozycjach A i B mogą pozostawać w mRNA lub też mogą być usunięte. Teoretycznie istnieje więc możliwość syntezy 8 różnych izoform agryny na bazie tego samego genu. Zauważono jednak, że wszystkie izoformy posiadające w swej sekwencji dowolny fragment aminokwasowy w pozycji B, zawierają także 4-aminokwasowy fragment w pozycji A, co ogranicza ilość możliwych izoform agryny.

Badania agryny szczura [20] wykazały, że izoformy tego białka różnią się zdolnością do agregacji receptorów acetylocholin. Izoformy  $B_8$ ,  $B_{11}$ ,  $B_{19}$  agryny powodują w różnym stopniu agregację receptorów acetylocholin. Obecność izoformy  $B_0$  nie prowadzi do powstania agregatów AChRs. Podobne wyniki otrzymano w badaniach agryny z kurczęcia [19]. W obydwu przypadkach najbardziej aktywną izoformą (w największym stopniu powodującą agregację receptorów acetylocholin) jest izofорма  $B_{19}$ . Izofорма  $B_{19}$  jest też główną formą występującą w motoneuronach kurczęcia i szczura.

**Tabela 1.**

Lokalizacja izoform agryny w zarodku kurczaka.

	$B_0$	$B_{11}$	$B_{19}$
<b>Ośrodkowy układ nerwowy</b>			
przodomózgowie	+	+	+
pokrywa wzrokowa	+	+	+
mózdzek	+	+	+
rdzeń kręgowy	+	+	+
siatkówka	+	+	-
nerw wzrokowy	+	-	-
cewka nerwowa	+	-	-
<b>Obwodowy układ nerwowy</b>			
zwoje rzęskowe	+	-	+
zwoje grzbietowe	+	+	+
<b>Inne tkanki</b>			
mięśniowe szkieletowe	+	-	-
wątroba	+	-	-
nerka	+	-	-
mięsień sercowy	+	-	-

Badania występowania różnych izoform agryny w 10-13 dniowym zarodku kurczęcia, tzn. w okresie, kiedy liczba tworzonych połączeń nerwowo-mięśniowych jest największa, wykazały, że aktywne formy tego białka występują tylko w tkance nerwowej. Forma nieaktywna ( $B_0$ ) występuje natomiast we wszystkich badanych tkankach (Tab. 1). Przedstawione wyniki sugerują, że spośród różnych form agryny, izofорма powodująca agregację receptorów pochodzi z neuronów. Pozostaje pytanie, jakie fizjologiczne znaczenie mogą mieć izoformy pochodzenia nieneuronalnego? Jak dotąd przypuszcza się jedynie, że mogą one odgrywać jakąś dodatkową rolę w agregacji receptorów acetylocholin lub uczestniczyć w agregacji innych białek w błonie postsynaptycznej.

### IV. Mechanizm działania agryny

Sposób, w jaki agryna działa na receptory acetylocholin powodując ich agregację nie jest dotychczas wyjaśniony. Na podstawie danych dostępnych w literaturze można przypuszczać, iż agryna działa poprzez swoisty receptor (różny od AChR) występujący w błonie komórki mięśniowej. Wyniki badań wiązania się agryny z komórkami mięśniowymi hodowanymi *in vitro* wskazują, że miejsca wiązania się jej w błonie postsynaptycznej nie odpowiadają rozmieszczeniu receptorów acetylocholin. Ten wynik oraz stwierdzenie, że wiązanie się agryny z błoną postsynaptyczną jest procesem zależnym od jonów wapnia wskazują na prawdopodobieństwo istnienia swoistego receptora agryny [21].

Wyniki niektórych doświadczeń pozwalają przypuszczać, że udział agryny w agregacji AChRs polega na indukcji fosforylacji tyrozyny w  $\beta$  podjednostce receptorów acetylocholin [22]. Ufosforylowana  $\beta$  podjed-

nostka receptora acetylocholinyl może następnle oddziaływać z podbłonowym białkiem 43 kDa (które występuje w stosunku 1:1 z receptorem acetylocholinyl) [23] i powodować unieruchomienie swobodnie przemieszczających się wzdłuż błony receptorów acetylocholinyl. W tworzeniu agregatów AChRs możliwe jest uczestnictwo innych białek cytoszkieletu, oprócz białka 43 kDa. Przedstawiony przebieg zachodzących zjawisk wydaje się być prawdopodobny w przypadku włókien mięśniowych kurczenia. We włóknach mięśniowych ssaków nie wykryto ufosforylowanych reszt tyrozyny w  $\beta$  podjednostce AChRs i dlatego przypuszcza się, że jest inny mechanizm działania agryny w tych komórkach [24].

## V. Uwagi końcowe

Agryna jest białkiem o masie ok. 200 kDa, zawierającym w swej sekwencji domeny homologiczne z domenami występującymi w innych znanych białkach. Obecność kilku fragmentów polipeptydowych w cząsteczce agryny homologicznych z domenami występującymi w inhibitorach proteaz, z domenami w lamininach oraz z domenami EGF, sugeruje udział tego białka, oprócz uczestnictwa w tworzeniu synaps nerwowo-mięśniowych, w wielu procesach komórkowych.

Z przeprowadzonych badań wynika, że spośród różnych izoform agryny, tylko izoformy pochodzenia neuronalnego biorą udział w tworzeniu synaps nerwowo-mięśniowych. Działanie agryny poprzez swoisty receptor czyni wysoce prawdopodobnym udział tego białka w tworzeniu połączeń między komórkami nerwowymi w mózgu. Wysoki poziom agryny w mózgu i w rdzeniu kręgowym obserwowany podczas rozwoju, wydaje się potwierdzać tę hipotezę. Dalsze badania nad strukturą agryny oraz mechanizmem jej działania mogą w niedługim czasie dostarczyć nowych informacji na temat roli agryny w układzie nerwowym, a w szczególności w procesach związanych z uczeniem się i pamięcią.

## Podziękowania

Pragnę podziękować prof. J. Kuźnickiemu za cenne uwagi dotyczące przygotowanego artykułu.

Dziękuję również wydawnictwom *Current Biology Ltd* i *Cell Press* za wyrażenie zgody na przedrukowanie rysunków i tabel z czasopism *Current Opinion in Cell Biology* oraz *Cell*.

Praca wykonana w ramach działalności statutowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.

Artykuł otrzymano 14 października 1993 r.  
Zaakceptowano do druku 9 grudnia 1993 r.

## Piśmiennictwo

- Burden SJ, Sargent PB, McMahan UJ (1979) *J Cell Biol* **82**: 412-425
- Godfrey EW, Nitkin RM, Wallace BG, Rubin LL, McMahan UJ (1984) *J Cell Biol* **99**: 615-627
- Nitkin MR, Smith MA, Magill C, Fallon JR, Yao Y-MM, Wallace BG, McMahan UJ (1987) *J Cell Biol* **105**: 2471-2478
- Reist NE, Magill C, McMahan UJ with the technical assistance of Marshall RM (1987) *J Cell Biol* **105**: 2457-2469
- Magill-Solc C, McMahan UJ (1988) *J Cell Biol* **107**: 1825-1833
- Magill-Solc C, McMahan UJ (1990) *J Exp Biol* **153**: 1-10
- Ferns MJ, Hall ZW (1992) *Cell* **70**: 1-3
- McMahan UJ (1990) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **50**: 407-418
- Godfrey EW (1991) *Exp Cell Res* **195**: 99-109
- Reist NE, Werle MJ, McMahan UJ (1992) *Neuron* **8**: 865-868
- Rupp F, Özcelik T, Linial M, Peterson K, Francke U, Scheller R (1992) *J Neurosci* **12**: 3535-3544
- Rupp F, Payan DG, Magill-Solc C, Cowan DM, Scheller RH (1991) *Neuron* **6**: 811-823
- Smith MA, Magill-Solc C, Rupp F, Yao YMM, Schilling JW, Snow P, McMahan UJ (1992) *Mol Cell Neurosci* **3**: 406-417
- Kazal LA, Spicer DS, Brahinsky RA (1948) *J Am Chem* **70**: 3034-3040
- Laskowski M, Kato I (1980) *Anu Rev Biochem* **49**: 593-626
- Hunter DD, Porter BE, Bullock JW, Adams SP, Merlie JP, Sanes JR (1989) *Cell* **59**: 905-913
- McMahan UJ, Horton SE, Werle MJ, Honig LS, Kröger S, Ruegg MA, Escher G (1992) *Curr Opin Cell Biol* **4**: 869-874
- Ruegg MA, Tsim KWK, Horton SE, Kröger S, Escher G, Gensch EM, McMahan UJ (1990) *Neuron* **8**: 691-699
- Tsim KWK, Ruegg MA, Escher G, Kröger S, McMahan UJ (1992) *Neuron* **8**: 677-689
- Ferns M, Hoch W, Campanelli JT, Rupp F, Hall ZW, Scheller RH (1992) *Neuron* **8**: 1079-1086
- Nastuk MA, Lieth E, Ma J, Cardasis CA, Moynihan EB, McKechnie B, Fallon JR (1991) *Neuron* **7**: 807-818
- Wallace BG, Qu Z, Haganir RL (1991) *Neuron* **6**: 869-878
- Phillips WD, Kopta C, Blount P, Gardner PD, Steinbach JH, Merlie JP (1991) *Science* **251**: 568-570
- Qu Z, Moritz E, Haganir RL (1990) *Neuron* **2**: 367-378

## 16 th International Congress of Biochemistry

New Delhi, India, 19—24 September 1994

Info: The Secretary General, XVI IUBHB

Congress Indian Institute of Science, Bangalore 560 012, India

# Kompleks cytochromów b/f z błon chloroplastowych

## Cytochrome b/f complex of chloroplast membranes

Elżbieta Romanowska\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Skład kompleksu cytochromowego b/f
- III. Rozmieszczenie kompleksu cytochromowego b/f w błonach chloroplastowych
- IV. Działanie kompleksu
- V. Organizacja genów kompleksu cytochromowego b/f
- VI. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** cyt.—cytochrom; DBMIB—2,5-dwubromo-3-metylo-6-izopropyl-benzochinon; DNP-INT — eter 2-jodo-6-izopropyl-3-metylo-2',4,4'-trzynitrodwufenylu; EPR—elektronowy rezonans paramagnetyczny; FNR — reduktaza ferredoksyna-NADP<sup>+</sup>; HQNO — N-tlenek 2-(n-heptylo)-4-hydroksychinolinu; UHDBT — 5-(n-undecylo)-6-hydroksy-4,7-dwuoksobenzotiazol.

### I. Wstęp

Wszystkie błony fotosyntetyczne zawierają kompleks cytochromowy b/c1 lub b/f katalizujący utlenianie chinonów i redukcję wysokopotencjałowych przenośników elektronów, takich jak cytochrom c2 lub plastocjanina. Kompleks cytochromowy b/f z błon chloroplastowych gra centralną rolę w transporcie elektronów pomiędzy fotosystemami PS II i PS I [1], od plastochinonu do wysokopotencjałowego akceptora elektronów — plastocjaniny oraz w cyklicznym transporcie elektronów wokół PS I [2]. Transportowi elektronów towarzyszy kierunkowe przeniesienie protonów przez błony. W konsekwencji prowadzi to do wytwarzania elektrochemicznego potencjału protonowego umożliwiającego syntezę ATP [3].

Fotosyntetyczny kompleks cytochromowy b/f — w odniesieniu do funkcji i składu — jest analogiem kompleksu III znajdującego się w mitochondriach [4,5]. Kompleks mitochondrialny został odkryty w 1960 r. Dalsze, klasyczne już badania tego kompleksu doprowadziły do wyizolowania aktywnej formy działającej jako ubichinon-cytochrom c oksydoreduktaza [6,7].

Kompleks cytochromowy b/f z chloroplastów został wyizolowany po raz pierwszy w 1972 r. przez Nelsona i Neumanna [8], ale był on nieaktywny. Katalitycznie aktywny kompleks, wyizolował w 1981 r. Hurt i Hauska [9]. Użyto kombinacji dwóch

### Contents:

- I. Introduction
- II. Composition of the cytochrome b/f complex
- III. Distribution of the cytochrome b/f complex in the chloroplast membranes
- IV. Function of the complex
- V. Organization of the genes for the cytochrome b/f complex
- VI. Concluding remarks

detergentów cholan/oktyloglukozyd dla upłynnienia błon i selektywnej ekstrakcji kompleksu. Przed użyciem detergentów błony przemywano NaBr w celu usunięcia syntazy ATP. Kompleks oczyszczono przez frakcjonowanie siarczanem amonu, następnie przez wirowanie w gradiencie gęstości sacharozy. Opracowano wiele innych metod izolowania kompleksu cytochromowego [9-13], a większość ich opiera się na metodzie Hurta i Hauski [9].

Tematem obecnego artykułu jest przegląd najnowszych wyników badań dotyczących:

- a) struktury i funkcji kompleksu cytochromowego b/f
- b) rozmieszczenia kompleksu w błonach chloroplastowych
- c) organizacji genów kompleksu cytochromowego b/f.

### II. Skład kompleksu cytochromowego b/f

Kompleks cytochromowy b/f u organizmów eukariotycznych i cyjanobakterii składa się z 4 głównych polipeptydów: cytochromu f (34 kDa), cytochromu b (23 kDa), białka Rieskego Fe-S (20 kDa) oraz podjednostki IV (17 kDa)[3, 5]. W kompleksie tym wyizolowanym z liści kukurydzy, znaleziono również białko o masie cząsteczkowej 4 kDa o niezidentyfikowanej funkcji, które nazwano podjednostką V [14].

W 1992 r. Romanowska i Albertsson [15] stosując metody immunologiczne, stwierdzili obecność białka 4 kDa oraz plastocjaniny w kompleksie cytochromowym b/f z liści szpinaku. Inni badacze [10, 14, 16] także obserwowali obecność białek niskocząsteczkowych (< 10 kDa) w kompleksie b/f, ale nie udowodnili, że są one komponentami kompleksu. Stwierdzono ponadto [17], obecność jednej cząsteczki plastochinonu związanego z tym kompleksem.

Jedną z cech charakterystycznych kompleksu cytochromowego, jest obecność „czterech grup transportu elektronów”. Dwie z nich mają wysoki potencjał oksydoredukcyjny ( $E_m > +250$  mV). Są to cyto-

\* Dr, Zakład Fizjologii Roślin II, Uniwersytet Warszawski 00-927 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 26/28

chrom f (c-typ hemu,  $E_m = +340$  mV) i białko Rieskiego Fe-S ( $E_m = +290$  mV). Do niskopotencjalowych przenośników należą dwie grupy hemowe związane z cytochromem b ( $E_m = -50$  mV i  $-170$  mV). Podjednostka IV (17 kDa) nie zawiera grup przenoszących elektrony, uważa się, że jednostka ta wiąże plastochinon w kompleksie b/f (18) i/lub stabilizuje pozostałe komponenty w kompleksie [19]. W błonach mitochondrialnych znaleziono 10-12 komponentów kompleksu cytochromowego b/c1, ale nie wykazano by 6-8 jego podjednostek uczestniczących w transporcie elektronów i funkcja tych podjednostek jest nieznana [20].

Masa cząsteczkowa kompleksu cytochromowego b/f wynosi 95-160 kDa [11, 21], co wskazuje na formę monomeryczną kompleksu. Pomiar wielkości kompleksu cytochromowego rekonstruowanego w błonach liposomalnych [22] sugeruje jednak strukturę dimeryczną. Fakt, że jedna cząsteczka inhibitora niecyklicznego transportu elektronów — DBMIB hamuje całkowicie przepływ elektronów przez dwie cząsteczki cytochromu, przemawia za dimeryczną strukturą kompleksu [23]. Niektórzy badacze [24] uważają, że aktywną formą kompleksu jest postać dimeryczna, inni natomiast [25], że aktywna forma jest monomerem. Wydaje się przez analogię do kompleksu mitochondrialnego, który działa jako dimer [26, 27], że chloroplastowy kompleks cytochromowy b/f również funkcjonuje w postaci dimerycznej. Stwierdzono [28], że usunięcie podjednostek niskocząsteczkowych z kompleksu mitochondrialnego powodowało zmianę równowagi monomer-dimer i wpływało na aktywność enzymatyczną kompleksu. Można przypuszczać, że zmiana równowagi monomer dimer w kompleksie cytochromowym b/f może kontrolować cykliczny i niecykliczny transport elektronów w fotosyntezie [4]. Problem ten, jak dotychczas, nie został jeszcze rozstrzygnięty.

### III. Rozmieszczenie kompleksu cytochromowego b/f w błonach chloroplastowych

Rozmieszczenie kompleksu cytochromowego b/f w błonach tylakoidowych u roślin wyższych i glonów zielonych jest nadal przedmiotem badań. Wysunięto trzy hipotezy:

- 1) cytochrom jest równomiernie rozmieszczony w błonach gran i stromy [29, 30],
- 2) cytochrom znajduje się wyłącznie w membranach stromy [31],
- 3) cytochrom jest rozmieszczony na obrzeżeniu gran [32, 33].

Hipotezy te opierają się na danych eksperymentalnych, brak jednak dowodów bezpośrednich. Immunocyto logiczna lokalizacja kompleksu cytochromowego w błonach chloroplastowych wskazuje na równomierną dystrybucję kompleksu pomiędzy błony gran i stromy [34, 35]. Rozmieszczenie kompleksu cytochromowego b/f w błonach chloroplastowych ustalono na

podstawie badań: proteolitycznych, immunologicznych oraz izotopowych.

Cytochrom f występuje w błonie w postaci pojedynczej  $\alpha$  helisy zbudowanej z 285 reszt aminokwasowych [36], rejon wiążący grupę hemową znajduje się w świetle tylakoidów [37, 38] i jest dużym hydrofilowym obszarem blisko końca N łańcucha polipeptydowego, który przekazuje elektrony na plastocjaninę. Liganami grupy hemowej, która ma układ prostopadły do płaszczyzny błony chloroplastowej, są dwie cząsteczki cysteiny [39]. Krótki koniec C (15 aminokwasów) łańcucha polipeptydowego znajduje się po stronie stromowej. Sekwencja aminokwasów cytochromu f wykazuje niski stopień homologii z jego analogiem — cytochromem c1 z kompleksu b/c1. Skład aminokwasowy cytochromu f u różnych gatunków wydzielających tlen jest identyczny w 80% [40].

Cytochrom b i podjednostka IV są najbardziej hydrofobowymi komponentami kompleksu. W kompleksie mitochondrialnym cytochrom b występuje w postaci pojedynczego polipeptydu (380 reszt aminokwasowych) o masie cząsteczkowej 42 kDa [20]. W kompleksie cytochromowym b/f z chloroplastów, cytochrom b jest homologiem N końca, a podjednostka IV-C końca łańcucha polipeptydowego mitochondrialnego cytochromu b [41, 42]. Cytochrom b chloroplastowy ma masę cząsteczkową 23 kDa (215 reszt aminokwasowych), a podjednostka IV — 17 kDa (160 reszt aminokwasowych) [41]. Oba białka chloroplastowe wykazują wysoki stopień konserwatywności — ok. 90% [20]. Ich skład aminokwasowy jest homologiczny w 40% w stosunku do składu aminokwasowego mitochondrialnego cytochromu b. Cytochrom b i podjednostka IV zbudowane są z siedmiu transmembranowych  $\alpha$  helis [41], a nie z ośmiu, jak dotychczas przypuszczano [44, 45]. Cytochrom b składa się z czterech transmembranowych łańcuchów polipeptydowych, których końce N i C znajdują się po stronie stromowej błony [46]. Zawiera on dwie grupy hemowe, różne pod względem spektralnym [47] i redoks [48], o układzie prostopadłym do powierzchni błony chloroplastowej [44]. Dwie pary histydyn znajdujące się na przeciwległych stronach błony tylakoidowej pełnią funkcję ligandów tych grup [42, 49, 50]. Hem po stronie stromowej utrzymywany jest przez HIS-100 i HIS-202, a po stronie światła tylakoidu przez HIS-86 i HIS-187 [36].

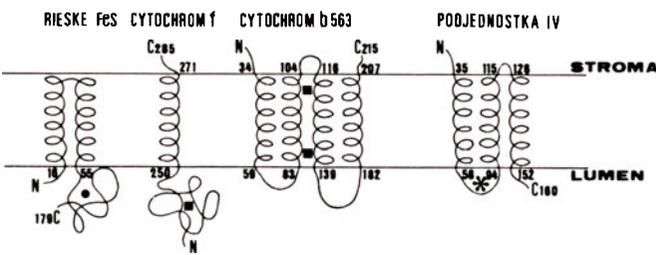
Podjednostka IV zbudowana jest z 3 łańcuchów transmembranowych. Koniec N łańcucha polipeptydowego znajduje się po stronie stromowej, a koniec C w świetle tylakoidu [41, 42]. W końcu C łańcucha występuje odcinek zbudowany z 4 reszt aminokwasowych (Pro-Glu-Trp-Tyr) silnie konserwatywny we wszystkich dostępnych sekwencjach [51]. Sekwencja ta odpowiedzialna jest za wiązanie plastochinonu w miejscu Qo [20].

Białko Rieskiego Fe-S zbudowane jest z 179 aminokwasów o masie cząsteczkowej 18.8 kDa [52]. Sekwen-

cja aminokwasów dedukowana z sekwencji nukleotydów jądowego DNA wykazała obecność dwóch wysoce konserwatywnych regionów: Cys-Tyr-His-Leu-Gly-Cys i Cys-Pro-Cys-His-Gli-Ser, zlokalizowanych blisko końca C łańcucha polipeptydowego leżącego w lumen tylakoidów [20]. Do niedawna uważano, że cztery cysteiny w pobliżu końca C białka Rieskiego są ligandami dla grupy Fe-S [53]. Wskazuje się obecnie na możliwość połączenia pomiędzy grupą Fe-S a histydyną i cysteiną. Wiązanie to tworzy się prawdopodobnie pomiędzy His-110 i Cys-113 oraz Cys-126 i His-129 [20]. W tej części łańcucha białkowego znajdują się dodatnio naładowane aminokwas arginina i/lub lizyna, które mogą być ligandami dla atomów azotu (N). Badania spektroskopowe wykazały, że białko Rieskiego zawiera dwa takie atomy azotu [54-56]. Ich obecność w cząsteczce białka Rieskiego może wyjaśniać niezwykle wysoki potencjał oksydoredukcyjny tego białka. Dysocjacja białka Rieskiego z tego kompleksu powoduje utratę jego aktywności enzymatycznej [57, 58]. Dokładniejsze położenie tego białka nie jest znane. Wysunięto alternatywne hipotezy lokalizacji białka Rieskiego w membranach:

- 1) oba końce N i C znajdują się w świetle tylakoidu, przez analogię z białkiem Rieske z mitochondriów, gdzie N i C koniec jest na zewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej [59].
- 2) koniec N znajduje się po stronie stromowej, a C w świetle tylakoidu gdzie może oddziaływać z grupą hemową cytochromu f [52].

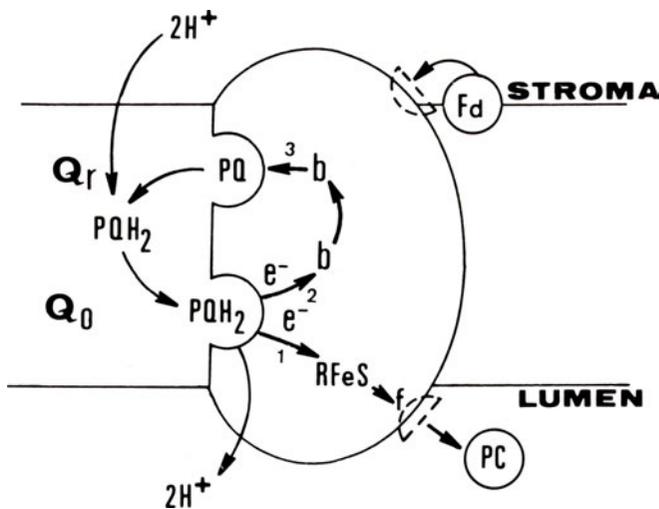
Ponieważ białko Rieskiego ma charakterystyczny sygnał EPR, może to być zatem cechą diagnostyczną na obecność kompleksu cytochromowego w błonach [60, 61]. Rozmieszczenie podjednostek kompleksu cytochromowego b/f w błonach tylakoidowych u roślin wyższych przedstawiono na rycinie 1.



Ryc. 1. Schemat rozmieszczenia składników kompleksu cytochromowego b/f w błonach chloroplastowych. N- i C- oznaczają końce łańcuchów polipeptydowych. Liczby oznaczają pozycje aminokwasów w peptydach liczone od końca N-. Kwadratem, kółkiem oraz gwiazdką oznaczono odpowiednio: grupę hemową, grupę Fe-S oraz miejsce wiązania plastochinonu.

#### IV. Działanie kompleksu

Kompleks cytochromowy sprzęga fotosyntetyczny transport elektronów z transportem protonów w poprzek błony tylakoidowej. „Cykl Q” Mitchella [62, 63] i „cykl-b” Wikstroma i wsp. (64, 65) to aktualne



Ryc. 2. Cykl-Q opisujący mechanizm transportu elektronów i protonów przez chloroplastowy kompleks cytochromowy b/f. Linia przerywana oznaczono miejsca gdzie wiążą się plastocjanina (PC) i ferredoksyna (Fd). Liczby oznaczają miejsce działania inhibitorów. 1 — DBMIB, DNP-INT, UHDBT; 2 — myksotiazol; 3 — HQNO.

hipotezy opisujące działanie kompleksu cytochromowego. Hipoteza „cyklu-Q” (Ryc. 2) zakłada obecność w kompleksie dwóch miejsc wiążących chinon zlokalizowanych na przeciwległych stronach błony. Jedno z tych miejsc jest oznaczone symbolem Q<sub>0</sub> (miejsce utleniające plastochinol), drugie Q<sub>r</sub> (miejsce redukujące plastochinon). W przypadku błon chloroplastowych Q<sub>0</sub> jest blisko wewnętrznej przestrzeni błonowej, podczas gdy Q<sub>r</sub> jest blisko zewnętrznej (stromowej) powierzchni błony. W miejscu Q<sub>0</sub> plastochinol jest utleniany dwustopniowo. Pierwszy uwalniany elektron jest transportowany do wysokopotencjałowego białka Rieskiego, a drugi do niskopotencjałowego hemu typu b zlokalizowanego przy Q<sub>0</sub>. Elektron przenoszony do białka Rieskiego jest następnie transportowany do cytochromu f-drugiego wysokopotencjałowego przenośnika elektronów i stąd do ostatniego akceptora elektronów — plastocjaniny. Drugi elektron z hemu niskopotencjałowego jest przenoszony w poprzek błony do drugiego hemu b — wysokopotencjałowego, znajdującego się w miejscu Q<sub>r</sub>. Elektron ten jest następnie wykorzystywany do redukcji cząsteczki plastochinonu do semichinonu. W drugim obrocie cyklu, drugi elektron w miejscu Q<sub>r</sub> może zredukować semichinon do — plastochinolu. W wyniku dwóch obrotów cyklu utleniane są dwie cząsteczki plastochinolu, jedna cząsteczka plastochinonu ulega redukcji, dwa elektrony przeniesione są na plastocjaninę i cztery protony zostają zdeponowane w lumen tylakoidów. „cykl-b” różni się od „cyklu-Q” w jednym zasadniczym punkcie. Redukcja plastochinonu do semichinonu w miejscu Q<sub>r</sub> nie zachodzi, gdyż powstały w miejscu Q<sub>0</sub> semichinon przesuwa się do miejsca Q<sub>r</sub> i jest tam redukowany do plastochinolu przez cytochrom b wysokopotencjałowy.

Jeśli kompleks cytochromowy funkcjonuje w po-

staci dimeru wystarczy jeden obieg do pełnej redukcji plastochinonu. Według Cramer i wsp [4] forma dimeryczna kompleksu cytochromowego odpowiedzialna jest za niecykliczny transport elektronów. Plastochinol jest wówczas utleniany do plastochinonu przez dwa centra Fe-S białka Rieskego. Nie powstaje semichinon a niskopotencjałowy cytochrom b nie ulega redukcji. Jeśli natomiast warunki metaboliczne preferują cykliczny transport elektronów, cytochrom jest przekształcany do formy monomerycznej, a plastochinol jest utleniany przez jedno centrum Fe-S do semichinonu, który redukuje cytochrom b niskopotencjałowy. Ferredoksyna lub/i FNR redukuje wysokopotencjałowy cytochrom b, co inicjuje cykliczny transport elektronów. Działanie „cyklu-Q” i „cyklu-b” w błonach zostało wielokrotnie potwierdzone eksperymentalnie [64-68]. Chociaż opisane hipotezy w pełni nie wyjaśniają mechanizmu transportu elektronów i protonów przez kompleks cytochromowy b/f [69-71]] to wynika z nich, że początkowy stan redox cytochromu b może decydować o tym, czy potencjał elektrochemiczny powstaje na drodze „cyklu-Q” czy też „cyklu-b” [72, 73]. Szczegółowe informacje o funkcjonowaniu obu cykli zostały zawarte w artykule przeglądowym Hope [74].

## V. Organizacja genów kompleksu cytochromowego b/f

U organizmów eukariotycznych informacja genetyczna o komponentach kompleksu cytochromowego b/f, oraz innych składnikach błon tylakoidowych zawarta jest zarówno w jądrze, jak i w chloroplastach [36].

Genom chloroplastowy koduje cztery podjednostki kompleksu: cytochrom f, cytochrom b, podjednostkę IV i V. Białko Rieskego Fe-S kodowane jest przez genom jądrowy (gen *pet C*) [36, 41, 75, 76]. Geny chloroplastowe zorganizowane są w dwie grupy, oddalone od siebie o 20 kb [20]. Gen kodujący cyt.f (*pet A*) znajduje się w innym operonie niż geny pozostałych komponentów kompleksu cytochromowego (gen *pet B*, *pet D*, *pet E* dla cytochromu b, podjednostki IV i V) i jest niezależnie transkrybowany [77]. Obecność intronów w genie *pet B* i *pet D* [78, 79] sugeruje, że nie są one kotranskrybowane i podlegają niezależnej regulacji. Poznano sekwencję aminokwasową wszystkich komponentów kompleksu cytochromowego na podstawie sekwencji nukleotydów DNA. Komponenty kompleksu cytochromowego są syntetyzowane w postaci prekursora o wyższym ciężarze cząsteczkowym w porównaniu z formą dojrzałą, będącą składnikiem kompleksu [77, 80, 81].

U organizmów prokariotycznych, gdzie pojedynczy operon koduje trzy podjednostki kompleksu b/c1, tworzenie stechiometrycznych ilości poszczególnych podjednostek jest proste [82, 83]. U organizmów eukariotycznych genom jądrowy i chloroplastowy muszą współdziałać w powstawaniu podjednostek

kompleksu cytochromowego b/f. Istnieje opinia, że połączenie komponentów kompleksu cytochromowego sterowane jest produktem genów jądrowych [84]. Stwierdzono, że białko Rieskego jest konieczne do połączenia komponentów kompleksu cytochromowego [85]. Miles [84] sugeruje, że białko to może pełnić funkcję „klucza” pochodzenia jądrowego odpowiedzialnego za integrację składników kompleksu.

## VI. Uwagi końcowe

Kompleks cytochromowy b/f jest centralnym elementem w fotosyntetycznym transporcie elektronów i protonów. Budowa i funkcja tego kompleksu nie jest wystarczająco dotąd wyjaśniona pomimo ogromnego postępu badań w ostatnich latach. Struktura krystaliczna również jest nieznana. Poznanie struktury przestrzennej kompleksu cytochromowego b/f powiąże wyniki badań z genetyki molekularnej i biologii strukturalnej dla pełnego zrozumienia zależności pomiędzy jego budową i funkcją.

Artykuł otrzymano 29 września 1993 r.

Zaakceptowano do druku 28 grudnia 1993 r.

## Piśmiennictwo

- Lam E, Malkin R (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 5491-5498
- Hind G, Crowther D, Shahak Y, Slavacek RE (1981) W: Akoyunoglou G (red) *Photosynthesis*, t 2 Balaban Inter Sci Series, Philadelphia, str 87-97
- Hauska G, Hurt E, Gabellini N, Lockau W (1983) *Biochim Biophys Acta* **726**: 97-133
- Cramer WA, Black MT, Widger WR, Girvin ME (1987) W: Barber J (red) *The Light Reactions*, Elsevier Sci Pub Inc New York, str 447-493
- Malkin R (1988) *ISI Atlas of Science Biochem* **1**: 57-64
- Rich PR (1984) *Biochim Biophys Acta* **768**: 53-79
- Trumpower BL, Katki AG (1979) W: Capaldi RA (red) *Membrane Proteins in Energy Transduction*, Marcell Dekker, New York, str 89-200
- Nelson N, Neumann J (1972) *J Biol Chem* **247**: 1817-1824
- Hurt E, Hauska G (1981) *Eur J Biochem* **117**: 591-599
- Hurt E, Hauska G (1982) *J Bioenerg Biomembr* **14**: 405-427
- Black MT, Widger G, Cramer WA (1987) *Arch Biochem Biophys* **252**: 655-661
- Clark RD, Hind G. (1983) *J Biol Chem* **258**: 10348-10354
- Doyle MF, Yu C-A (1985) *Biochem Biophys Res Comm* **131**: 700-706
- Haley J, Bogorad L. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 1536-1538
- Romanowska E, Albertsson P-A (1992) W: Murata N (red) *Research in Photosynthesis*, t 2. Kluwer Academic Publishers, str 507-510
- Philips AL, Gray JL (1983) *Eur J Biochem* **137**: 553-560
- Hurt EC, Hauska G (1982) *Biochim Biophys Acta* **682**: 466-473
- Doyle M, Li L-B, Yu C-A (1989) *J Biol Chem* **264**: 1387-1392
- Li L-B, Zou Y-P, Yu L, Yu C-A (1991) *Biochim Biophys Acta* **1057**: 215-222
- Malkin R (1992) *Photosynth Res* **33**: 121-136
- Hauska G, Hurt E, Gabellini N, Lockau W (1983) *Biochem Biophys Acta* **726**: 97-133
- Morschel E, Staehelin A (1983) *J Cell Biol* **97**: 301-310
- Graan T, Ort DR (1986) *Arch Biochem Biophys* **248**: 445-451

24. Pan RS, Chien LF, Wang MY, Pan RL, Hsu BD (1987) *Plant Physiol* **83**: 158-163
25. Nugent JHA, Evans MCW (1980) *FEBS Lett* **112**: 1-4
26. Weiss H, Perkins SJ, Leonard K (1983) W: Quagliariello E, Palmieri (red) Structure and Function of Membrane Proteins. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str 215-22
27. Linke P, Bechmann G, Gothe A, Weiss H (1990) *Eur J Biochem* **158**: 615-621
28. Schmitt ME, Trumpower BL (1990) *J Biol Chem* **265**: 17005-17011
29. Cox RP, Andersson B (1981) *Biochem Biophys Res Comm* **103**: 1336-1342
30. Anderson JM (1982) *FEBS Lett* **138**: 62-66
31. Henry LEA, Moller BL (1981) *Carlsberg Res Comm* **46**: 227-242
32. Barber J (1983) *Plant Cell Environment* **6**: 311-322
33. Girardidi MC, Melis A (1983) *Arch Biochem Biophys* **224**: 19-25
34. Allerd DR, Staehelin LA (1986) *Biochem Biophys Acta* **849**: 94-103
35. Olive J, Vallon O, Wollmn F-A, Recouvreur M, Bennoun P (1986) *Biochim Biophys Acta* **851**: 239-248
36. Willey DL, Gray JC (1988) *Photosynth Res* **17**: 125-144
37. Alt J, Herrmann RG (1984) *Curr Genet* **8**: 551-557
38. Willey DL, Auffret AD, Gray JC (1984) *Cell* **36**: 556-562
39. Hauska G (1986) W: Staehelin LA, Arntzen CJ (red) Encyclopedia of Plant Physiology t 19. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, str 496-507
40. Hauska G, Nitschke W, Herrmann RG (1988) *J Bioenerg Biomembr* **20**: 211-228
41. Philips AL, Gray JC (1984) *Mol Gen Genet* **194**: 472-484
42. Widger WA, Cramer WA, Herrmann RG, Trebst A (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 674-678
43. Cramer WA, Furbacher PN, Szczepaniak A, Tal GS (1991) *Curr Top Bioenerg* **16**: 179-222
44. Hauska G (1986) W: Staehelin LA, Arntzen CJ (red) Photosynthesis III, Photosynthetic Membranes and Light Harvesting Systems, Berlin, Springer-Verlag, str 495-507
45. Saraste M (1984) *FEBS Lett* **166**: 367-372
46. Szczepaniak A, Cramer W (1990) *J Biol Chem* **265**: 17720-17726
47. Baroli I, Fernandez-Velasco J, Crofts AR (1991) *Biophys J* **59**: 145
48. O'Keefe DP (1988) *Photosynthesis Res* **17**: 189-216
49. Carter KR, Tsai A-L, Palmer G (1981) *FEBS Lett* **132**: 243-246
50. Simpkin D, Palmer G, Devin FJ, Mokenna MC, Jensen GM, Stephens PJ (1989) *Biochem* **28**: 8033-8039
51. Nitsche W, Hauska GW (1987) W: Biggins J (red) Progress in Photosynthesis Research t 2. Dordrecht: Martinus Nijhoff, str 165-171
52. Steppuhn J, Rother C, Hermans J, Salnikow J, Hauska G, Herrmann RG (1987) *Mol Gen Genet* **210**: 171-177
53. Kuila D, Fee JA (1986) *J Biol Chem* **261**: 2756-2774
54. Telser J, Hoffmann BM, Lo Brutto R, Ohnishi T, Tsai A-L, Simkin P, Palmer G (1987) *FEBS Lett* **214**: 117-121
55. Britt RD, Sauer K, Klein MP, Kanff DB, Kriancinas A, Yu C-A, Yu L, Malkin R (1991) *Biochemistry* **30**: 1892-1901
56. Cline JF, Hoffmann BM, Mims WB, La Haire E, Ballou DB (1985) *J Biol Chem* **260**: 3251-3254
57. Adam Z, Malkin R (1987) *FEBS Lett* **225**: 67-71
58. Trumpower BL, Edwards CA, Ohnishi T (1980) *J Biol Chem* **255**: 7487-7493
59. Schagger H, Borchart U, Machledt W, Link TA, Von Jagow G (1987) *FEBS Lett* **219**: 161-168
60. Malkin R, Aparicio PJ (1975) *Biochem Biophys Res Comm* **63**: 1157-1160
61. Prince RC, Lindsay JG, Dutton PL (1975) *FEBS Lett* **51**: 108-111
62. Mitchell P (1975) *FEBS Lett* **56**: 1-6
63. Mitchell P (1976) *J Theor Biol* **62**: 327-367
64. Wikstrom M, Krab K (1980) *Curr Top Bioenerg* **10**: 51-101
65. Wikstrom M, Saraste M (1984) W: Ernster L (red) Bioenergetics. Amsterdam: Elsevier, str 49-94
66. Prince RC, Matsuura K, Hurt E, Hauska G, Dutton PI (1982) *J Biol Chem* **257**: 3379-3381
67. Jones RW, Whitmarsh J (1985) *Photobiochem Photobiophys* **9**: 119-127
68. Joliot P, Joliot A (1986) *Biochem Biophys Acta* **849**: 211-222
69. Doyle MP, Li I-B, Yu L, Yu C-A (1989) *J Biol Chem* **264**: 1387-1392
70. Hope AB, Huilgot RR, Panizzia M, Thompson M, Matthews DB (1992) *Biochem Biophys Acta* **1100**: 15-26
71. Moss DA, Rich PR (1987) W: Biggins J (red) Progress in Photosynthesis Research. t 2. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, str 461-165
72. Rich PR (1986) *J Bioenerg Biomembr* **18**: 145-156
73. Jones RW, Whitmarsh J (1985) *Photobiochem Photobiophys* **9**: 119-127
74. Hope AB (1993) *Biochem Biophys Acta* **1143**: 1-22
75. Heinemeyer W, Alt J, Herrmann RG (1984) *Curr Genet* **8**: 543-549
76. Steppuhn J, Rother C, Hermans J (1987) *Mol Gen Genet* **210**: 171-177
77. Alt J, Westhoff P, Sears BB, Nelson N, Hurt E, Hauska G, Herrmann RG (1983) *EMBO J* **2**: 979-986
78. Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi K, Haiashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdon N, Shimada H, Sugiura M (1986) *EMBO J* **5**: 2043-2049
79. Rock CD, Barkan A, Taylor WC (1987) *Curr Genet* **12**: 69-77
80. Willey DL, Huttly AK, Philips AL, Gray JC (1983) *Mol Gen Genet* **189**: 85-89
81. Willey DL, Howe CJ, Auffret AD, Bowman CM, Dyer TA, Gray JC (1984) *Mol Gen Genet* **195**: 416-422
82. Kurowski B, Ludwig B (1987) *J Biol Chem* **263**: 13805-13811
83. Daldal F, Davidson E, Cheng S (1987) *J Biol Mol* **195**: 1-12
84. Milles D (1982) W: Edelman M, Hallich RB, Chua NH (red) Methods in Chloroplast Molecular Biology. Amsterdam: Elsevier Biochemical Press, str 75-107
85. Lam K, Malkin R (1985) *Biochem Biophys Acta* **810**: 106-109

## Sprawozdanie

z działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w roku 1993

### Działalność organizacyjna

#### 1. Skład osobowy Zarządu Głównego

Prezydium: prezes	—	prof. Liliana Konarska
wiceprezes	—	prof. Zofia Porembska
sekretarz	—	dr Ewa Turska
skarbnik	—	doc. Jolanta Barańska

Członkowie Z. G. prof. Edward Bańkowski Białystok  
 prof. Andrzej Guranowski Poznań  
 dr Maria Kołaczkowska Wrocław  
 prof. Michał Komoszyński Toruń  
 prof. Antoni Polanowski Wrocław  
 prof. Marta Stryjecka-Zimmer Lublin  
 prof. Roman Tarnawski Katowice  
 dr hab. Marianna Turkiewicz Łódź  
 prof. Tomasz Twardowski Poznań  
 dr Teresa Wesółowska Szczecin  
 doc. Maria Wojtaś-Wasilewska Lublin  
 prof. Krzysztof Zwierz Białystok

Zarząd Główny działa poprzez Oddziały Terenowe usytuowane:

w Gdańsku	Przewodniczący prof. W. Makarewicz
Toruniu	dr A. Leźnicki
Krakowie	prof. Z. Żak
Katowicach	dr hab. K. Olczyk
Lublinie	dr M. Sanecka-Obacz
Łodzi	prof. S. Bielecki
Olsztynie	prof. W. Damicz
Szczecinie	dr T. Wesółowska
Wrocław	doc. M. Malicka-Błaszkiwicz
Warszawie	prof. B. Grzelakowska-Sztabert
Białymstoku	prof. K. Zwierz
Poznaniu	prof. W. Walerych

Kierownik Biura Zarządu Głównego Weronika Kamińska.  
 Komisja Rewizyjna prof. Magdalena Fikus  
 prof. Anna Barańczyk-Kuźma  
 prof. Marian Wolny

Zarząd Główny przy współpracy z Zarządami Oddziałów prowadzi działalność statutową poprzez Sekcje, Komisje i Zespoły powołane do zadań szczegółowych. Jak co roku, zgodnie ze Statutem, odbyły się cztery plenarne posiedzenia Zarządu Głównego z udziałem przedstawicieli Oddziałów. Dyżury członków Prezydium odbywały się we wtorki w biurze Zarządu Głównego, w budynku Polskiego Towarzystwa Chemicznego przy ul. Freta 16, a od października w nowym lokalu Towarzystwa Biochemicznego na terenie Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego przy ul. Pasteura 3; tel. 658-20-99, FAX 22-53-42.

## WAŻNIEJSZE UCHWAŁY ORGANÓW STATUTOWYCH TOWARZYSTWA

1. Podwyższenie rocznej składki członkowskiej z 40.000 zł w roku 1992 i 1993 do 100.000 zł poczynając od r. 1994.
2. Powołanie Sekcji Biotechnologii  
 przewodniczący — prof. Stanisław Bielecki Łódź  
 członkowie — prof. Tomasz Twardowski Poznań  
 — prof. Antoni Polanowski Wrocław  
 — dr hab. Marianna Turkiewicz Łódź

## DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNO-NAUKOWA TOWARZYSTWA

### Doroczny Zjazd Ogólnopolski, Sesje i Konferencje

1. XXIX Zjazd Towarzystwa odbył się w dniach 15-17 września 1993 roku we Wrocławiu z udziałem ok. 600 uczestników z kraju i zaproszonych gości z zagranicy. Obrady odbyły się w ramach 9 Sympozjów p.t.
  - Biotechnologia — projektowanie i synteza związków biologicznie czynnych
  - Struktura i funkcja białek
  - Rola glikozylacji w procesach biologicznych
  - Lipidy i błony biologiczne
  - Postępy w biochemii klinicznej
  - Struktura i funkcja aparatu genetycznego

- Zastosowanie i wykorzystanie komputerów w biochemii
- Jony metali w biologii i medycynie
- Doniesienia różne

Przedstawiono 66 referatów sympozjalnych i 441 doniesień. Coroczne Zjazdy Towarzystwa cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem. Coraz liczniejszy jest udział osób niebędących członkami n/Towarzystwa. Te spotkania stwarzają okazję do szerokiej wymiany poglądów między przedstawicielami pokrewnych dyscyplin naukowych.

## 2. Szkoła Zimowa na temat „Przekazywanie sygnałów w komórce”.

W celu udostępnienia najnowszych osiągnięć nauki światowej w dziedzinie regulacji procesów komórkowych Zarząd Główny w dniach 2 i 3 grudnia 1993 zorganizował Szkołę Zimową dla asystentów i młodszych pracowników nauki na temat „Przekazywanie sygnałów w komórce”. Odbyły się następujące wykłady:

- Budowa i funkcja błon
- Molekularne mechanizmy transportu
- Receptory, klasyfikacja i funkcja
- Receptory czynników wzrostu, budowa i funkcja
- Budowa i funkcja białek G
- cAMP i cGMP — wtórne przekaźniki informacji
- Udział pochodnych inozytolu w przekazywaniu informacji
- Wapń — wtórny przekaźnik sygnałów
- Biosynteza i fizjologiczna funkcja tlenu azotu
- Sygnały indukujące programowaną śmierć komórki.

Zajęcia odbywały się w Międzynarodowym Centrum Biocybernetyki w Warszawie. Udział w zajęciach wzięło 140 osób. Słuchacze potwierdzili dobry merytoryczny poziom wykładów i wyrazili potrzebę podobnych konferencji kształceniowych w przyszłości.

Planujemy wydanie w 1994 roku materiałów konferencyjnych ze Szkoły Zimowej w postaci monografii.

## 3. Spotkanie wykładowców biochemii i biochemii klinicznej

Coroczne spotkanie kierowników Zakładów Biochemii Akademii Medycznych z terenu Polski odbyło się w dniu 22 maja 93 r. w Poznaniu, w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizjologicznej AM, kierowanej przez prof. Halinę Karoń.

Tematem Konferencji były programy nauczania biochemii i biologii molekularnej na Uczelniach Medycznych w Polsce i w Europie.

## 4. I Ogólnopolska Konferencja „Nauczanie Biochemii i Biotechnologii”.

Spotkanie zostało zorganizowane przez prof. Zofię Walter w Łodzi na terenie Domu Pracy Twórczej U. Ł. w dniach 7-8 czerwca 1993 r. Obrady odbywały się w dwóch zespołach biochemii i biotechnologii. W zespole biotechnologicznym tematem dyskusji był rozwój biotechnologii w Polsce i możliwość technicznej realizacji osiągnięć biochemików i biologów polskich. Nauczanie biochemii w szkołach wyższych i formy wymiany doświadczeń w tym zakresie, a także ranga osiągnięć dydaktycznych przy ocenie i awansach pracowników naukowo-dydaktycznych było tematem dyskusji w zespole biochemicznym. W konferencji udział wzięli także nauczyciele szkół licealnych i średnich szkół zawodowych.

## 5. Kurs p.t. „Glycobiology Workshop — Glycoprotein Analysis, Advanced Approaches, Techniques and Automated Methods”

Kurs zorganizowany był w Białymstoku w okresie 22-28 sierpnia 1993 r. wspólnie przez Zakład Biochemii Farmaceutycznej AM w Białymstoku, Instytut Glikobiologii Uniwersytetu w Oxfordzie, Oxford Glycosystems i Oddział Białostocki PTBioch. Zarząd Główny PTBioch. uzyskał dofinansowanie z KBN, które w części pokryło koszty tego bardzo udanego pod względem naukowym i organizacyjnym kursu. Przewodniczącym Komitetu Organizacyjnego był prof. dr hab. Krzysztof Zwierz z AM w Białymstoku. Zajęcia były prowadzone w języku angielskim. Niewątpliwą korzyścią kursu była możliwość zaprojektowania wspólnych polsko-brytyjskich badań naukowych, a także umożliwienie uczestnikom z Estonii i Białorusi, Ukrainy i Polski zapoznania się z najnowszymi osiągnięciami glikobiologii.

## DZIAŁALNOŚĆ WYDAWNICZA

### 1. Postępy Biochemii

Wydano 4 numery Postępów Biochemii. Kwartalnik jest dotowany przez KBN. Pismo rozwija się pomyślnie, w obecnej formie dostarcza najnowszych informacji z dziedziny biochemii, biologii molekularnej i genetyki. Jest cenną pomocą do nauki dla studentów Wydziałów Biologicznych i Akademii Medycznych. Jest uzupełnieniem podręczników akademickich.

## 2. Acta Biochimica Polonica

Acta Biochimica Polonica jest kwartalnikiem publikującym oryginalne prace doświadczalne w języku angielskim. Od listopada 1992 r. Acta Biochimica Polonica jest wydawana przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne wspólnie z Komitetem Biochemii i Biofizyki PAN. W 1993 r. wydano 4 numery kwartalnika w zmienionym formacie i unowocześnionej szacie graficznej. Kwartalnik jest wydawany z pomocą finansową KBN.

## 3. Listy do Członków

Biuletyn jest redagowany przez dr Teresę Wesołowską i wydawany w Szczecinie. Informuje o działalności naszego Towarzystwa i innych Towarzystw. Wychodzi systematycznie, a życzliwy stosunek Redaktora do Czytelników sprzyja integracji członków naszego Towarzystwa.

## 4. Monografie biochemiczne

Z inicjatywy Sekcji Dydaktycznej Towarzystwa kontynuowano wydawanie monografii. W 1993 r. ukazało się drugie wydanie monografii p.t. „Rozpad fosfolipidów a przekazywanie informacji w komórce” (uzupełnione i rozszerzone); autor: J. Barańska, oraz ukazała się kolejna pozycja „Budowa i funkcja błon”; autorki: W. Leśniak i Z. Poremska.

## 5. Nagrody

Nagrody: im. prof. Jakuba Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną z zakresu biochemii wykonaną w pracowni na terenie Polski oraz im. prof. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy artykuł przeglądowy opublikowany w „*Postęпах Biochemii*” są przyznawane regularnie. Nagrodę im. prof. Włodzimierza Mozołowskiego otrzymuje corocznie młody biochemik na Zjeździe Towarzystwa za najciekawszą i najlepiej prezentowaną pracę.

W roku obecnym Nagroda im. J. Parnasa została przyznana zespołowi: G. Węgrzyn, Ał Pawłowicz i K. Taylor za dwie ściśle związane ze sobą prace opublikowane w *Journall of Molecular Biology* (226: 675-680 i 226: 681-688) (1992).

Nagrodę im. B. Skarżyńskiego za najlepszy artykuł przeglądowy otrzymali Mirosława i Jan Barciszewscy z Inst. Chemii Bioorganicznej w Poznaniu (*Postępy Biochemii*, 38 t. 171-178) (1992).

W Konkursie im. Mozołowskiego na najlepsze prace biochemików (do 30 lat) przedstawione na XXIX Zjeździe PTBioch. Komisja nagrodziła Katarzynę Lisowską, oraz wyróżniła Małgorzatę Czarny, Annę Filipek i Bernarda Korzeniowskiego.

## KONKURS NA NAJLEPIEJ PRZYGOTOWANY I WYGŁOSZONY WYKŁAD.

Organizacja Konkursów ma na celu popularyzację osiągnięć nauk biologicznych. W roku bieżącym w finale Konkursu wygłoszono 4-y wykłady:

- Doc. dr hab. Katarzyna Anna Nałęcz: „Mechanizmy transportu związków niskocząsteczkowych przez błony biologiczne”
- Dr Maciej Szymański: „Mechanizm inicjacji odwrotnej transkrypcji wirusa HIV — 1”
- Dr Małgorzata Giel: „Strukturalne aspekty oddziaływania białek z DNA”
- Dr Ludwika Pawłowski-Ćwięk: „Mechanizmy detoksykacji dwutlenku siarki i skutki niewydolności jego unieszkodliwienia”.

Komisja Konkursowa przyznała jedną pierwszą, dwie drugie i jedną trzecią nagrodę.

## STAŻE NAUKOWE

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego gorąco popiera krajowe i zagraniczne staże naukowe. Współpraca z FEBS rozwija się zadawalająco. W roku 1993 15 osób przebywało bądź na szkoleniowych konferencjach organizowanych przez FEBS, bądź na krótko — czy długoterminowych stażach naukowych finansowanych przez FEBS.

## Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przyznane w 1993 roku

**Nagroda im. Jakuba Karola Parnasa** za najlepszą pracę doświadczalną, wykonaną całkowicie w polskich laboratoriach i opublikowaną w roku 1992, została przyznana za dwie ściśle wiążące się ze sobą prace autorów z Zakładu Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego.

1. G. Węgrzyn, A. Pawłowicz i K. Taylor (1992) „Stability of coliphage lambda DNA replication initiator, the lambda o protein”. *Journal of Molecular Biology* 226: 675-680
2. G. Węgrzyn i K. Taylor (1992) „Inheritance of the replication complex by one of two daughter copies during lambda plasmid replication in *Escherichia Coli*”. *Journal of Molecular Biology* 226: 681-688

**Nagroda im. Bolesława Skarżyńskiego** za najlepszy artykuł opublikowany w kwartalniku *Postępy Biochemii* została przyznana zespołowi z Instytutu Chemii Bioorganicznej, PAN w Poznaniu.

1. M. Z. Barciszewska i J. Barciszewski (1992) „Zależność funkcji kwasów nukleinowych od struktury”. *Postępy Biochemii* 38 (4) 1992, 171-178

**Nagroda im. Włodzimierza Mozołowskiego** dla młodych biochemików za najlepszą pracę przedstawioną na XXIX Zjeździe Towarzystwa we Wrocławiu została przyznana:

Katarzynie Lisowskiej z Zakładu Biologii Nowotworów Instytutu Onkologii w Gliwicach, za pracę pt. „Klonowanie, ustalenie sekwencji nukleotydowej oraz analiza wzoru ekspresji genu HSP70 szczura”

Dodatkowo przyznano wyróżnienia:

1. Małgorzacie Czarny z Zakładu Biologii Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie za pracę pt. „Wpływ jonoforu A23187, tapsigarginy, kofeiny i heparyny na zależną od ATP i  $Mg^{2+}$  syntezę fosfatydyloseryny w mikrosomach wątroby szczura”.
2. Annie Filipek z Zakładu Biochemii Mięśni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie za pracę pt. „Monomeryczne i dimeryczne formy kalcykliny — białka wiążącego wapń z rodziny S-100”.
3. Bernardowi Korzeniewskiemu z Instytutu Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie za pracę pt. „Czy model matematyczny może przewidzieć wynik eksperymentu biochemicznego?”.

### Errata do artykułu z numeru 3/1993

„Sekwencjonowanie genomu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Cele, strategie, rezultaty” (autorzy: Ewa Grzybowska, Andrzej Migdalski, Marek Zagulski) z następującymi poprawkami:

- str. 159, wiersz 11 od góry: „Bal 31” zamiast „Bal I”
- str. 160, komentarz do ryc. 5, wiersz 12 od góry „streptomycynę” zamiast „tetracyklinę”.

# 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 wprowadzenie 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 (litery + 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.

**PIŚMIENICTWO:** 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 wydawca. 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, rycin, 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 wewnętrzzną 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 przesłać na adres:

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





**3rd International Union of Biochemistry  
and Molecular Biology Conference  
“MOLECULAR RECOGNITION”  
23 to 27 April 1995, Singapore**

---

**SCIENTIFIC PROGRAMME**

**PLENARY LECTURES INCLUDE :**

- \* Dr. A R Fersht : Protein Folding
- \* Dr. D Metcalf : The Molecular Regulation of Blood Cell Formation
- \* Dr. S Nakanishi : Molecular Biology of Glutamate Receptors and their Roles in Brain Functions

**SYMPOSIA**

**SIGNALS AND RECEPTORS**

- \* Ion channels
- \* Inhibins and activins
- \* Kinases
- \* Phosphatases
- \* G proteins and accessory factors
- \* Growth factors and cytokines
- \* Gaseous mediators

**NEUROBIOLOGY**

- \* Neurodevelopment
- \* Neurotrophic factors and receptors
- \* Gene regulation in the nervous system
- \* Neuronal signalling
- \* Neurochemistry of sensor systems
- \* Molecular neuropathology
- \* Neuroglia

**MOLECULAR RECOGNITION IN  
CATALYSIS AND DRUG ACTION**

- \* Catalytic centres
- \* Protein engineering and unconventional enzymes
- \* Drug receptors and drug metabolizing enzymes
- \* Toxins
- \* Computer modelling of binding sites and drugs
- \* Biosynthesis and recognition of glycoconjugates
- \* Enzyme biotechnology

**MOLECULAR IMMUNOBIOLOGY**

- \* Major histocompatibility molecules and antigen presentation
- \* Vaccine design and development
- \* T-cell and B-cell development and function
- \* AIDS
- \* Gene rearrangements in the immune system
- \* Apoptosis
- \* Immune modulation in medical therapeutics

**Colloquia and Poster Sessions**

Welcome reception with cultural show

Mid-week Chinese banquet

Sight-seeing tours in Singapore and neighbouring countries

Trade exhibition

**For details contact :**

Dr. Hoon-Eng Khoo  
Hon. Secretary, 3rd IUBMB Conference  
Department of Biochemistry  
National University of Singapore  
Kent Ridge  
Singapore 0511.  
Phone : 65-7723250  
Fax : 65-7791453  
Email : bchkhe@leonis.nus.sg