

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN  
0032-5422

## Advances in Biochemistry

TOM 40, NR 3, 1994

Szlak sfingomielinowy . . . . .	130
Geny receptorów glutaminianu . . .	135
Białka kodowane przez HBV . . . .	143
Apoptoza . . . . .	150
Telomery a starzenie się komórek	161
Oddziaływanie asODN z mRNA . .	166
Apirazy . . . . .	174
Ekdysteroidy owadzie . . . . .	181

**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.

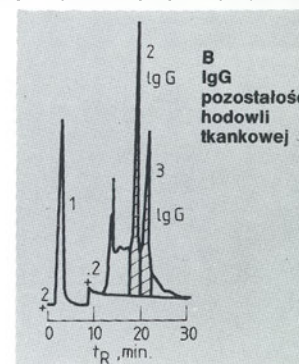
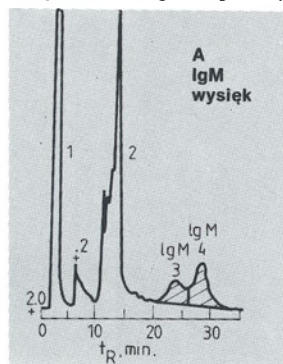
ULTRAPURE BIOREAGENTS posiadają dokładnie oznaczone wszystkie cechy ich aktywności biologicznej. Jednoznacznym dowodem ich jakości jest świadectwo analizy widniejące na etykiecie każdego opakowania.

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

**BAKERBOND ABx  
oczyszcza wszystkie przeciwciała  
z każdej matrycy**



Oczyszczanie IgG i IgM z podwójnie produkującym hybridoma



**Warunki analizy**

Kolumna: BAKERBOND ABx  
4,6 × 250 mm, 5 μm  
Faza ruchoma: A = 10 mM MES, pH 6,0  
B = 250 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,8  
Gradient: 0% B 10 min.  
Przepływ fazy: 1 ml/min.  
Ciśnienie: 68 bar  
UV przy 280 nm; AUFS patrz +  
Detekcja: 1. albuminy, transferyna  
Piki: 2. IgG  
3. IgM  
Próba: Płyn z hodowli tkankowej 0,5 ml  
Czystość IgM: 2. > 95%  
3. > 95%

**Warunki analizy**

Kolumna: BAKERBOND ABx  
4,6 × 250 mm, 5 μm  
Faza ruchoma: A = 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,0  
B = 500 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,8  
Gradient: 0% B do 50% B w 1 h  
Przepływ fazy: 1 ml/min.  
Ciśnienie: 68 bar  
UV przy 280 nm; AUFS patrz +  
Detekcja: 1. albuminy, transferyna  
Piki: 2. białka słabo związane  
3. IgM-4. IgM  
Próba: Płyn wysiękowy myszy 0,5 ml  
Czystość IgM: 3. > 95%  
4. > 95%

+ Piki 1 zawiera 90-95% niezatrzymanych na kolumnie białek należących do klasy IgG. Czułość detektora dla wszystkich pozostałych pików została zwiększona 10 razy w celu uwidocznienia białek zatrzymanych na kolumnie oraz przeciwciał monoklonalnych.

Faza BAKERBOND ABx zawiera mieszane jonowymienne grupy funkcyjne wbudowane do żelu krzemionkowego (5 μm, 15 μm, 40 μm), dzięki czemu ma ona szczególną właściwość wiązania różnych klas, podklas, fragmentów i koniugatów wszystkich Ig zawartych w płynach biologicznych. Równocześnie transferyna, albuminy i inne białka nie są wiązane podobnie jak czerwień fenolowa. Odczyszczenia są określone wagowo oraz na podstawie aktywności biologicznej białek wynoszą powyżej 95%. ABx ma pojemność 150 mg/g. Trwałość kolumn przekracza 1000 godzin użytkowania.

Można otrzymać bezpłatną broszurę: EUROCOLOR Chemikalia Laboratoryjne skr. poczt. 46, 90-980 Łódź-7, tel. (042) 813140, 844614, fax (042) 844609

## WYDAWCA

Editor  
POLSKIE TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
Polish Biochemical Society  
ul. Pasteura 3  
02-093 Warszawa  
Poland  
(2) 658-20-99  
fax: (22) 22-45-52

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  
JOLANTA BARAŃSKA  
(Warszawa)  
BRONISŁAW CYMBOROWSKI  
(Warszawa)  
BARBARA CZARTORYSKA  
(Warszawa)  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
(Warszawa)  
JERZY KAWIAK  
(Warszawa)  
TERESA ŁOCH  
(Warszawa)  
KATARZYNA NAŁĘCZ  
(Warszawa)  
ADAM NOWOSŁAWSKI  
(Warszawa)  
GRAŻYNA PALAMARCZYK  
(Warszawa)  
EWA SIKORA  
(Warszawa)  
TOMASZ TWARDOWSKI  
(Poznań)  
ZOFIA ZIELIŃSKA  
(Warszawa)

## ADRES REDAKCJI

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

*J. Barańska*

## SPIS TREŚCI CONTENTS

- Sfingomielinowy szlak transmisji sygnałów**  
Sphingomyelin pathway in signal transduction  
JANINA KWIATKOWSKA . . . . . 130
- Geny kodujące receptory jonotropowe glutaminianu**  
Glutamate receptor channel-encoding genes  
DOROTA NOWICKA . . . . . 135
- Białka powierzchniowe i rdzeniowe HBV i ich rola w rozwoju zapalenia wątroby typu B**  
Envelope and core proteins of HBV and their influence on the development of hepatitis B  
MAŁGORZATA SIDORKIEWICZ, ANDRZEJ PŁUCIENNICZAK 143
- Mechanizmy śmierci programowanej komórek (apoptozy)**  
Mechanisms of the programmed cell death (apoptosis)  
EWA SIKORA . . . . . 150
- Telomerowa hipoteza starzenia się komórek**  
The telomere hypothesis of cell aging  
EWA JARUGA . . . . . 161
- Mechanizmy działania antysensownych oligodeoksyrybonukleotydów**  
Antisense oligodeoxyribonucleotides — mechanisms of action  
ARKADIUSZ SZKLARCZYK . . . . . 166
- Apirazy — enzymy kontrolujące stężenie wolnych nukleotydów w komórkach i tkankach**  
Apyrases — enzymes involved in the control of nucleotide levels in cells and tissues  
MICHAŁ KOMOSZYŃSKI . . . . . 174
- Ekdysteroidy owadzie — biosynteza, metabolizm i funkcja**  
Ecdysteroids in insect: biosynthesis, metabolism and function  
KRYSTYNA GRZELAK . . . . . 181

# Sfingomielinowy szlak transmisji sygnałów

## Sphingomyelin pathway in signal transduction

JANINA KWIATKOWSKA\*

### Spis treści:

- I. Przemiana sfingomielin
- II. Ceramid jako przekaźnik wtórny
- III. Rola sfingozyny w regulacji procesów biologicznych
- IV. Pochodne sfingozyny a gospodarka wapniowa

**Wykaz stosowanych skrótów:** CaCM — kompleks wapń/kalmodulina; DAG — diacyloglicerol; EGF — nabłonkowy czynnik wzrostu; ER — retikulum endoplazmatyczne; InsP<sub>3</sub> — inozytolotrisfosforan; MAP — białko aktywowane przez mitogen (*mitogen activated protein*); MAPK — kinaza MAP; MAP-2 — białko związane z mikrotubulami-2, (*microtubules-associated protein-2*), NF $\kappa$  $\beta$  — czynnik transkrypcyjny, aktywowany przez TNF $\alpha$ ; I $\kappa$ B — inhibitor czynnika I $\kappa$ B; PKC — kinaza białkowa C; TNF — czynnik nekrozy nowotworu (*tumor necrosis factor*).

Fosfolipidy błon komórkowych są prekursorami ważnych substancji regulatorowych. W generowaniu tych substancji biorą udział fosfolipazy, aktywowane przez hormony, neurotransmitery, cytokiny itp. Fosfolipaza A<sub>2</sub> uwalnia z fosfatydylocholin kwas arachidonowy i inne prekursory prostaglandyn i leukotrienów, a fosfatydylocholinowa fosfolipaza C-diacyloglicerol (DAG). DAG powstaje też z inozytofosfatydów pod wpływem fosfolipazy C. DAG aktywuje kinazę białkową C (PKC). Jednocześnie generowany jest też drugi przekaźnik wtórny, inozytolotrisfosforan (InsP<sub>3</sub>), który uczestniczy w mobilizacji wapnia i uwalnianiu go z retikulum endoplazmatycznego (ER).

Okazało się, że także sfingomielin są prekursorami przekaźników wtórnych: ceramidu, zasad sfingoinowych i ich pochodnych. Każdy z tych przekaźników ma wyodrębnione pole działania i swoiście reguluje określone procesy biologiczne. Przekaźniki te modulują aktywność kinaz białkowych, różnicowanie i wzrost komórek, agregację płytek krwi, funkcje obronne leukocytów, ekspresję genów, gospodarkę wapniową. Wykazano, że enzymy hydrolizujące sfingomielin są

### Contents:

- I. Sphingomyelin metabolism
- II. Ceramide as a second messenger
- III. Role of sphingosine in regulation of biological processes
- IV. Sphingosine derivatives in calcium metabolism

pod kontrolą efektorów biologicznych, takich jak kalcytrol, interferon $\gamma$ , TNF, DAG.

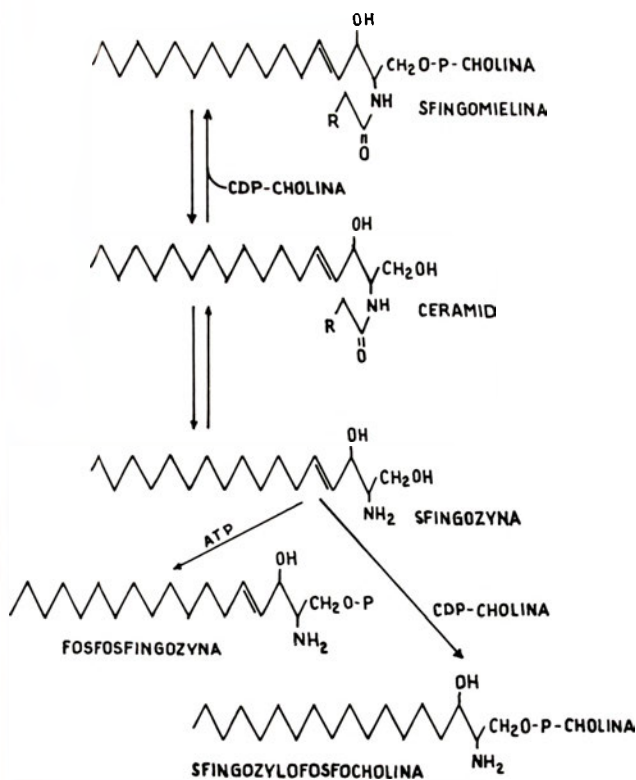
Wszystkie powyższe dane stały się podstawą do sformułowania poglądu o funkcjonowaniu nieznanej dotąd drogi przekazu sygnałów w komórce, nazwanej szlakiem sfingomielinowym (*sphingomyelin pathway*) [1-4].

### I. Przemiana sfingomielin w komórce

Sfingomielin są zlokalizowane głównie w zewnętrznej warstwie błon cytoplazmatycznych. W tej samej warstwie znajduje się też fosfodiesteraza sfingomielinowa (EC 3.1.4.12), zwana sfingomielinidazą obojętną ze względu na optimum pH jej działania. Produktami hydrolizy sfingomielin są fosfocholina i ceramid (acylosfingozyna). Ceramid może być wykorzystany do resyntezy sfingomielin. Reakcja przeniesienia reszty fosfocholiny z CDP-choliny na ceramid, katalizowana przez cholinofosfotransferazę ceramidową (EC 2.7.8.3), jest głównym szlakiem syntezy sfingomielin w komórkach. Ceramid może też ulegać deacylacji pod wpływem ceramidazy (deacylazy acylosfingozynowej, EC 3.5.1.23). Powstają wtedy wolne kwasy tłuszczowe oraz zasady sfingoinowe. Zarówno ceramid, jak i wolne zasady sfingoinowe mogą swobodnie wędrować przez błony i dalsza ich przemiana nie jest już ściśle związana z wewnątrzkomórkową, czy wewnątrz błonową lokalizacją odpowiednich enzymów. Acylotransferaza sfingozynowa (EC 2.3.1.24) może przekształcać sfingozynę i inne zasady w ceramid, kinaza — w fosfosfingozynę, a fosfocholinotransferaza sfingozynowa (EC 2.7.8.10) — w sfingozylfosfocholinę. Schemat przemiany sfingomielin pokazano na rycinie 1.

Rozkład sfingomielin zachodzi nie tylko w błonach. W endosomach i lizosomach znajduje się „kwaśna”

\* Prof. dr hab., Zakład Biochemii Akademii Medycznej, ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław



Ryc. 1. Główny szlak przemiany sfingomielin.

sfingomielinidaza, aktywowana przez DAG. Wydaje się, że obydwa enzymy, hydrolizujące sfingomieliny mogą generować ceramid jako przekaznik wtórny i że obydwa uczestniczą w szlaku transmisji sygnałów.

## II. Ceramid jako przekaznik wtórny

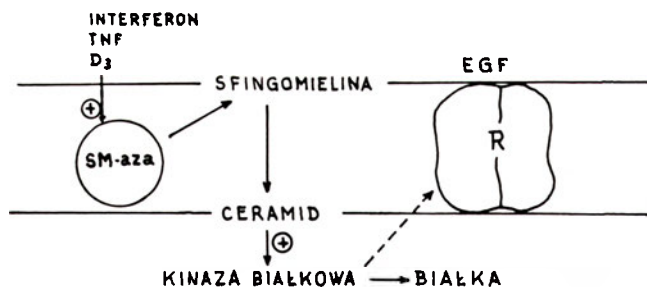
Początkowo wszystkie efekty biologiczne, towarzyszące rozkładowi sfingomielin przypisywano sfingozyne, jej to bowiem używano w badaniach *in vitro*. Sfingozyne jest istotnie inhibitorem kinazy białkowej C i jest przekaznikiem w procesach, regulowanych przez ten enzym. Natomiast w regulacji innych zjawisk bierze udział produkt acylacji sfingozyne, ceramid.

Badając mechanizmy różnicowania komórek pre-mielocytarnych HL-60 stwierdzono, że sfingozyne wprowadzona do komórek hamuje ich różnicowanie do makrofagów, natomiast stymuluje przekształcanie do monocytów. O ile pierwszy efekt jest związany z hamowaniem kinazy C przez sfingozyne, o tyle różnicowanie monocytarne przebiega drogą niezależną od PKC. Różnicowanie monocytarne jest stymulowane przez pochodne witaminy D, głównie kalcytriol, oraz przez interferon<sub>γ</sub> i TNF [3, 7, 8]. TNF<sub>α</sub> (kachetyna) i TNF<sub>β</sub> (limfotoksyna) są cytokinami o szerokim spektrum działania. Mogą grać rolę czynników wzrostu i różnicowania, regulatorów aktywności leukocytów i limfocytów B, cytotoksyn itp. Obecnie uważa się, że w ich działaniu pośredniczy ceramid. Traktowanie komórek pre-mielocytarnych kalcyferolem prowadzi do aktywacji obojętnej sfingomielinidazy i generacji ceramidu. W tych doświadczeniach nie wykazano

obecności wolnych zasad sfingoinowych. W odróżnieniu od ceramidu, wolna sfingozyne nie zwiększała efektywności subprogowych dawek kalcytriolu [9]. Czas działania kalcyferoli jest długi. Przy dawce 100 nM kalcytriolu szczyt działania obserwuje się po dwu godzinach. Nie wyjaśniono, w jaki sposób przebiega sygnał między kalcytriolem a sfingomielinidazą. Nie jest wykluczone, że zachodzi indukcja syntezy enzymu, na co wskazywałyby długi okres latencyjny. Natomiast interferon i TNF pobudzają wczesną, odwracalną hydrolizę sfingomielin [10]. Różnicowanie monocytarne komórek HL-60 zachodzi też po wprowadzeniu syntetycznego ceramidu w stężeniach 1-6 μM. Stosowano ceramidy o krótkich resztach acylowych, co umożliwia wnikanie do komórek. Optymalne stężenie ceramidu wynosi 20-1000 nM [9, 10].

Nasuwało się przypuszczenie, że ceramid działa podobnie jak inne przekazniki wtórne, aktywując jakąś kinazę białkową. Istotnie, już pierwsze doświadczenia ze sfingozyne, wprowadzoną do komórek raka nabłonka A431, wykazały związek między jej działaniem a fosforylacją receptora EGF. Wiadomo, że reszta Thr 654 receptora ulega fosforylacji pod wpływem kinazy C. Zgodnie z oczekiwaniami, sfingozyne hamowała fosforylację tej reszty, ale jednocześnie stymulowała fosforylację innej reszty — Thr 669. Podobne zjawisko obserwowano w hodowli fibroblastów [11]. Dalsze badania doprowadziły do wniosku, że fosforylacja Thr 669 jest pobudzana przez ceramid, a sfingozyne była substratem do jego syntezy. Syntetyczne ceramidy szybko i wydajnie stymulowały tę fosforylację, przy czym nie stwierdzono ich rozpadu do wolnych zasad sfingoinowych. Przy wprowadzaniu sfingozyne działanie następowało znacznie później niż po ceramidzie, przy czym towarzyszył mu znaczny wzrost zawartości ceramidu [12]. Sprawę ostatecznie rozstrzygnęło wydzielenie z błon kinazy białkowej, aktywowanej przez ceramid i Mg<sup>2+</sup>. Katalizuje ona fosforylację receptora EGF na Thr 669, a także fosforylację syntetycznych peptydów, w których sekwencja wokół reszty treoniny była identyczna, jak w receptorze EGF. Aktywność tej kinazy wzrastała dwukrotnie po potraktowaniu błon komórek HL-60 przez TNF<sub>α</sub>. Towarzyszył temu spadek zawartości sfingomielin i dwukrotny wzrost stężenia ceramidu w błonie. Nie obserwowano rozpadu innych lipidów.

Zarówno sfingomieliny, jak i obojętne sfingomielinidaza i receptor EGF mieszczą się w zewnętrznych warstwach błony. Są też dane wskazujące, że kinaza aktywowana przez ceramid jest integralnym białkiem błonowym. Następujący przebieg szlaku sfingomielinowego jest więc topologicznie możliwy: TNF<sub>α</sub> → receptor → obojętne sfingomielinidaza → ceramid → kinaza białkowa → fosforylacja substratów, m.in. receptora EGF. Rekonstrukcja tego szlaku w układzie bezkomórkowym potwierdza wiarygodność schematu przedstawionego na rycinie 2.

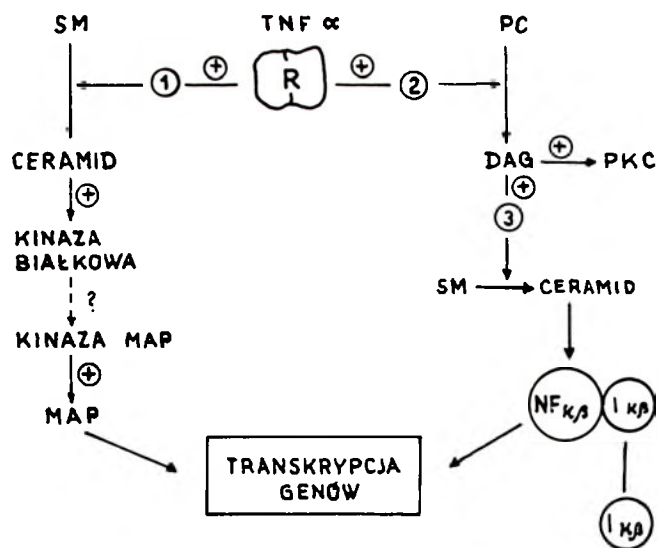


Ryc. 2. Schemat szlaku sfingomielinowego. SMaza — obojętna sfingomielinidaza; R — receptor EGF.

Autorzy sądzą, że fosforylacja receptora EGF tą drogą jest stymulowana jedynie przez  $TNF_{\alpha}$ , a nie przez inne stymulatory różnicowania [2].

Inni autorzy sugerują, że istnieje też zależność między szlakiem sfingomielinowym a aktywacją kinazy MAP, indukowaną przez TNF. Bakteryjna sfingomielinidaza oraz syntetyczny ceramid, wprowadzone do komórek, aktywowały kinazę MAP [MAPK] w sposób porównywalny z TNF. Nie wyjaśniono przebiegu tego szlaku, można jednak sądzić, że kinazy aktywowane przez ceramid znajdują się też w cytosolu. Ich substratem może być MAPK lub MAP [1].

Wydaje się, że funkcjonuje także inny mechanizm działania TNF przez szlak sfingomielinowy.  $TNF_{\alpha}$  stymuluje aktywację czynników transkrypcyjnych AP-1 i  $NF\kappa\beta$ . Przebieg aktywacji czynnika AP-1 jest znany. Po związaniu  $TNF_{\alpha}$  przez receptor TR 55 następuje aktywacja fosfolipazy C, swoistej wobec fosfatydylocholino. Diacyloglicerol, uwolniony przez ten enzym, aktywuje kinazę C, która stymuluje czynnik AP-1. PKC nie uczestniczy jednak w aktywacji czynnika  $NF\kappa\beta$ , aczkolwiek jest tu też potrzebna obecność DAG. Jak się okazało, DAG jest aktywatorem we-



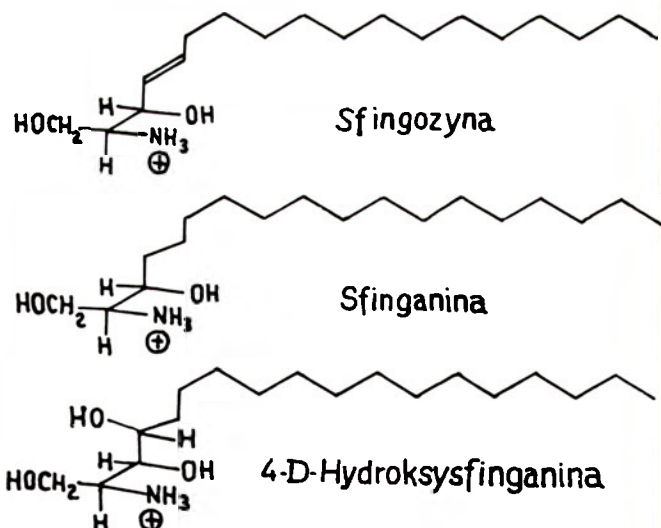
Ryc. 3. Drogi szlaku sfingomielinowego, pobudzone przez  $TNF_{\alpha}$ . SM — sfingomielina; PC — fosfatydylocholina; R — receptor  $TNF_{\alpha}$ ; DAG — diacyloglicerol; PKC — kinaza białkowa C;  $NF\kappa\beta$  — czynnik transkrypcyjny;  $I\kappa\beta$  — inhibitor czynnika  $NF\kappa\beta$ ; MAP — czynnik aktywowany przez mitogeny; 1 — obojętna sfingomielinidaza; 2 — fosfatydylocholinowa fosfolipaza C; 3 — kwaśna sfingomielinidaza (w/g 1, 2, 13).

wnątrzkomórkowej, „kwaśnej” sfingomielinidazy, zaś ceramid, przez nią uwalniany jest właściwym stymulatorem czynnika  $NF\kappa\beta$ . Aktywacja polega na dysocjacji czynnika z połączenia z jego naturalnym inhibitorem, białkiem  $I\kappa\beta$  [13]. Sfungomielinidaza, aktywowana przez DAG, jest glikoproteiną o masie 75 kDa i optimum pH równym 4,5. Jest ona zlokalizowana w endosomach i lizosomach [14]. Można przypuszczać, że po związaniu  $TNF_{\alpha}$  z receptorem NF 55 zachodzi internalizacja receptora wraz z odcinkiem błony, zawierającym sfingomielinę i DAG — substrat i aktywator kwaśnej sfingomielinidazy. Wielu autorów uważa, że zaburzenia metaboliczne, towarzyszące niedoborowi tej sfingomielinidazy są, przynajmniej częściowo, następstwem niewydolności szlaku sfingomielinowego [4, 6].

Ceramid może więc powstawać w komórce dwiema drogami. W błonie cytoplazmatycznej generuje go obojętna, a wewnątrz komórki — kwaśna sfingomielinidaza. Jak się wydaje, obydwie te drogi są pobudzane przez  $TNF_{\alpha}$ , co przedstawiono na rycinie 3.

### III. Rola sfingozyny w regulacji procesów biologicznych

Ceramidy, generowane ze sfingomielin, mogą ulegać deacylacji z utworzeniem wolnych zasad sfingoinowych. Do naturalnie występujących zasad należą: sfinganina, 4-*trans*-sfingenina, zwana potocznie sfingozyną oraz 4-D-hydroksysfinganina (patrz Ryc. 4).



Ryc. 4. Naturalnie występujące zasady sfingoinowe.

Wszystkie te związki okazały się silnymi inhibitorami kinazy białkowej C. Hamowanie PKC przez te zasady jest kompetycyjne względem naturalnych aktywatorów enzymu, DAG,  $Ca^{2+}$  oraz estrów forbolowych, nie jest zaś konkurencyjne względem substratu [4,15]. Sfungozyna hamuje też aktywację PKC przez lipidy [16]. Porównując zasady o różnej długości łańcucha alkilowego stwierdzono, że najsilniej-

szymi inhibitorami PKC są zasady o 18 atomach C, a więc te występujące w sfingomielinach [6]. Mechanizm inhibicji nie jest dokładnie poznany. Sądzi się, że sfingozyna wiąże się z domenami regulatorowymi enzymu, a także hamuje jego translokację do błony.

Zasady sfingoine hamują szereg funkcji fizjologicznych, których mediatorem jest PKC, m.in. różnicowanie preielocytów do fenotypu makrofagowego [7]. Sfingozyna hamuje sekrecję płytek krwi i drugą fazę ich agregacji, stymulowaną przez kolagen, ADP, arachidonian, trombinę i czynnik aktywujący płytki. Nie wpływa przy tym na aktywność fosfolipazy C i generację DAG. Hamuje fosforylację białka 40 kDA płytek, pobudzaną przez DAG i forbole [17]. W obecności zasad sfingoineowych w płytkach nie dochodzi do wzrostu pH, związanego z fosforylacją nośnika  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  przez PKC [18]. Innym efektem działania sfingozyny jest hamowanie wybuchu tlenowego leukocytów, wywołanego przez estry forbolowe i DAG. Zasady sfingoine hamują w pełni sekrecję laktoferyn z ziarnistości leukocytów obojętnochłonnych, lizozymu zaś — w 50%. Sfingozyna obniża cytotoksyczne właściwości limfocytów i ich zdolność niszczenia komórek nowotworowych, zarówno konstytutywną, jak i indukowaną przez interleukinę 2 [19].

Hamujące działanie sfingozyny na PKC oraz wszystkie związane z tym efekty biologiczne są uzależnione od obecności wolnej grupy  $\text{NH}_2$ . Jej acylacja znosi działanie, dlatego ceramidy nie mają aktywności zasad sfingoineowych. Nie wszystkie jednak skutki działania sfingozyny są związane z hamowaniem PKC. Do takich zaliczyć należy wpływ na wiązanie tyreoliberyny (TRH) z błoną komórek przysadki. Proces ten nie jest wrażliwy na estry forbolowe, ani na inhibitory PKC. Sfingozyna hamuje wiązanie  $^3\text{H}$ -metylohistydynoTRH przez nienaruszone komórki GH3 oraz izolowane z nich błony. Sfingozyna w stężeniach 60-100  $\mu\text{M}$  wywołuje obniżenie powinowactwa receptora do TRH czemu towarzyszy wzrost  $K_d$  z 1.1 do 6.6 nM. Zachodzi także obniżenie sprawności wiązania (do 40% wartości kontrolnych), co wiąże się ze zmniejszeniem liczby receptorów na powierzchni błony. Także to działanie zasad sfingoineowych wiąże się z obecnością wolnej grupy aminowej [20, 21]. Stwierdzono, że w obecności sfingozyny rośnie liczba receptorów EGF i zwiększa się powinowactwo do liganda w komórkach jajnika chomika chińskiego i ludzkich karcinoma A431 [22]. Nie wyjaśniono, czy działanie to jest związane z fosforylacją receptora, stymulowaną przez ceramid.

#### IV. Pochodne sfingozyny a gospodarka wapniowa

Pod wpływem lipazy C powstaje DAG oraz  $\text{InsP}_3$ . Ten ostatni stymuluje pośrednio (dzięki mobilizacji jonów wapnia) kinazy zależne od  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny (Ca/CM). Odkrycie hamującego działania sfingozyny

na PKC skłoniło badaczy do sprawdzenia, czy zasady sfingoineowe wpływają też na drogę stymulowaną przez  $\text{InsP}_3$ . Okazało się, że hamują one enzymy aktywowane przez Ca/CM. W obecności sfingozyny obserwowano znamienne obniżenie aktywności kinazy lekkiego łańcucha miozyny mięśni gładkich, wielofunkcyjnej kinazy białkowej oraz fosfodiesterazy, zależnych od kompleksu Ca/CM. Hamowanie to jest konkurencyjne względem kalmoduliny. Podobnie jak w przypadku PKC, zachodzi kompetycja między sfingozyną a aktywatorem enzymów. Sfingozyna działa na oczyszczone preparaty badanych enzymów, a także w nienaruszonych komórkach. W komórkach GH3 sfingozyna hamuje fosforylację białka MAP2, katalizowaną przez wielofunkcyjną kinazę Ca/CM oraz fosforylację czynnika elongacji EF-2, zachodzącą pod wpływem kinazy III zależnej od Ca/CM [23].

Bezpośredni wpływ sfingozyny na enzymy regulowane przez jony wapnia nie wyczerpuje jednak możliwości działania na gospodarkę wapniową. Zasady sfingoineowe mają zdolność uwalniania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z wewnątrzkomórkowych magazynów. Dodanie 30  $\mu\text{M}$  sfingozyny do hodowli komórek mięśni gładkich powoduje wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie. Działanie to jest uwarunkowane obecnością wolnej grupy aminowej. Działanie sfingozyny jest zauważalne już w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$ , 50% efekt uzyskuje się przy 1,6  $\mu\text{M}$ , a pełny — przy 30  $\mu\text{M}$ . Doświadczenia przeprowadzane na izolowanych błonach retikulum endoplazmatycznego wskazują na to, że sfingozyna działa na te same kanały wapniowe, które są wrażliwe na  $\text{InsP}_3$ . Czy jednak w tym działaniu sfingozyna jest właściwym efektem? Długi okres latencyjny jej działania, wyraźny dodatni wpływ ATP oraz brak działania w niskich temperaturach, utrudniających procesy enzymatyczne, nasunęły przypuszczenie, że działa raczej pochodna sfingozyny. Autorzy sugerują, że może nią być fosfosfingozyna [24].

Podobne wyniki otrzymano badając wpływ sfingozyny na mobilizację wapnia w komórkach trzustki i ślinianek. Sfingozyna wprowadzona do tych komórek w dozach 10-100  $\mu\text{moli}$  indukuje 10-krotny wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w cytosolu. Efekt następuje po kilku minutach w 37°. Mobilizacji wapnia nie hamowały inhibitory fosfolipazy C, generującej  $\text{InsP}_3$ , ani heparyna, która selektywnie blokuje receptory  $\text{InsP}_3$  w ER. Ponieważ po długotrwałym działaniu maksymalnych ilości  $\text{InsP}_3$  sfingozyna nie stymulowała mobilizacji wapnia, przypuszcza się, że i w tych komórkach oba efekторы działają na te same kanały w ER. Badając działanie różnych pochodnych sfingozyny stwierdzono, że sfingozylfosfocholina działa natychmiastowo, niezależnie od temperatury. Fosfosfingozyna, wbrew wcześniejszym przypuszczeniom, nie jest zapewne właściwym efektem i działa podobnie jak sfingozyna [25].

Zaproponowano następujący schemat działania szlaku sfingomielinowego w gospodarce wapniowej: ceramid, uwalniany pod wpływem sfingomielinidazy

ulega deacylacji. Sfingozyna wędruje do błon ER i tu przechodzi dalszą przemianę. Nierozpuszczalny produkt, przypuszczalnie sfingozylcholeolina, jest wychwytywany przez błonę ER i działa na kanały wapniowe [24, 25].

Badania nad szlakiem sfingomielinowym trwają. Już teraz można stwierdzić, że powstają w nim różnorodne przekaźniki wtórne o swoistych mechanizmach działania. Przekaźniki te biorą udział w regulacji aktywności kinaz białkowych, mobilizacji wapnia i regulacji ekspresji genów.

Artykuł otrzymano 5 maja 1994 r.  
Zaakceptowano do druku 26 maja 1994 r.

## Piśmiennictwo

1. Raines MA, Kolesnick RN, Goldes DW (1933) *J Biol Chem* **268**: 14572-14575
2. Dressler KA, Mathies S, Kolesnick RN (1992) *Science* **255**: 1715-1718
3. Zhang H, Buckley NE, Gibson K, Spiegel S (1990) *J Biol Chem* **265**: 76-81
4. Hannum Y, Bell RM (1987) *Science* **235**: 670-674
5. Merrill AH Jr, Sereni AM, Stevens VL, Hannum YA, Bell RM, Kinkade JM Jr (1986) *J Biol Chem* **261**: 12610-12615
6. Merrill AH Jr, Stevens VL (1989) *Biochim Biophys Acta* **1010**: 131-139
7. Kolesnick RN (1989) *J Biol Chem* **264**: 7617-7623
8. Okazaki T, Bell R, Hannum Y (1989) *J Biol Chem* **264**: 19076-19080
9. Okazaki T, Bielawska A, Bell RM, Hannum YA (1990) *J Biol Chem* **265**: 15823-15831
10. Kim MY, Linardie C, Obeid L, Hannum Y (1991) *J Biol Chem* **266**: 484-489
11. Faucher M, Girones N, Hannum YA, Bell RM, Davis RJ (1988) *J Biol Chem* **263**: 5319-5327
12. Goldkorn T, Dressler KA, Muindi J, Radin NS, Medelsohn J, Mendalino D, Liotta D, Kolesnick RN (1991) *J Biol Chem* **266**: 16092-16097
13. Schutze S, Potthof K, Machleidt T, Berkovic D, Wiegmann K, Kronke M (1992) *Cell* **71**: 756-776
14. Kolesnick RN (1987) *J Biol Chem* **262**: 16759-16762
15. Wilson E, Olcott MC, Bell RM, Merrill AH Jr, Lambeth JD (1986) *J Biol Chem* **261**: 12616-12623
16. Oishi K, Raynor RL, Charp PA, Kuo JF (1988) *J Biol Chem* **263**: 6865-6871
17. Hannum YA, Greenberg CS, Bell RM (1987) *J Biol Chem* **262**: 13620-13626
18. Sanchez A, Alonso MT, Collazos JM (1988) *Biochim Biophys Acta* **938**: 497-500
19. Wilson E, Rice WG, Kinkade RM Jr, Merrill AH Jr, Arnold RP, Lambeth JD (1987) *Arch Biochem Biophys* **259**: 204-214
20. Winicow I, Gershengorn MC (1988) *J Biol Chem* **263**: 12179-12182
21. Winicow I, Cory RN, Gershengorn MC (1990) *Endocrinology* **126**: 1688-1672
22. Davis RJ, Girones N, Faucher M (1988) *J Biol Chem* **263**: 5373-5379
23. Jefferson AB, Schulman H (1988) *J Biol Chem* **263**: 15241-15244
24. Ghosh TK, Bian J, Gill DL (1990) *Science* **248**: 1653-1656
25. Yule DI, Wu D, Essington TE, Shayman JA, Williams JA (1993) *J Biol Chem* **268**: 12353-12358

## Komunikaty Zarządu Głównego

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

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



# Geny kodujące receptory jonotropowe glutaminianu

## Glutamate receptor channel-encoding genes

DOROTA NOWICKA\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Technika klonowania genów kodujących receptory jonotropowe
- III. Receptor AMPA
- IV. Receptor kainianowy
- V. Receptor NMDA
- VI. Receptory jonotropowe glutaminianu w chorobach neurodegeneracyjnych
- VII. Uwagi końcowe

### Contents:

- I. Introduction
- II. Glutamate receptor gene cloning
- III. AMPA receptor
- IV. Kainate receptor
- V. NMDA receptor
- VI. Glutamate receptor channels in neurodegenerative diseases
- VII. Final remarks

**Wykaz stosowanych skrótów:** EAA — *excitatory aminoacids*, aminokwasy pobudzające; LTP — *long term potentiation*, długotrwałe wzmocnienie synaptyczne; LTD — *long term depression*, długotrwałe osłabienie synaptyczne; GluR — *glutamate receptor*, receptor glutaminianu; NMDA — *N-methyl-D-aspartate*, kwas N-metylo-D-asparaginowy; AMPA — *alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*, kwas alfa-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy; cAMP — *adenosine-3',5'-cyclophosphate*, cykliczny adozynomonofosforan; L-AP-4 — *L-2-amino-4-phosphobutanoic acid*, kwas 2-amino-4-fosfonomasłowy; nAChR — *nicotinic acetylcholine receptor*, receptor nikotynowy dla acetylocholiny; GABA<sub>A</sub>R — *gamma-aminobutyric acid receptor*, receptor kwasu gamma-aminomasłowego; PCR — *polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy; KA — *kainic acid*, kwas kainowy, KYN — *kynurenic acid*, kwas kynureninowy; 7-Cl-KYN — *7-Cl-kynurenic acid*, kwas 7-chloro-kynureninowy; CPP — *3-((+)-2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonate*, kwas 3-(2-karboksypiperazylo-4-ilo)-propylo-1-fosfonowy; APV — *D-(-)-2-amino-5-phosphonovalerate*, kwas 2-amino-5-fosfowalerianowy; MK-801 — *dizocilpine*, *D-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5-10-imine maleate*, maleinian 5-metylo-10,11-dihydro-5H-dibenzocyklohepteno-5,10-iminy.

### I. Wstęp

W połowie lat 50-tych opublikowano prace wykazujące, że glutaminian i asparaginian, aminokwasy powszechnie występujące w białkach, podane obwodowo wywołują drgawki u zwierząt laboratoryjnych [1]. Wkrótce potem ukazało się wiele doniesień wykazujących działanie glutaminianu i asparaginianu w ośrodkowym układzie nerwowym [2], jednak dopiero

w ostatnich latach uznano je powszechnie za neuroprzekazniki [3-5] i określa się jako tzw. aminokwasy pobudzające (EAA — *excitatory aminoacids*). Obecnie uważa się nawet, że wszystkie neurony — a także i niektóre komórki glejowe — są wrażliwe na działanie aminokwasów pobudzających, co świadczyć może o szczególnie istotnej roli tego systemu neuroprzekaznikowego.

Zmiany przewodnictwa glutaminianowego leżą prawdopodobnie u podstaw plastyczności synaptycznej i neurotoksyczności. Przykładami procesów uznawanych za przejawy plastyczności układu nerwowego są: długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP — *long term potentiation*) w hipokampie i długotrwałe osłabienie synaptyczne (LTD — *long term depression*) w mózdku, polegające odpowiednio na wzroście lub spadku efektywności synaps pod wpływem specyficznego drażnienia neuronu prądem o określonej częstotliwości [6-8]. Ponieważ uważa się, że uczenie i zapamiętywanie polega na trwałych zmianach w wydajności synaps, wspomniane powyżej zjawiska mogą naśladować zachodzący w mózgu proces gromadzenia i przechowywania informacji. Dlatego badanie mechanizmów LTP i LTD oraz udziału w nich receptorów EAA może dostarczyć informacji o roli tych ostatnich w funkcjonowaniu układu nerwowego. Z drugiej strony, zaburzenia wydzielania glutaminianu podczas niedotlenienia mózgu, silne pobudzenie komórek nerwowych przez występujący w dużym nadmiarze neuroprzekaznik powoduje zakłócenie pracy synaps i w efekcie prowadzi do śmierci neuronu. Również w powolnych procesach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimerera czy choroba Huntingtona, wśród licznych i nie do końca poznanych mechanizmów występują również nieprawidłowości w przewodnictwie glutaminianowym [9].

\* Mgr, Pracownia Hodowli Komórek i Tkanki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Dońskiego, 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3

Aminokwasy pobudzające, podobnie jak inne neuroprzebieżniki, nie działają na komórki nerwowe bezpośrednio ale przez receptory znajdujące się na powierzchni błony komórkowej. Wieloletnie badania prowadzące do udoskonalenia „narzędzi farmakologicznych”, jakimi są agoniści i antagoniści EAA, pozwoliły wyróżnić 5 zasadniczych podtypów receptorów, których nazwy pochodzą od ich selektywnych agonistów:

1. Receptor NMDA (ang. *N-methyl-D-aspartate*, kwas N-metylo-D-asparaginowy), jonotropowy (tzn. taki, który w obrębie kompleksu receptorowego zawiera kanał jonowy), o wysokiej przepuszczalności dla jonów wapnia, sodu i potasu. Pod wieloma względami jest to najlepiej scharakteryzowany receptor, przede wszystkim dlatego, że znanych jest wiele substancji aktywnych i blokujących go w sposób selektywny.
2. Receptor AMPA (ang. *alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*, kwas alfa-amino-3-hydroxy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy), jonotropowy, przepuszczalny dla kationów, jak się wydawało, wyłącznie jednowartościowych. Badania molekularne wykazały, że mogą istnieć subpopulacje receptorów AMPA przepuszczalnych dla jonów wapnia.
3. Receptor kainianowy — o wysokim powinowactwie do kwasu kainowego — słabo poznany: do niedawna jego istnienie jako odrębnego receptora poddawano w wątpliwość. Znow dzięki badaniom molekularnym jego istnienie zostało potwierdzone. Zawiera w obrębie kompleksu receptorowego kanał jonowy przepuszczalny dla  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ .

Ponadto wyróżnia się jeszcze:

4. Receptor metabotropowy — w odróżnieniu od poprzednich ten receptor swój wpływ wywiera poprzez białko G oddziałujące na specyficzną cyklazę adenylanową (szlak cAMP) lub na fosfolipazę C (szlak fosfoinozytoliowy).
5. Receptor L-AP-4 (ang. *L-2-amino-4-phosphonobutanoic acid*, kwas 2-amino-4-fosfonomasłowy), o niedokładnie poznanej charakterystyce farmakologicznej i funkcjonalnej. Znajduje się prawdopodobnie na błonie presynaptycznej i być może reguluje wydzielenie glutaminianu do szczeliny synaptycznej.

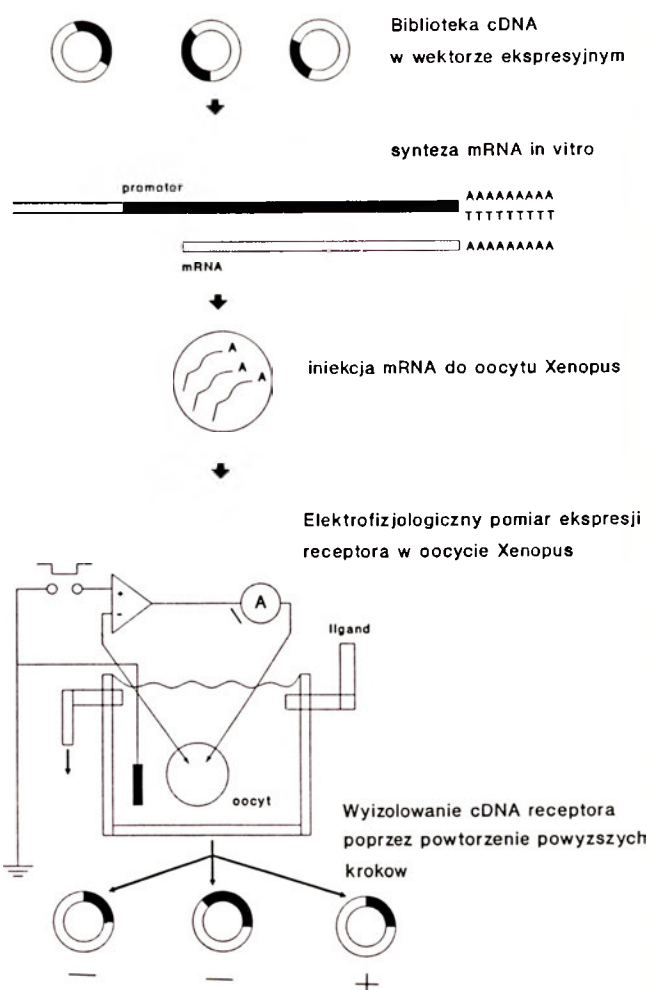
## II. Technika klonowania genów kodujących receptory EAA

Do końca lat 80-tych w badaniach nad receptorami aminokwasów pobudzających wykorzystywano głównie metody elektrofizjologiczne, połączone ze stosowaniem rozmaitych substancji farmakologicznych. Prowadziło to do stosunkowo dobrego scharakteryzowania pod względem funkcjonalnym tylko tych receptorów, w przypadku których odkryto substancje oddziałujące na nie w sposób specyficzny. Pełniejszej

wiedzy na temat struktury, właściwości i ekspresji receptorów EAA dostarczają badania z zastosowaniem technik biologii molekularnej.

Konwencjonalne podejście do klonowania genów kodujących określone białka, także receptorowe, wymagało uzyskania czystego białka, zsekwencjonowania, określenia prawdopodobnej sekwencji nukleotydowej i wyprodukowania komplementarnej sondy do przeszukiwania biblioteki genowej lub cDNA. Dzięki pomysłowemu połączeniu techniki elektrofizjologicznej z molekularną skomplikowana procedura została znacznie uproszczona [10]. W eksperymentach wykorzystano znaną od dawna zdolność oocytów *Xenopus laevis* do produkcji białek lub matrycy sztucznie wprowadzonego do nich mRNA. W przypadku białek receptorowych ich obecność w oocycie jest łatwo wykrywalna poprzez pomiar aktywności elektrofizjologicznej oocytu po pobudzeniu przez selektywnego agonistę. Technika klonowania wygląda następująco:

z mRNA wyizolowanego z mózgu konstruuje się bibliotekę cDNA w wektorze umożliwiającym później syntezę RNA *in vitro*. Bibliotekę dzieli się na porcje i każdą z nich bada oddzielnie. Wyprodukowane *in vitro* mRNA wstrzykuje się do oocytów.



Ryc. 1. Schemat procedury klonowania cDNA dla receptora poprzez kombinację ekspresji białka receptorowego w oocycie *Xenopus*, i pomiaru elektrofizjologicznego.

O obecności w danej puli poszukiwanego mRNA kodującego białko receptorowe wnioskuje się na podstawie aktywacji błony oocytu pod wpływem podanego liganda. Do dalszej obróbki wybiera się te części biblioteki, które prawdopodobnie zawierają klony niosące geny receptorowe. Procedura jest powtarzana, aż do momentu otrzymania pojedynczego, pozytywnego klonu (Ryc. 1). Tą metodą wykryto wiele podjednostek receptorów aminokwasów pobudzających.

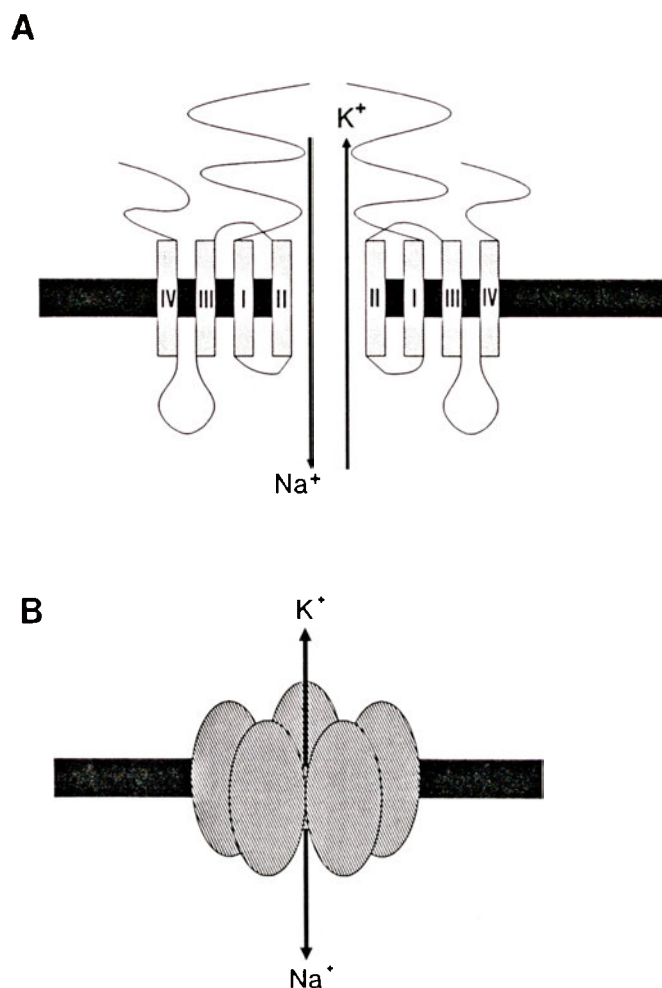
### III. Receptor AMPA

Wszystkie lub prawie wszystkie poznane do tej pory podjednostki receptorów jonotropowych, w tym również receptorów AMPA zbudowane są według podobnego schematu. Część białka o zmiennej długości zawiera w części C-końcowej cztery konserwatywne domeny TMI—TMIV, zakotwiczone w błonie komórkowej. Natywny receptor składa się prawdopodobnie z pięciu podjednostek ułożonych w ten sposób, że ich domeny TMII tworzą kanał jonowy, a wolne końce wystają do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Ryc. 2a, b) [11].

Znane są cztery geny kodujące podjednostki receptora AMPA. Podjednostki te, odkryte niezależnie przez dwa zespoły badawcze, noszą nazwy GluR 1-4 lub odpowiednio GluR A-D [12-14]. Ich wielkość waha się od 862 reszt aminokwasowych w przypadku GluR B do 889 w przypadku GluR A. Duże podobieństwo, sięgające 70% na poziomie RNA oraz całkowity brak homologii z innymi poznanymi genami kodującymi podjednostki receptorów jonotropowych, np. nAChR, (ang. *nicotinic acetylcholine receptor*, receptor nikotynowy acetylocholino) lub GABA<sub>A</sub>R (*gamma-aminobutyric acid receptor*, receptor GABA<sub>A</sub>) wskazuje, że receptory jonotropowe glutaminianu stanowią ewolucyjnie odrębną rodzinę białek receptorowych.

Na podstawie sekwencji nukleotydowych sklonowanych genów określono prawdopodobną strukturę i właściwości białek. Wszystkie podjednostki GluR zawierają w części C-końcowej cztery hydrofobowe domeny wewnątrz błonowe, oraz długą (ponad 400 reszt aminokwasowych), zewnątrzkomórkową domenę N-końcową o stosunkowo największej zmienności [12]. Fragmenty cząsteczki tworzące zewnętrzny i wewnętrzny otwór kanału mają netto ładunek ujemny. W szczególności ujemnie naładowana jest pętla cytoplazmatyczna pomiędzy domenami TMI i TMII. Dodatkowo, po obu stronach domeny TMII (która bierze bezpośredni udział w tworzeniu kanału) znajdują się ujemne aminokwasy, determinujące przepuszczalność receptora dla kationów [13].

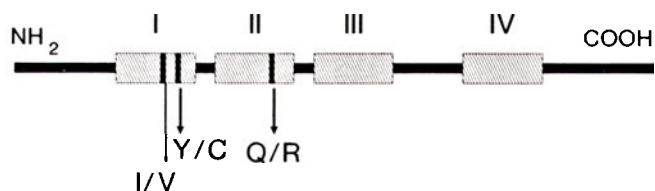
Do niedawna sądzono, że kanał jonowy położony w obrębie receptora AMPA przepuszcza wyłącznie kationy jednowartościowe. Eksperymenty *in vitro* z heteromerycznymi receptorami wykazały, że czynnikiem



Ryc. 2. Uproszczony model receptora jonotropowego. A: przekrój przez receptor; domeny śród błonowe oznaczono cyframi rzymskimi I, II, III, IV. Domena TMII tworzy kanał jonowy, wolne końce C i N wystają do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. B: prawdopodobna pentameryczna struktura kompleksu receptorowego.

blokującym przepływ wapnia przez kanał jest obecność w kompleksie receptorowym podjednostki GluR B [15]. Ponieważ akurat ta podjednostka ulega ekspresji w większości obszarów mózgu, wydaje się, że występuje powszechnie w receptorach, determinując tym samym ich nieprzepuszczalność dla Ca<sup>2+</sup>. Wykryto jednak w mózgu komórki, w których podjednostka GluR B nie ulega ekspresji. Zidentyfikowano je jako komórki glejowe Bergmanna. Komórki te, hodowane *in vitro* wykazują w badaniach elektrofizjologicznych obecność na swej powierzchni receptorów AMPA przepuszczalnych dla jonów wapnia, zbudowanych najprawdopodobniej z podjednostek GluR A i D [16, 17].

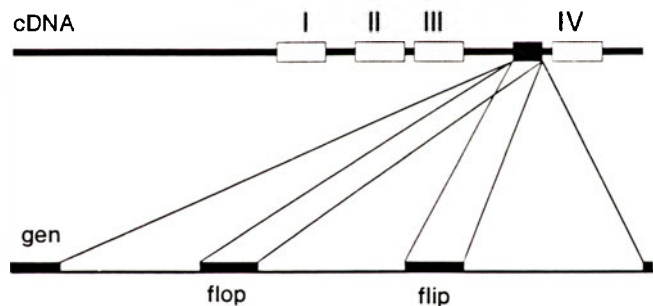
Zasadnicza różnica właściwości podjednostek A, C, D i podjednostki B, na poziomie molekularnym sprowadza się do obecności w tzw. miejscu Q/R położonym w domenie TMII podjednostki GluR B aminokwasu argininy (R) zamiast glutaminy (Q) znajdującej się w tym samym miejscu w pozostałych podjednostkach (Ryc. 3). Stwierdzono, że kodon CAG kodujący glutaminę obecny jest we wszystkich czterech genach,



Ryc. 3. Odcinek lancucha podjednostki GluR obejmujący śródbłonowe domeny TM I-TM IV. W niektórych podjednostkach (GluR B, GluR 5 i 6) określone pozycje w obszarze TM II mogą być zajęte przez różne aminokwasy dzięki zachodzącemu w tych miejscach procesowi redagowania mRNA (Q/R — glutamina/arginina, I/V — izoleucyna/walina, Y/C — tyrozyna/cysteina).

a zmiana na kodon CCG argininy odbywa się na drodze redagowania RNA (ang. *RNA editing*) GluR B [18].

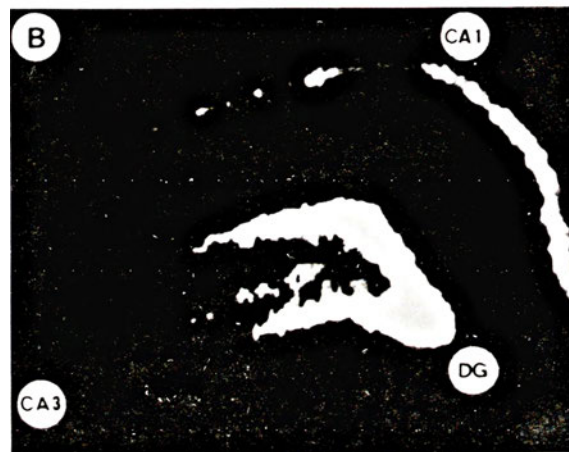
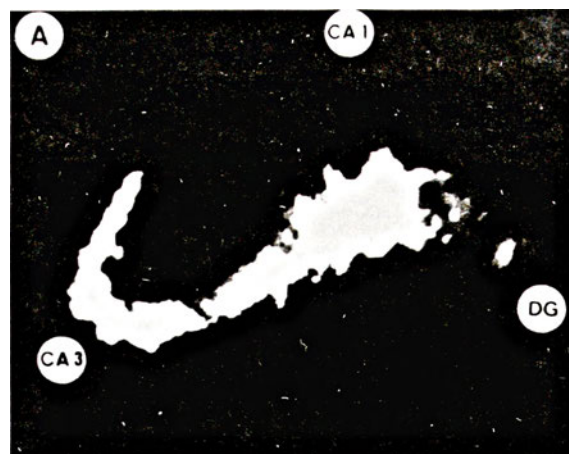
Każda podjednostka może istnieć w dwóch wersjach, różniących się jedynie fragmentem 38 aminokwasów, położonym pomiędzy domenami TM III i TM IV, a więc w obszarze pętli cytoplazmatycznej (Ryc. 4). Te dwie formy powstają w wyniku wybiórczego włączania do mRNA jednego z dwóch istniejących w pre-mRNA segmentów o długości 115 nukleotydów (ang. *alternative splicing*) [19]. Segmenty te, nazwane odpowiednio *flip* i *flop*, mimo niewielkich różnic w sekwencji (7-11 na 38 kodowanych aminokwasów) wpływają wyraźnie na kinetykę i amplitudę odpowiedzi wywoływanych przez agonistów.



Ryc. 4. Obszar genu dla podjednostki GluR B (dolna rycina) kodujący eksony *flip* i *flop* podlegające wybiórczemu włączaniu do mRNA (górna rycina).

Podjednostki GluR A, B, C ulegają ekspresji w wielu obszarach mózgu, np. w korze, hipokampie, mózdku, strukturach podkorowych, podczas gdy GluR D znajduje się prawie wyłącznie w mózdku [13, 14]. Istotne różnice obserwuje się dla form *flip* i *flop*; formy *flip* w korze tworzą wyraźne warstwy, podczas gdy formy *flop* rozłożone są równomiernie. Szczególnie wyraźny jest ich układ w hipokampie — strukturze ważnej dla prawidłowego przebiegu procesu uczenia się; formy te występują tutaj komplementarnie — warianty *flip* w polu CA3, *flop* — w polu CA1 oraz w zakresie zębatym (Ryc. 5) [19].

Jak dotąd nie wyjaśniono fizjologicznego znaczenia różnorodności białek receptorowych. Wszystkie podjednostki mogą *in vitro* tworzyć funkcjonalne homodimerowe kanały jonowe o zróżnicowanych właściwościach. W neuronach najprawdopodob-



Ryc. 5. Rozmieszczenie mRNA podjednostki GluR A w hipokampie. Obszarom o największym nasyceniu barwy białej odpowiada największe stężenie mRNA. A: forma A *flip* występuje w polu CA3, B: forma *flop* — w polu CA1 oraz w zakręcie zębatym DG (badania własne).

niej jednak mamy do czynienia z mieszaniną podjednostek połączonych w stałych proporcjach. Dzięki badaniom wykonanym metodą PCR (ang. *polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy) wiadomo, że komórki różnią się między sobą składem kompleksu receptorowego. Np. w komórkach Purkiniego mózdku ekspresji ulegają podjednostki GluR A i B w obu formach oraz GluR C *flip*, podczas gdy w komórkach ziarnistych mózdku wykryto podjednostki GluR B *flip* i GluR D *flop*, a we wspomnianych komórkach Bergmanna GluR B w ogóle nie występuje [20].

Nie ma, jak dotąd, danych jednoznacznie wskazujących, czy zmiany ekspresji genów kodujących podjednostki receptorowe mogą leżeć u podstaw plastyczności synaptycznej. Pewne zmiany obserwuje się podczas rozwoju osobniczego [21]. W fazie embrionalnej w mózgu szczura wykrywane są jedynie formy *flip* podjednostek: poziom ich ekspresji stopniowo rośnie i osiąga stały poziom około czwartego tygodnia po urodzeniu. Formy *flop* natomiast pojawiają się dopiero w drugim tygodniu w różnym czasie, zależnie od rodzaju komórek.

Wraz z pojawieniem się form *flop* w komórkach, zmieniają się właściwości receptorów. Z badań *in vitro*

wynika, że receptory zawierające formę *flip* podjednostki są bardziej przepuszczalne dla jonów. Pojawienie się we właściwym momencie receptorów z formą *flop*, może w konsekwencji powodować zmniejszenie aktywności synaps, a więc zmianę plastyczną [19, 21].

Najprawdopodobniej jednak oprócz zmian rozwojowych związanych z dojrzewaniem neuronów, poziom mRNA GluR jest stały. Nie wyklucza to innych mechanizmów regulacji receptorów lub ich udziału w procesach związanych z plastycznością. Szczegółowa analiza sekwencji aminokwasowej wykazała obecność w cząsteczce receptora miejsc rozpoznawanych przez kinazę C i kinazę II zależną od kalmoduliny [13]. Dostępne dane sugerują, że fosforylacja receptorów jonotropowych jest jednym z głównych sposobów regulowania wydajności synaptycznej w LTP i LTD [22]. Wielka różnorodność podjednostek receptorowych i różnorodność kinaz białkowych występujących w komórce stwarza szerokie możliwości zarówno krótko- jak i długotrwałych zmian przekaźnictwa glutaminianowego, być może również w naturalnych procesach plastycznych.

#### IV. Receptor o wysokim powinowactwie do kwasu kainowego

Kwas kainowy (KA) jest silną neurotoksyną, w dużych stężeniach działającą w sposób neselektywny na różne receptory. Wśród nich receptory wyróżniające się szczególnie wysokim powinowactwem do KA wyróżniono jako osobną klasę receptorów. Receptor kainianowy występuje głównie w polu CA3 hipokampa, w zakręcie zębatym oraz w głębokich warstwach kory. W innych strukturach jego stężenie jest znacznie niższe.

Dotychczas sklonowano 7 podjednostek tworzących dwie podrodziny: GluR 5 [24], 6 [25, 26] i 7 [27] oraz KA-1 [28] i KA-2 [29]. Dwie pozostałe podjednostki delta-1 i delta-2 [30, 31], które na podstawie podobieństwa sekwencji zaklasyfikowano do receptorów kainianowych, nie tworzą *in vitro* funkcjonalnych kanałów jonowych i jak dotąd nie są znane ich właściwości ani funkcja. Dodatkowe urozmaicenie wprowadzają potranskrypcyjne modyfikacje podjednostek GluR 5 i 6, polegające na delecji 15 aminokwasowego odcinka w obrębie N-końcowej domeny cytoplazmatycznej (podjednostka GluR 5-2) [24, 32] oraz insercjach w części C końcowej [25].

Podjednostki receptora kainianowego są niewątpliwie spokrewnione z opisanymi poprzednio receptorami AMPA. Są zbliżone wielkością (ok. 900 aminokwasów) i mają podobną sekwencję (40% homologii na poziomie mRNA). Znacznie mniej natomiast wiadomo na temat składu i właściwości kompleksów jakie tworzą.

Struktura receptora kainianowego nie została jak dotąd szczegółowo opisana. Podjednostki GluR 5 i 6, w przeciwieństwie do GluR 7 mogą *in vitro* tworzyć

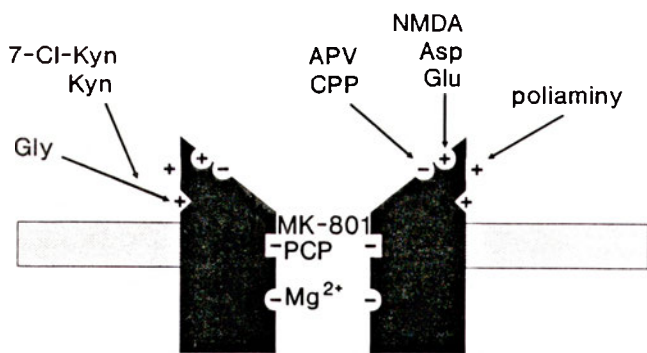
funkcjonalne kanały jonowe, o charakterystyce farmakologicznej i elektrofizjologicznej bardzo podobnej do receptorów położonych na neuronach rogu tylnego rdzenia kręgowego [25,27, 33, 34], co sugeruje, że przynajmniej niektóre podjednostki mogą tworzyć w mózgu naturalne homomeryczne kompleksy receptorowe. KA-1 i KA-2 nie tworzą homomerycznych kanałów jonowych, jednak w połączeniu z GluR 5 i 6 mogą funkcjonować jako receptory o zróżnicowanych w zależności od składu kompleksu właściwościach [29, 35]. Podobnie jak w przypadku GluR B, mRNA kodujące podjednostki GluR 5 i 6 podlegają redagowaniu w miejscu Q/R, jednak gdy GluR B istnieje wyłącznie w formie R (tzn. z arginina), GluR 5 i 6 występują w obu formach różniących się przepuszczalnością dla jonów wapnia [36, 37]. Co więcej, w obrębie domeny TM I podjednostki GluR 6 odkryto dodatkowe dwie pozycje podlegające redagowaniu i mające wpływ na właściwości kanału (Ryc. 3) [38]. Redagowanie RNA jest prawdopodobnie sposobem regulowania i różnicowania napływu wapnia do komórki, niezależnym od zmian w ekspresji samego genu. W izolowanym z mózgu RNA, całkowicie zredagowana forma podjednostki GluR 6 stanowi 65% RNA kodującego tę podjednostkę [38]. Zmiana proporcji form zredagowanych, częściowo zredagowanych i nieredagowanych, podlegająca ścisłej kontroli komórkowej, może mieć znaczenie w regulacji napływu wapnia do wnętrza komórki wywoływanego przez neuroprzebieżnik.

Dzisiejszy stan wiedzy o receptorach kainianowych jest z pewnością niewystarczający, by określić ich rolę w układzie nerwowym. Wydaje się, że jedynie badania pojedynczych neuronów, opisujące skład kompleksu receptorowego w poszczególnych rodzajach komórek mogą dostarczyć nowych, wartościowych informacji.

#### V. Receptor NMDA

Spśród wszystkich receptorów glutaminianu receptor NMDA jest najlepiej poznany i scharakteryzowany pod względem farmakologicznym i funkcjonalnym, a to dzięki istnieniu wielu selektywnych agonistów i antagonistów. W badaniach z użyciem tych substancji rozpoznano i opisano kilka unikatowych domen położonych w obrębie kompleksu receptor-kanał NMDA (Ryc. 6).

W parze ze znajomością właściwości i funkcji receptora NMDA przez długi czas nie szła znajomość budowy molekularnej kompleksu. Dopiero lata dziewięćdziesiąte przyniosły odkrycia kolejnych podjednostek. Sklonowano jak dotąd 5 genów, kodujących 5 białek, które zaklasyfikować można do dwóch grup: NMDAR1 (NR1) [39, 40] i NMDAR2A-D (NR2A-2D) [41-45]. Podjednostką najliczniej reprezentowaną w mózgu jest NR1. Występuje w dużej ilości w korze mózgowej w której tworzy warstwy, w hipokampie we wszystkich jego obszarach, w móz-



**Ryc. 6.** Model receptora NMDA. + — miejsca pobudzenia receptora, — — miejsca hamujące lub blokujące receptor. Asp (ang. *aspartate*, *asparaginian*), APV (ang. *D-(-)-2-amino-5-phosphonovalerate*, kwas 2-amino-5-fosfonowalearianowy), CPP (ang. *3-((+)-2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonate*, kwas 3-(2-karboksypiperazyno-4-ilo)-propylo-1-fosfonowy), Glu (ang. *glutamate*, *glutaminian*), Gly (ang. *glycine*, *glicyna*), Kyn, 7-Cl-Kyn — *kynurenic acid*, *7-Cl-kynurenic acid*, kwas kynureninowy, kwas 7-chlorokynureninowy MK-801 (ang. *dizocilpine*, *maleinian 5-metylo-10,11-dihydro-5H-dibenzocyclohepteno-5,10-iminy*), NMDA (*N-metyl-D-aspartate*, kwas *N-metylo-D-asparaginowy*), PCP (ang. *phencyclidine*, *fencyklidyna*).

dżku oraz w mniejszych ilościach w strukturach podkorowych [39]. Z grupy białek NR2 jedynie NR2A występuje dość powszechnie, bo w korze, hipokampie i mózdku, jednak zawartość jego jest mniejsza niż zawartość NR1. Występowanie pozostałych ograniczone jest do pewnych obszarów: NR2B ulega ekspresji głównie w korze i hipokampie, NR2C — prawie wyłącznie w mózdku i wzgórzu, NR2D — również w mózdku i w strukturach podkorowych [41].

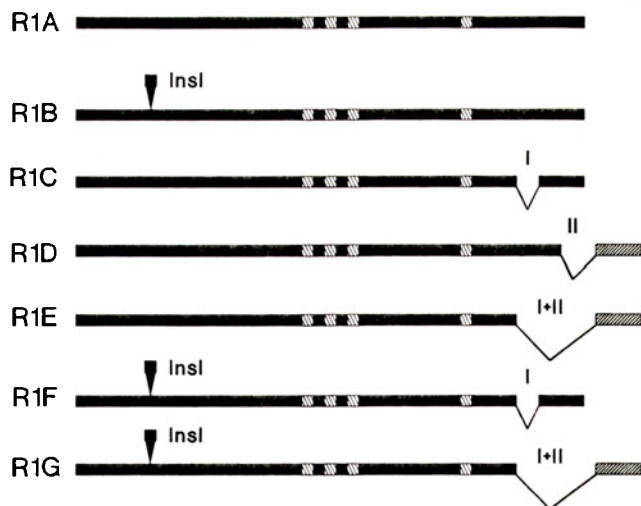
Ekspresja podjednostek receptora NMDA zmienia się wyraźnie podczas rozwoju osobniczego szczura. Zmiany polegają przede wszystkim na wzroście ilości mRNA aż do osiągnięcia stałego poziomu ok. trzeciego tygodnia życia po urodzeniu (np. NR1 i NR2A) [46], jednak np. podjednostka NR2D obecna już w mózgu embrionalnym zanika ok. drugiego tygodnia [46], a NR2C w drugim tygodniu ulega krótkotrwałej, przejściowej ekspresji z hipokampie [47].

Zmiany ekspresji pięciu podjednostek receptora NMDA podczas rozwoju sugerują, że zmienia się również skład kompleksu receptorowego. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że aby receptor działał prawidłowo, w jego skład musi wchodzić podjednostka NR1 oraz co najmniej jedna z podjednostek NR2 [41]. Homomeryczny kompleks NR1 wykazuje *in vitro* właściwości receptora NMDA, jednak jego aktywność mierzona metodami elektrofizjologicznymi jest kilkakrotnie niższa niż receptorów heteromerycznych jak również i natywnych. Kompleks złożony z samych tylko podjednostek NR2 jest nieaktywny. Mogą one być jednak uważane za swego rodzaju modulatory, gdyż receptory o różnym składzie podjednostkowym wykazują istotne różnice w kinetyce odpowiedzi na obecność w środowisku agonisty, jak również we wrażliwości na glicynę czy magnez [41].

W przeciwieństwie do wcześniej opisanych, geny

kodujące podjednostki NR1 i NR2 nie są blisko spokrewnione. Homologia między nimi sięga zaledwie 18%. Podjednostki NR2 przejawiają ponadto pewną interesującą cechę, odróżniającą je od innych, a mianowicie długi, bo złożony z ok. 550 aminokwasów koniec C. Tym samym jest on dłuższy niż koniec N, tradycyjnie umieszczany po stronie cytoplazmatycznej, i który we wszystkich poznanych podjednostkach ma długość ok. 500 aminokwasów [41]. Pomimo zasadniczych różnic w sekwencji aminokwasowej wszystkie podjednostki NMDA zawierają tę samą funkcjonalną determinantę w obrębie domeny TM II. Jest nią asparagina (N), znajdująca się w punkcie odpowiadającym miejscu Q/R receptorów nie-NMDA, która w podjednostkach NR1 i NR2 jest odpowiedzialna za przepuszczalność kanału dla jonów  $Ca^{2+}$  oraz za zależny od napięcia blok kanału przez jony  $Mg^{2+}$ . Zastąpienie asparaginy w podjednostce NR1 glutaminą powoduje znaczny spadek przepuszczalności kanału dla wapnia, lecz nie ma wpływu na blok magnezowy. Taka sama operacja dokonana na podjednostce NR2 nie zmienia przepuszczalności dla wapnia, znosi natomiast częściowo blokujące działanie magnezu. Stąd wniosek, że asparagina w miejscu Q/R w podjednostce NR1 i NR2 ma niejednakowy wkład w determinowanie właściwości kompleksu receptorowego [48].

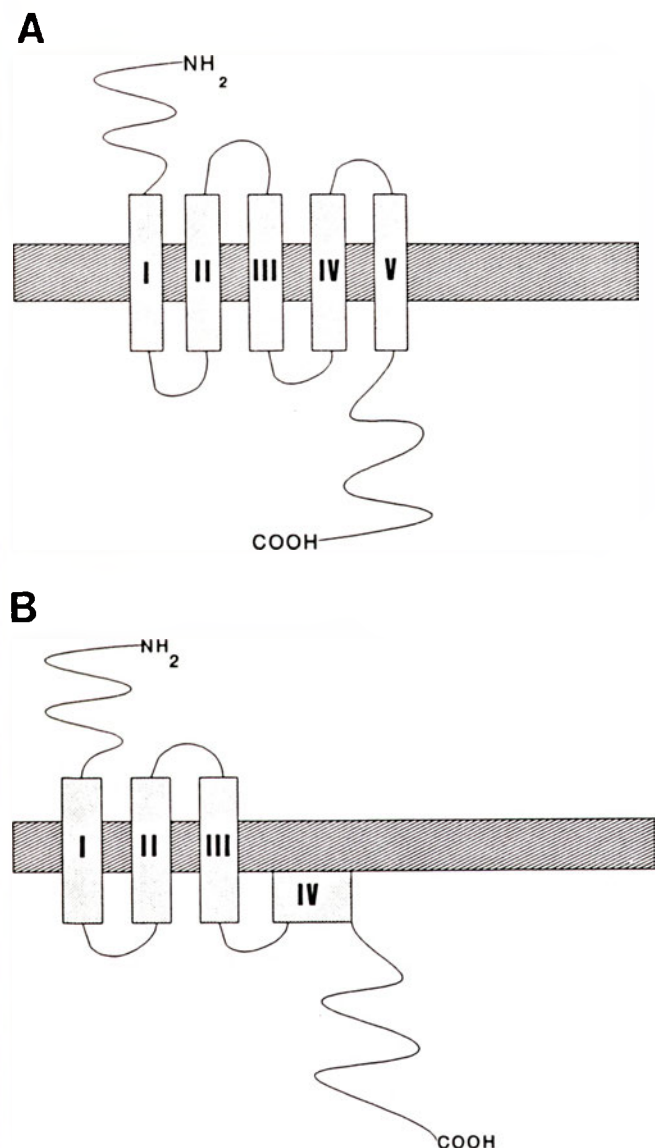
Podobnie jak w przypadku opisanych wcześniej receptorów nie-NMDA, pre-mRNA podjednostki NR1 ulega potranskrypcyjnym modyfikacjom: wykryto 7 izoform, będących kombinacjami jednej insercji i dwóch delecji w pobliżu N i C końców, różniących się wrażliwością na poszczególne ligandy (Ryc. 7) [49].



**Ryc. 7.** Liniowy schemat siedmiu izoform receptora NMDA. Insl — insercja w części N-końcowej, I i II — delecje położone w części C-końcowej. Zakreskowane prostokąty — domeny śródbłonowe.

Ponadto pojawiły się doniesienia o odkryciu miejsc fosforylacji przez kinazę C, położonych w obrębie delecji w części C-końcowej, co podaje w wątpliwość słuszność zastosowania modelu struktury receptora nikotynowego do receptorów NMDA [50]. Aby roz-

wiązać tę sprzeczność proponuje się inne modele budowy przestrzennej (Ryc. 8a, b). Jeden z nich zakłada istnienie piątej domeny śródbłonowej w obszarze pomiędzy TM IV a końcem C, która mogłaby wprowadzać koniec COOH do wnętrza komórki. Jest to jednak mało prawdopodobne gdyż w tym regionie nie ma wyraźnych stref hydrofobowych. W drugim proponowanym modelu domena TM IV nie przechodzi przez błonę komórkową, pozostawiając koniec COOH po stronie cytoplazmatycznej.



Ryc. 8. A, B: Proponowane alternatywne modele budowy receptora NMDA.

## VI. Receptory glutaminianu w procesach neurodegeneracyjnych

Wiele doniesień sugeruje, że mechanizmy komórkowe, które służą przekazywaniu informacji, zmienione w procesach chorobowych, mogą powodować śmierć komórek. W pewnych stanach patologicznych obserwuje się zaburzenia w przekaźnictwie glutaminianowym, prowadzące do degeneracji określonych grup

komórek nerwowych. Prawdopodobnie jednak w większości przypadków zmianom neurotransmisji nie towarzyszy zmiana ekspresji genów kodujących podjednostki receptorowe. Jak dotąd, jedynym opisanym przypadkiem takiej zmiany jest globalna ischemia (niedokrwienie) mózgu [51]. Po upływie 24 godzin od wywołania eksperymentalnej ischemii u szczura obserwuje się znaczny spadek ekspresji podjednostki GluR B, zarówno formy *flip* jak i *flop*, w polu CA1 hipokampa. Brak podjednostki GluR B najprawdopodobniej prowadzi do powstawania kompleksów receptorowych AMPA przepuszczalnych dla wapnia. Nadmiar jonów wapniowych napływających do komórki przyczynia się do rozregulowania procesów metabolicznych i w rezultacie do śmierci neuronu.

## VII. Uwagi końcowe

Badania z zastosowaniem technik biologii molekularnej ujawniły istnienie wielu rozmaitych receptorów glutaminianu w ośrodkowym układzie nerwowym. Sklonowanie poszczególnych podjednostek i badanie heteromerycznych receptorów, rekombinowanych w oocytach *Xenopus* pozwoliło na szczegółową analizę funkcjonalną czystych populacji kanałów receptorowych. Tego typu analiza nie jest możliwa w preparatach natywnych błon neuronalnych, a tym bardziej w neuronach, ponieważ zwykle w błonach tych komórek znajdują się rozmaite receptory, należące do różnych klas, przemieszane ze sobą w różnych proporcjach. W dodatku nawet z użyciem wyjątkowo selektywnych agonistów czy antagonistów różnice w składzie kompleksów receptorów różnych klas, położonych na różnych komórkach są prawie niemożliwe do zarejestrowania dostępnymi metodami elektrofizjologicznymi.

Badanie genów kodujących podjednostki GluR ujawniły funkcjonowanie genetycznych mechanizmów, takich jak redagowanie RNA czy *alternative splicing*, regulujących obecność funkcjonalnych domen w podjednostkach receptora. Dzięki nim wykryto szereg nowych właściwości receptorów, takich jak np. przepuszczalność określonych receptorów AMPA dla wapnia czy regulacja właściwości kanału przez pojedyncze aminokwasy w łańcuchu białkowym.

Dalsze badania będą prawdopodobnie miały na celu określenie szczegółowej (pre- czy postsynaptycznej) lokalizacji poszczególnych podtypów receptorów metodą hybrydyzacji *in situ* i immunocytochemii. Równie istotne dla pełnego zrozumienia sposobu funkcjonowania receptorów będzie zbadanie komórkowych mechanizmów modyfikacji białek receptorowych (np. oddziaływania allosteryczne rozmaitych modulatorów, fosforylacja, redagowanie na etapie RNA itp.). Wyjaśnienia wymagają również zjawiska neurotoksyczności oraz przyczyn chorób neurodegeneracyjnych. W tym kontekście konieczny jest dalszy rozwój farmakologii receptorów i testowanie nowych specyfi-

cznych, lecz niezbyt silnych antagonistów, selektywnych dla wybranych receptorów, które nie wywołując efektów ubocznych znoszą szkodliwe efekty nadmiernego pobudzenia.

Badania molekularne nad receptorami aminokwasów pobudzających są ciągle jeszcze w fazie początkowej. Wykryto cały szereg genów kodujących wiele podjednostek, występujących w wielu izoformach, określono ich sekwencję nukleotydową i białkową, zbadano właściwości farmakologiczne i elektrofizjologiczne. Wiele problemów pozostaje jednak jak dotąd niewyjaśnionych. Dalsze badania będą niewątpliwie interesujące i ważne dla zrozumienia integracyjnej funkcji transmisji glutaminianowej w ośrodkowym układzie nerwowym.

Artykuł otrzymano 11 stycznia 1994 r.  
Zaakceptowano do druku 20 maja 1994 r.

## Piśmiennictwo

- Hayashi T (1954) *Keio J Med* 3: 183-192
- Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC (1959) *Nature* 183: 611-612
- Watkins JC, Evans RH (1981) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21: 165-204
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW (1989) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29: 365-402
- Collingridge GL, Lester RAJ (1989) *Pharmacol Rev* 41: 143-210
- Errington ML, Lynch MA, Bliss TVP (1987) *Neuroscience* 20: 279-284
- Madison DV, Malenka RC, Nicoll RA (1991) *Annu Rev Neurosci* 14 (379)
- Ito M (1989) *Annu Rev Neurosci* 12: 85-102
- Meldrum B, Garzwaite J (1990) *Trends Pharmacol Sci* 11: 379-387
- Masu Y, Nakayama Y, Tamaki H, Harada Y, Kuno M, Nakanishi S (1987) *Nature* 329: 836-838
- Unwin N (1989) *Neuron* 3: 665-676
- Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Rogers SW, Heinemann S (1990) *Nature* 342: 643-648
- Keinanen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, Verdoorn TA, Sakmann B, Seeburg PH (1990) *Nature* 342: 556-560
- Boulter J, Holmann M, O'Shea-Greenfield A, Hartley M, Deneris E, Maron C, Heinemann S (1990) *Science* 249: 1033-1037
- Hollmann M, Hartley M, Heinemann S (1991) *Science* 252: 851-853
- Burnashev N, Khodorova A, Jonas P, Helm PJ, Wisden W, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992) *Science* 256: 1566-1569
- Muller T, Moller T, Berger T, Schnitzer J, Kettenmann H (1992) *Science* 256: 1563-1566
- Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992) *Neuron* 8: 189-198
- Sommer B, Keinanen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Kohler M, Takagi T, Sakmann B, Seeburg PH (1990) *Science* 249: 1580-1585
- Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F, Rossier J (1992) *Neuron* 9: 247-258
- Monyer H, Seeburg PH, Wisden W (1991) *Neuron* 6: 799-810
- Collingridge GL, Singer W (1990) *Trends Pharmacol Sci* 11: 290-296
- Greenamyre JT, Olson JMM, Penney JB, Young AB (1985) *J Pharmacol Exp Ther* 233: 254-263
- Bettler B, Boulter J, Hermans-Borgmeyer I, O'Shea-Greenfield A, Deneris ES, Moll C, Borgmeyer U, Hollmann M, Heinemann S (1990) *Neuron* 5: 583-595
- Sommer B, Burnashev N, Verdoorn TA, Keinanen K, Sakmann B, Seeburg PH (1992) *The EMBO J* 11: 1651-1656
- Egebjerg J, Bettler B, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann S (1991) *Nature* 351: 745-748
- Lomeli H, Wisden W, Kohler M, Keinanen K, Sommer B, Seeburg PH (1992) *FEBS Lett* 307: 139-143
- Werner P, Voigt M, Keinanen K, Wisden W, Seeburg PH (1991) *Nature* 351: 742-744
- Herb A, Burnashev N, Werner P, Sakmann B, Wisden W, Seeburg PH (1992) *Neuron* 8: 775-785
- Yamazaki M, Araki K, Shibata A, Mishina M (1992) *Biochem Biophys Res Commun* 183: 886-892
- Lomeli H, Sprengel R, Laurie DJ, Kohr G, Herb A, Seeburg PH, Wisden W (1993) *FEBS Lett* 315: 318-322
- Gregor P, O'Hara BF, Yang X, Uhl GR (1993) *Neuro Report* 4: 1343-1346
- Bettler B, Egebjerg J, Sharma G, Pecht G, Hermans-Borgmeyer I, Moll C, Stevens CF, Heinemann S (1992) *Neuron* 8: 257-265
- Huettnner JE (1990) *Neuron* 5: 255-266
- Sakimura K, Morita T, Kushiya E, Mishina M (1992) *Neuron* 8: 267-274
- Sommer B, Seeburg PH (1992) *Trends Pharmacol Sci* 13: 291-296
- Sommer B, Kohler M, Sprengel R, Seeburg PH (1991) *Cell* 67: 11-19
- Kohler M, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1993) *Neuron* 10: 491-500
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi N (1991) *Nature* 354: 31-37
- Yamazaki M, Mori H, Araki K, Mori K, Mishina M (1992) *FEBS Lett* 300: 39-45
- Monyer H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) *Science* 256: 1217-1221
- Meguro H, Mori H, Araki K, Kushiya E, Kutsuwada T, Yamazaki M, Kumanishi T, Arakawa M, Sakimura K, Mishina M (1992) *Nature* 357: 70-74
- Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M (1992) *Nature* 358: 36-41
- Ikeda K, Nagasawa H, Mori H, Araki K, Sakimura K, Watanabe M, Inoue Y, Mishina M (1992) *FEBS Lett* 313: 34-38
- Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M (1993) *J Biol Chem* 268: 2836-2843
- Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M (1992) *NeuroReport* 3: 1138-1140
- Pollard H, Krestchatsky M, Moreau J, Ben Ari Y (1993) *NeuroReport* 4: 411-414
- Burnashev N, Schoepfer R, Monyer H, Ruppersberg JP, Gunther W, Seeburg PH, Sakmann B (1992) *Science* 257: 1415-1419
- Sugihara H, Moriyoshi K, Ishii T, Masu M, Nakanishi N (1992) *Biochem Biophys Res Commun* 185: 826-832
- Tingley WG, Roche KW, Thompson AK, Huganir RL (1993) *Nature* 364: 70-73
- Pellegrini-Giampietro DE, Zukin RS, Bennett MV, Cho S, Pulsinelli WA (1992) *Proc Natl Acad Sci* 89: 10499-10503



# Białka powierzchniowe i rdzeniowe HBV i ich rola w rozwoju zapalenia wątroby typu B

## Envelope and core proteins of HBV and their influence on the development of hepatitis B

MAŁGORZATA SIDORKIEWICZ<sup>1</sup>,  
ANDRZEJ PŁUCIENNICZAK<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Białka powierzchniowe HBV
  - II-1. Białko S
  - II-2. Białko M
  - II-3. Białko L
  - II-4. Rola białek powierzchniowych w odpowiedzi immunologicznej
- III. Produkty ekspresji ORF preC/C
  - III-1. Białko c
  - III-2. Białko e
  - III-3. Rola białek rdzeniowych w rozwoju zapalenia wątroby typu B
- IV. Uwagi końcowe

### Contents:

- I. Introduction
- II. Surface proteins of HBV
  - II-1. S protein
  - II-2. M protein
  - II-3. L protein
  - II-4. Role of envelope proteins in the immunological response
- III. Expression products of the ORF preC/C
  - III-1. c protein
  - III-2. e protein
  - III-3. Role of core proteins in the development of hepatitis B
- IV. Concluding remarks

**Wykaz stosowanych skrótów:** HBV — wirus zapalenia wątroby typu B, HBs — białko S HBV, HBc — białko rdzeniowe HBV, ORF — otwarta ramka odczytu, preS/S — rejon genomu HBV kodujący białka powierzchniowe, PreC/C — rejon genomu HBV kodujący białka rdzeniowe, Ag — antygen, Ab — przeciwciało, P — proteina, GP — glikoproteina, aa — aminokwas, kz — tysiąc par zasad, wzv B — wirusowe zapalenie wątroby typu B.

### I. Wstęp

Zapalenie wątroby typu B (wzv B), wywołane przez wirusa zapalenia wątroby (HBV), jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych na świecie chorób zakaźnych i stanowi po malarii największe źródło śmiertelności (ponad milion przypadków na rok). Około 10% osób, u których rozwinęło się wzv B, nie eliminuje wirusa i staje się jego nosicielami [1]. Zakażenie HBV nie wywiera na komórki wątrobowe pierwotnego efektu cytotatycznego. Przebieg kliniczny choroby zależy przede wszystkim od odpowiedzi immunologicznej zakażonego organizmu, nie zaś samej obecności czynnika etiologicznego w hepatocytach [2]. W zależności od interakcji pomiędzy antygenami HBV a mechanizmami obronnymi gospodarza wyróżniamy kil-

ka postaci klinicznych choroby: postać ostra kończy się eliminacją wirusa, regeneracją tkanki wątrobowej i trwałą odpornością; zapalenie typu nadostrego (*hepatitis fulminans*) prowadzi do zniszczenia tkanki wątrobowej i charakteryzuje się 85% odsetkiem śmiertelności; zapalenie przewlekłe, wielokrotnie zwiększa ryzyko rozwoju marskości wątroby i raka wątroby [3].

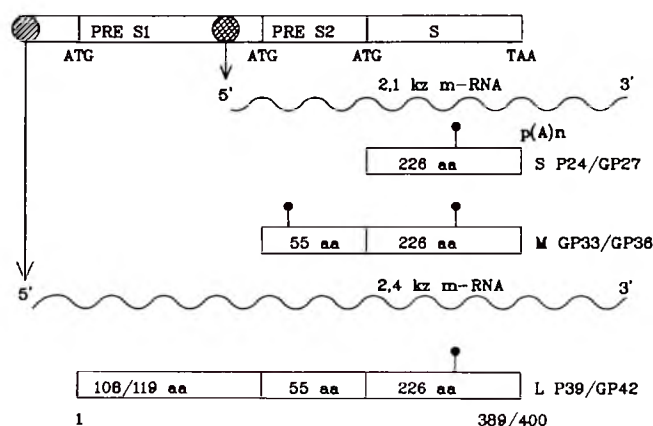
Mechanizm obronny gospodarza skierowany jest przeciw białkom wirusowym zlokalizowanym bezpośrednio na cząstce wirusa oraz wewnętrznym komponentom wirusa, które są ekspozowane na powierzchni zakażonych hepatocytów. Dzięki częściowo nakładającym się i przesuniętym w fazie otwartym ramkom odczytu, niewielki genom HBV (3200 kz) koduje aż 7 białek (organizacji genetycznej HBV poświęcono pracę przeglądową w 2 numerze *Postępy w Biochemii* z 1993 roku). Odpowiedź immunologiczna typu humoralnego indukowana jest w różnym stopniu przez wszystkie białka HBV. Największe znaczenie mają tutaj białka powierzchniowe indukujące powstanie, neutralizujących wirusa, przeciwciał skierowanych przeciw domenom: preS1, preS2 i S [4]. Powstanie tych przeciwciał możliwe jest dzięki współdziałaniu komórek prezentujących antygen, w restrykcyjnym układzie zgodności tkankowej klasy II (HLA II), z limfocytami pomocniczymi T i limfocytami B. Głównym celem odpowiedzi typu komórkowego są białka rdzeniowe prezentowane wraz z białkami głównego układu zgodności tkankowej klasy I (HLA I) na

<sup>1</sup> Dr, I Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Łodzi, 90-131 Łódź, ul. Lindleya 6. <sup>2</sup> Prof., Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN, Łódź, ul. Dąbrowskiego 251.

powierzchni błony komórkowej hepatocytów [5]. Do skutecznej eliminacji zakażenia konieczne jest skoordynowane działanie cytotoksycznych komórek T, lizujących zakażone hepatocyty, oraz przeciwciał neutralizujących bezpośrednio cząstki wirusowe, poprzez tworzenie kompleksów immunologicznych.

## II. Białka powierzchniowe

Otoczka białkowa występująca na powierzchni wirusa HBV oraz cząstki subwiralne składają się z trzech rodzajów białek: małego (S), średniego (M) i dużego (L), posiadających własności antygenowe [6]. Białka te kodowane są przez ORF preS/S, która zawiera trzy, znajdujące się w fazie kodony startu translacji. W efekcie każde z białek powierzchniowych posiada taki sam odcinek C-końcowy (białko S), różni się natomiast rejonem N-końcowym (Ryc. 1). Białka powierzchniowe, ze względu na swą lokalizację, pełnią wiele istotnych funkcji w cyklu życiowym wirusa. Biorą udział w wiązaniu cząstki wirusowej z powierzchnią atakowanej komórki i jej penetracją w pierwszym etapie infekcji, są nieodzowne w procesie dojrzewania wirusa i jego transporcie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [7].



Ryc. 1. Schemat ORF preS/S kodującej białka powierzchniowe HBV. Zaznaczono miejsca promotorowe dla genu preS1 (zakreskowane koło) i genu S (koło w kratkę) i produkty transkrypcji tych genów: 2,1 kb, 2,4 kb RNA. Produkty translacji 2,1 kb RNA to białko S (małe) i M (średnie). Produktem translacji 2,4 kb RNA jest białko L (duże), zawierające domeny preS1, preS2 i S. Zaznaczono wielkość białek (liczba aa) oraz miejsca, w których ulegają one glikozylacji.

### II-1. Białko S

Małe białko powierzchniowe S, często określane jako HBsAg, jest głównym składnikiem otoczki wirusowej oraz cząstek subwiralnych i stanowi 90% białek otoczki HBV obecnych w surowicy [8]. Białko S składa się z 226 aminokwasów kodowanych przez rejon S genomu HBV. Występuje w dwóch formach: glikozylowanej GP27 i nieglikozylowanej P24. Glikan przyłączony jest do Asn<sub>146</sub>. Pierwszorzędowa struktura tego białka wykazuje obecność sekwencji hydrofobowych

między 7-23, 80-98, 169-226 aa [9]. Dwa pierwsze rejon odpowiedzialne są za transport przez błonę lipidową. Rejon pomiędzy 122-155 aminokwasem w białku S, występujący w obrębie drugiego rejonu hydrofilowego, jest wyeksponowany na powierzchni cząstki. Przy użyciu przeciwciał monoklonalnych wykazano w tym rejonie obecność determinant grupowych i podtypowych. Reakcje serologiczne, w których używane były przeciwciała przeciw HBsAg ujawniły istnienie 4 głównych podtypów serologicznych HBV: *adw*, *adr*, *ayw*, *ayr* [10]. Litera *a* oznacza wspólną dla wszystkich podtypów HBV specyficzność antygenową, która jest związana z obecnością więcej niż jednego epitopu. Litery *d/y* i *w/r* oznaczają odpowiednio pary wzajemnie wykluczających się podtypów antygenowych. Wykazano jednak możliwość wspólnego występowania obu allelicznych determinant (*d* i *y* lub *w* i *r*) na tej samej cząstce HBsAg [11]. Różnorodność podtypów wynika z różnic antygenowych pomiędzy białkami S i zależy bezpośrednio od wymiany pojedynczych aminokwasów. Podstawowa różnica w podtypach *d* i *y* zależy od substytucji Arg przez Lys w pozycji 122, różnica zaś między *w* i *r* odpowiada zamianie Arg w Lys w pozycji 160 [12].

Czternaście cystein występujących w białku S bierze udział w tworzeniu mostków S-S. Dwa do czterech wiązań S-S, w pozycjach 121, 124, 221, i prawdopodobnie 48, ma charakter międzycząsteczkowy. Dziesięć pozostałych miejsc występowania cysteiny tworzy wiązania wewnątrzcząsteczkowe [13]. Białko S jest początkowo syntetyzowane jako integralne białko membranowe. Ta transmembranowa forma jest stopniowo przekształcana w lipoproteinową cząstkę złożoną z około 100 kopii białka S. Na tę przemianę mają wpływ silnie hydrofobowe sekwencje topogeniczne (7-22, 84-130aa). Wszystkie informacje potrzebne do prawidłowego utworzenia cząstki i jej sekrecji zawarte są w białku S. Wskazuje na to formowanie takich cząstek w hodowlach komórkowych (HepG2, CoS-7), do których wprowadzono wektor kodujący tylko białko S [14]. Wytwarzanie znacznych ilości HBsAg jest unikalną cechą zakażenia HBV. Utrzymywanie się wysokiego stężenia białka powierzchniowego we krwi może wywoływać stan tolerancji immunologicznej i prowadzić do rozwoju zakażenia przewlekłego [15].

### II-2. Białko M

Białko M o długości 281 aa kodowane jest przez rejon S i preS2 genomu HBV i zawiera w stosunku do białka S dodatkowe 55aa od N-końca [9]. Białko to występuje w postaci glikoproteiny z jedną (GP33) lub dwiema cząsteczkami cukru (GP36) [16]. Zaobserwowano, że w białku M sekwencja preS2 zawsze ulega glikozylacji, natomiast nigdy nie ulega ona glikozylacji w białku L [13].

Hydrofilowa domena preS2 zawiera swoisty gatunkowo receptor dla spolimeryzowanej albuminy

surowicy [17]. Sekwencja biorąca udział w wiązaniu preS2 z albuminą występuje w tej sekwencji pomiędzy 15 i 30aa [18]. Łączenie z rejonem preS2 jest specyficzne głównie dla polimerów albuminy tworzonych *in vitro* w reakcjach z glutaraldehydem [19]. Reakcja wiązania jest silnie hamowana przez monoklonalne przeciwciała anti-preS2 [20]. Nie obserwuje się trwałego łączenia rejonu preS2 z monomeryczną albuminą, która stanowi podstawową formę w krwioobiegu. Ta forma albuminy łączy się jedynie z powierzchniowym białkiem S [21], prawdopodobnie poprzez tworzenie nieodwracalnych wiązań z cysteiną.

### II-3. Białko L

Białko L, największe z białek powierzchniowych, składa się z białka M oraz dodatkowego N-terminalnego fragmentu, o długości 108-119 aa, kodowanego przez rejon preS1 [9]. Białko L występuje w formie glikoproteiny GP42 lub jako nie glikozylowane białko P39. Charakteryzuje się ono (za wyjątkiem hydrofobowego fragmentu 55-85aa w rejonie preS1) wysoką hydrorafilnością i wysoką zawartością obdarzonych ładunkiem aminokwasów [22]. Samo białko L nie tworzy form sekrecyjnych, prawdopodobnie w związku z przyłączeniem do N-końca, kwasu mirystylowego. Białko L ulega mirystylacji na pierwszej glicynie w sekwencji preS1 [23]. Rejony preS1 wszystkich przedstawicieli rodziny *Hepadna* zawierają N-końcową sekwencję metionina-glicyna niezbędną do procesu mirystylacji. Białko L wywiera istotny wpływ na formowanie i sekrecję cząstki wirusa. Jednak porównanie proliferacji komórek produkujących białko L, w postaci mirystylowanej lub nie (delecja kodonu glicyny), wykazało, że sama mirystylacja nie jest odpowiedzialna za zmiany morfologiczne w błonie RE, związane z zahamowaniem wydzielania cząstek wirusowych [24].

Nadprodukcja polipeptydu L w stosunku do innych białek powierzchniowych hamuje wydzielanie prawidłowych cząstek wirusowych i subwiralnych [25] i indukuje tworzenie cząstek białka L o długości ponad 1000 nm. Są one gromadzone w retikulum endoplazmatycznym, co prowadzi do zwyrodnienia komórek hepatocytarnych transgenicznych myszy [26]. Przypomina to zwyrodnienie typu „matowego szkła”, obserwowane w hepatocytach pacjentów z zakażeniem przewlekłym [27]. Cytolityczny wpływ nadekspresji białka L na hepatocyty stanowi jedyny przykład cytopatyczności HBV. Inne badania wykazują, że nadprodukcją białka L u transgenicznych myszy prowadząca do długotrwałego uszkodzenia komórek, indukuje także proliferację neoplastyczną [28].

Domena preS1 jest najbardziej wyeksponowana na powierzchni otoczki wirusowej. W obrębie sekwencji preS1, pomiędzy 21 i 47 aminokwasem, zidentyfikowano miejsce rozpoznające receptor na powierzchni komórek ludzkiej hepatomy HepG2 [29, 30]. Kolejne

badania wykazały obecność receptorów rozpoznających sekwencję preS1(21-47) również na powierzchni błony plazmatycznej ludzkich hepatocytów [31].

Ze względu na stwierdzoną pozawątrobową replikację HBV, badano także obecność receptorów rozpoznających sekwencję preS1 na powierzchni innych komórek. Receptor dla HBV został zidentyfikowany na powierzchni: limfocytów B, komórek nerwiaka niedojrzałego, owodni i innych linii komórkowych o pochodzeniu pozawątrobowym [32].

Najnowsze badania wykazały, że rejon preS1(21-47) ma zdolność silnego wiązania się z interleukiną 6. Fizjologiczny receptor dla tej cytokiny jest prawdopodobnie także receptorem umożliwiającym HBV wnikanie do komórek docelowych [33].

### II-4. Rola białek powierzchniowych w odpowiedzi immunologicznej

Wszystkie białka powierzchniowe HBV mają własności antygenowe i powodują powstanie przeciwciał. W sekwencji białka S główne epitopy B-komórkowe zidentyfikowano pomiędzy 120-157aa [34]. Antygen HBs ma charakter konformacyjny. Redukcja i alkilacja mostków dwusiarczkowych znacząco redukuje immunogenność HBsAg [13]. Stwierdzono również istotny wpływ oddziaływań lipidowo-białkowych na utrzymanie właściwej struktury antygeny [35]. Antygen HBs wykrywany jest w surowicy po 3-6 tygodniach od zakażenia i w przypadkach kończących się wyleczeniem, utrzymuje się w surowicy do 6 tygodni. U większości chorych przeciwciała przeciw białku S pojawiają się po zniknięciu w surowicy HBsAg i utrzymują się w niskich stężeniach niekiedy do końca życia [6]. Przeciwciała anti-HBs mają charakter ochronny; jest to prawdopodobnie związane z aglutynacją natywnej cząstki HBV przez te przeciwciała, co w konsekwencji prowadzi do maskowania rejonu preS1 odpowiedzialnego za rozpoznawanie receptorów na hepatocytach [29].

Domeny preS1 i preS2 są najbardziej wyeksponowane na powierzchni cząstki wirusowej i mimo braku epitopów o charakterze konformacyjnym odgrywają istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej.

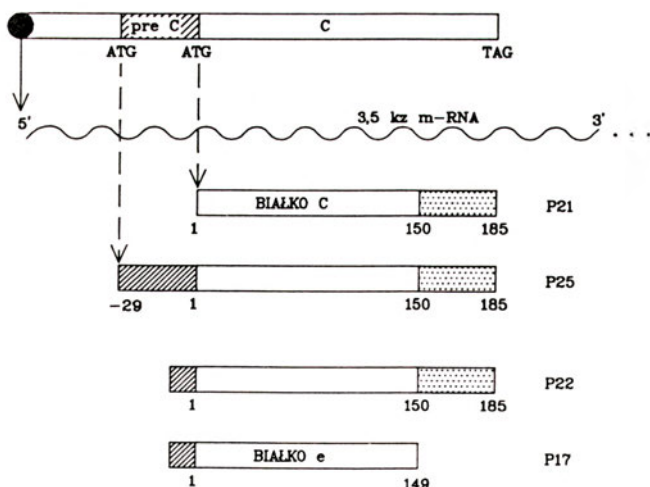
Przeciwciała przeciw preS1 i preS2, mające zdolność neutralizacji wirusa, wytwarzane są we wczesnej fazie infekcji, przed pojawieniem się przeciwciał anti-HBs [36]. Przeciwciała przeciw preS, obecne w surowicach chorych zakażonych HBV, reagują preferencyjnie z syntetycznymi peptydami o sekwencjach: preS1(12-32), preS1(12-47), preS2(120-145), preS2(120-153) [34]. Szczególne znaczenie w neutralizacji HBV mają przeciwciała przeciw sekwencji preS1(21-47), ze względu na możliwość blokowania na cząstce wirusa miejsca wiążącego się z receptorem na powierzchni hepatocytu [37].

Przeciwciała przeciw preS pojawiają się w przebiegu ostrej infekcji HBV dwufazowo [38]. Wczesne prze-

ciwiała wykrywane są w obecności HBsAg i często HBeAg. Ponownie pojawiają się jako późne przeciwciała w fazie zdrowienia, po rozwinięciu HBeAb, a przed pojawieniem się HBsAb. Obecność w surowicy przeciwciał przeciw preS uważana jest za symptom zdrowienia [8, 39]. Wykrywane są one u osób z ostrym, samogojącym przebiegiem wzv B oraz u osób nabywających odporność na HBV. Bardzo rzadko przeciwciała takie pojawiają się w wzv B ewoluującym ku postaci przewlekłej [8].

W przypadku nadostrego wzv B (*hepatitis fulminans*), występuje nadmiernie wysoka, wczesna odpowiedź humoralna na produkty ekspresji rejonów preS1 i preS2 genomu HBV. Ma ona wpływ na wczesny i szybki zanik HBsAg (mimo braku przeciwciał przeciw HBs) oraz powoduje silne uszkodzenie wątroby charakterystyczne dla tego typu przebiegu wzv B [40]. Obecność domeny preS1 i preS2 ma istotny wpływ na immunogenność białka S. Zaobserwowano, że śladowe ilości białka M i L zawarte w szczepionkach pochodzących z plazmy nosicieli (np. Hevac B) wywoływały u biorców znacznie lepszą odpowiedź anti-HBs niż szczepionki typu rekombinacyjnego, zawierające tylko oczyszczone białko S [37]. Wykazano, że obecność determinanty preS1 w materiale stosowanym do immunizacji myszy spowodowała zniesienie braku odpowiedzi na domenę preS2 i S, w wyniku współdziałania preS1-swoistych, pomocniczych komórek T w wytwarzaniu przeciwciał anti-preS2 i anti-HBs [41].

„Porozumiewanie się” kompetentnych komórek prowadzące do powstania przeciwciał przeciw białkom powierzchniowym, odbywa się przy udziale antygenów zgodności tkankowej klasy II. Wykryto, że prezentacja białek powierzchniowych przez limfocyty



Ryc. 2. Schemat ORF preC/C kodujący: główne białko rdzeniowe P21 (gdy proces translacji rozpoczyna się od wewnętrznego AUG) oraz prekursorowe białko P25 (gdy synteza białka rozpoczyna się od pierwszego AUG). P21 i P25 mają taki sam bogaty w argininę 35 aminokwasowy odcinek na C-końcu cząsteczki (obszar zakropkowany) Po hydrolizie N-końcowej sekwencji sygnałowej (obszar zakreskowany) powstaje intermediat P22. W czasie sekrecji hydrolizie ulega C-końcowa część intermediatu, co prowadzi do powstania białka e-P17 (jest to najczęściej heterogenna populacja białek o masach od 15 do 22 kd).

B może w pewnych przypadkach wywoływać bezpośredni atak cytotoksycznych komórek T na limfocyty B. Hamuje to odpowiedź humoralną skierowaną przeciw białkom powierzchniowym, a tym samym eliminację wirusa i może przyczyniać się do rozwoju stanu nosicielstwa [42].

### III. Produkty ekspresji ORF preC/C

Otwarta ramka odczytu genu rdzeniowego zawiera dwa, będące w fazie kodony startu translacji i dzieli ten gen na rejon preC i C (Ryc. 2). Inicjacja translacji od wewnętrznego kodonu AUG prowadzi do powstania głównego białka rdzeniowego P21 [43], stanowiącego antygen HBcAg, lokalizowany w jądrach zakażonych hepatocytów.

Synteza drugiego produktu białkowego ORF preC/C inicjowana jest od pierwszego kodonu AUG i daje w fazie początkowej prekursorowe białko P25. Potranslacyjne zmiany prowadzą w efekcie do powstania, wydzielanego do krwiobiegu HBeAg.

#### III-1. Białko c

Wykrycie białka rdzeniowego poprzedzone było znalezieniem w surowicy nosicieli HBsAg przeciwciał precypitujących z cząstkami powstającymi po usunięciu z powierzchni wirusa płaszcza białkowego [44]. Gen kodujący białko P21 zidentyfikowany został przez ekspresję odpowiedniej ORF w bakteriach *E. coli* [45]. Cząsteczki białka P21 asocjują w cząstkę rdzeniową, w której połączone są z pregenomowym wirusowym RNA, a następnie (po działaniu odwrotnej transkryptazy) z DNA [46]. W skład cząstki rdzeniowej wchodzi 180 monomerów P21.

Za wiązanie białka rdzeniowego z kwasami nukleinowymi odpowiedzialny jest jego C-końcowy fragment o dł. 35aa, zawierający domenę bogatą w argininę. Fragment ten, przypominający swą budowę protaminy, zawiera ośmiopeptydowy tandem Ser-Pro-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Glu [9]. Przypuszcza się, że domena bogata w Arg jest również odpowiedzialna za transport cząstek rdzeniowych do jądra komórkowego, gdzie są one akumulowane [47].

Cząstki rdzeniowe pochodzące z zainfekowanych hepatocytów jak i poddanych działaniu detergentu cząstek Dane'a, wykazują aktywność kinazową [48]. Inkubacja rdzenia wirusowego z  $\gamma^{32}$ ATP, prowadzi do fosforylacji cząstki rdzeniowej w licznych miejscach, w których występują seryna i teonina. Aktywność kinazową wykazują również cząstki rdzeniowe, będące produktami rekombinacji [49].

#### III-2. Białko e

W surowicy nosicieli HBsAg odkryta została, również rozpuszczalna, sekrecyjna forma białka rdzeniowego HBeAg [50]. Prace mające na celu ekspresję całej

rdzeniowej ORF, wykazały pojawianie się w hepatocytach pierwotnego produktu translacji, w postaci białka P25, prekursora cząstek HBeAg [51]. Wykazano więc, że HBcAg i HBeAg pochodzą z dwóch różnych produktów translacji: P21 dla HBcAg i P25 dla HBeAg.

Sekwencja kodowana przez rejon preC stanowi sekwencję sygnałową. Zawiera dodatkowo naładowane aminokwasy na N-końcu, a za nimi grupę 10 aminokwasów hydrofobowych, przy czym znamieny jest konserwatywny ewolucyjny 29aa tego rejonu u wszystkich wirusów *Hepadna*. Pierwotny produkt translacji rejonu preC/C, białko P25 ulega, dzięki sekwencji sygnałowej, translokacji do błon retikulum endoplazmatycznego [43]. Po proteolitycznym usunięciu 19aa z sekwencji sygnałowej, obserwuje się pojawianie transmembranowego białka P22 [51]. Dalsze proteolityczne trawienie bogatej w argininę domeny C-końcowej prowadzi do powstawania cząstek o masach od 15kd do 22kd (przeważająca część o masie 17 kd), które są wydzielane do krwioobiegu. Białko P25 nie bierze udziału w tworzeniu HBcAg, może natomiast przejść serię proteolitycznych degradacji i powrócić z RE do cytoplazmy, a nawet do jądra [46].

Uważa się, że proces dojrzewania cząstek HBeAg, może być związany z działaniem proteiny aspartylowej. Zwraca uwagę podobieństwo białka rdzeniowego do centrum katalitycznego proteiny aspartylowej [52]. Stwierdzono wpływ inhibitora tego enzymu, na zahamowanie wydzielania cząstek HBeAg w hodowli komórkowej przy jednoczesnym gromadzeniu wewnątrzkomórkowych intermedatów HBeAg [53].

### III-3. Rola białek rdzeniowych w rozwoju wirusowego zapalenia wątroby typu B

Białka rdzeniowe HBcAg i HBeAg są głównym celem dla cytotoxycznych komórek T. Komórki te rozpoznają szereg różnych epitopów występujących pomiędzy 1 i 140 aminokwasem w sekwencji białka C [54]. Podobieństwo strukturalne HBcAg i HBeAg powoduje, że wykazują one krzyżową reaktywność na poziomie komórek T. Limfocyty T swoiste dla HBcAg rozpoznają liczne miejsca w obrębie sekwencji HBcAg oraz HBeAg [54]. Oprócz białek rdzeniowych odpowiedź ze strony cytotoxycznych komórek T wywołują także białka powierzchniowe i białko X. Jak w wielu innych infekcjach wywoływanych przez wirusy (grypa, odra, mononukleozą itp.) antygeny wirusowe rozpoznawane są na powierzchni zakażonych komórek tylko w połączeniu z antygenami zgodności tkankowej klasy I [55]. Prawidłowa odpowiedź immunologiczna w rozwoju wzv B obejmuje cytotoxiczne działanie limfocytów T prowadzące do eliminacji zakażonych hepatocytów eksponujących na swej powierzchni obce antygeny. Zaburzenie takiej odpowiedzi prowadzi do przetrwania wirusa i rozwoju zakażenia przewlekłego. Przyczyną nieprawidłowej odpowiedzi zakażonego or-

ganizmu może być kilka. Nadmiar krążących przeciwciał anty-HBc i ich wiązanie się z powierzchnią hepatocytów, może maskować wyeksponowane tam antygeny rdzeniowe przed działaniem cytotoxycznych komórek T i przedłużać obecność HBV [56]. Brak ekspresji antygenów HLA I na powierzchni hepatocytów może uniemożliwiać prezentację antygenów wirusowych. W typowym o ostrym przebiegu zapalenia wątroby typu B gęstość HLA I we wczesnym etapie infekcji wzrasta pod wpływem podwyższonej produkcji  $\alpha$ -interferonu [57] oraz transaktywującego działania HBxAg na geny HLA I [58]. W zakażeniu o charakterze przewlekłym często obserwuje się zahamowanie produkcji interferonu [59, 60].

Mimo, że HBcAg jest wewnętrzną komponentą wirusa, przeciwciała przeciw HBc produkowane są w wysokich stężeniach przez większość chorych [61]. Badania mające na celu lokalizację epitopów B-komórkowych wykazały obecność na powierzchni HBcAg pojedynczej, konformacyjnej determinanty pomiędzy 78-85aa (nakłada się na nią liniowa determinanta HBeAg). Dodatkowy B-komórkowy epitop wykryto w obrębie bogatej w Arg C-końcowej części białka [62].

Cząstka rdzeniowa, w której 180 identycznych podjednostek białka p21 otacza pregenomowe RNA lub DNA, jest niezwykle efektywnym immunogenem, nie wymagającym współdziałania pomocniczych komórek T [63]. Własności te, będące prawdopodobnie wynikiem regularnego rozmieszczenia w określonych odległościach identycznych epitopów, wykorzystywane są do efektywnej prezentacji immunologicznej obcych epitopów. Utworzone przy użyciu technik rekombinacyjnych białka fuzyjne złożone z heterogenego epitopu i białka rdzeniowego zachowują zdolność do formowania cząstek o regularnej budowie, o ile zachowane zostaną w tej „konstrukcji” 144 N-końcowe aminokwasy białka p21. Uzyskano w ten sposób podobne do rdzeniowych cząstki eksponujące na całej powierzchni epitopy: transmembranowego białka gp41 wirusa HIV-1 [64], białka otoczki wirusa FMDV [65], białka p24 wirusa HIV-1 [66] oraz wielu innych ważnych z klinicznego punktu widzenia białek.

Nie zaobserwowano bezpośredniego wpływu cząstek HBeAg na replikację czy dojrzewanie wirusa, nie mniej ich obecność we krwi jest ściśle skorelowana z aktywną replikacją HBV. W praktyce diagnostycznej dłuższa niż 10-tygodniowa obecność HBeAg w surowicy jest symptomem rozwoju zakażenia przewlekłego. Natomiast serokonwersja w układzie HBe występująca w normalnym, ostrym, przebiegu wzv B jest skorelowana z eliminacją krążących cząstek HBV [67].

U dzieci, których matki są nosicielami HBV, wczesny kontakt z HBeAg może być (obok niedojrzałości limfocytów cytotoxycznych, obecności w surowicach czynników immunosupresyjnych oraz matczynych IgG anty-HBc) przyczyną rozwoju zakażenia o charakterze przewlekłym. Przenikający przez łożysko 12 aminokwasowy fragment antygeny HBe wywołuje

stan tolerancji T-komórkowej u dziecka i umożliwia dalszą obecność wirusa [68].

Istotną rolę w patogenezie zakażenia HBV mają także zmutowane szczepy wirusa zapalenia wątroby typu B. Najczęściej opisywane są przypadki zakażenia szczepem „e-minus” [69, 70], który ma defektywny fragment w rejonie genu preC i nie syntetyzuje HBeAg. W 90% przypadków mutacja ta (substytucja G → A) związana jest z powstaniem kodonu stop (TAG) w dystalnej części rejonu preC. Mutanty związane z defektywnym rejonem genu preC są ściśle skorelowane z rozwojem nadostrego zapalenia wątroby *hepatitis fulminans* [71]. W normalnym przebiegu wzv B rozpuszczalny antygen HBeAg wydzielany jest do krwioobiegu gospodarza i działa jak modulator immunologiczny łagodzący atak cytotoksycznych komórek T na zakażone hepatocyty [58]. W przypadku współzakażenia szczepem „dzikim” i szczepem zmutowanym, gdy mutant „e-minus” zaczyna dominować w rozwoju zakażenia, poziom HBeAg zmniejsza się, zanika efekt immunomodulacji i dochodzi do gwałtownego, postępującego uszkodzenia wątroby. U pacjentów z *hepatitis fulminans* wykrywa się także mutację w obrębie genu C. Polega ona w 50% przypadków na zamianie C-końcowej seryny na prolinę [72], a w konsekwencji do zahamowania fosforylacji białka rdzeniowego i dojrzewania cząstek wirusa [73]. Pozostający w komórce nadmiar HBeAg, eksponowany jest na powierzchni hepatocytów i powoduje gwałtowną odpowiedź ze strony cytotoxicznych komórek T.

Również w zakażeniach o charakterze przewlekłym wykrywa się szczepy zmutowane w rejonie preC/C [74, 75]. Pojedyncza substytucja aminokwasu zmienia determinantę antygenową i powoduje, że wirus staje się „niewidoczny” dla systemu odpornościowego gospodarza. W czasie rozwoju zapalenia przewlekłego zwiększa się heterogenność populacji wirusowej, dochodzi przy tym do akumulacji mutantów produkujących antygeny rdzeniowe ze zmienionymi epitopami T-komórkowymi. Mutacje te są następstwem presji immunologicznej wywieranej na szczep „dziki” i „strategii” HBV uciekającego przed mechanizmami obronnymi gospodarza.

#### IV. Uwagi końcowe

Poznanie budowy molekularnej oraz własności immunologicznych białek HBV pozwoliło częściowo wyjaśnić rolę, jaką odgrywają one w rozwoju zapalenia wątroby typu B.

Badania kliniczne potwierdzają, że sam czynnik etiologiczny, jego replikacja i poziom ekspresji genów nie wywołują pierwotnego efektu cytopatycznego. Stopień uszkodzenia wątroby i przebieg kliniczny choroby zależą od nasilenia odpowiedzi immunologicznej zakażonego organizmu. Skuteczna odpowiedź organizmu uwarunkowana jest przez:

- 1) osobniczą heterogenność białek HLA,

- 2) zwiększenie ekspresji HLA we wczesnej fazie zakażenia HBV,

- 3) odpowiedni poziom cytokin (INT, I1-2, TNF).

Różne czynniki takie jak: maskujące działanie przeciwciał anti-HBc, stan immunosupresji, współzakażenia wirusem atakującym bezpośrednio immunocyty (odra, różyczka, cytomegalowirus, HIV), zakażenie zmutowanym szczepem HBV i wiele innych mają istotny wpływ na rozwój nieadekwatnej odpowiedzi immunologicznej uniemożliwiającej eliminację HBV.

Szereg zagadnień związanych z mechanizmem patogenezy wzv B pozostaje niewyjaśnionych. Z pewnością lepsze poznanie oddziaływań pomiędzy HBV i zakażonym organizmem pozwoli zrozumieć ten skomplikowany proces i umożliwi rozwój efektywnych metod leczenia i profilaktyki wzv B.

Artykuł otrzymano 16 marca 1994 r.  
Zaakceptowano do druku 26 maja 1994 r.

#### Piśmiennictwo

1. Shapiro C N, Margolis H S (1990) *Epidemiologi Reviews* 12: 221-227
2. Gerber M A, Thung S N (1985) *Lab Invest* 52: 572-590
3. Thomas H (1990) *Springer Semin Immunopath* 12: 1-3
4. Alberti A, Gerlich W H, Heermann K - H, Pontisso (1990) *Springer Semin Immunopath* 12: 5-23
5. Sylan S P E (1991) *Liver* 11: 1-23
6. Heerman K M, Kruse F, Seifer M, Gerlich W H (1987) *Intervirol* 28: 14-25
7. Gerlich W H, Heermann K - H, Xuanyong L (1992) *Arch Virol* 54: 129-132
8. Heerman K H, Gerlich W H (1989) *Rheumatol Intern* 9: 167-173
9. Tiollais P, Pourcel Ch, Dejean A (1985) *Nature* 317: 489-495
10. Bancroft W H, Mundon F K, Russell P K (1972) *J Immunology* 109: 842-848
11. Nordenfelt E, Le Bouvier G (1974) *Intervirol* 2: 65-74
12. Okamoto H, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M (1987) *Bioch and Bioph Res Commun* (1987) 148: 500-504
13. Neurath A R, Thanavala Y (1990) red M H V Van Regenmortel, A R Neurath, Elsevier Science Publishers B V 403-458
14. Mangold C M T, Streeck R F (1993) *J Virol* 67: 4558-4597
15. Peters M, Vierling J, Gershwin M E, Milich D, Chisari F V, Hoofnagle J H (1991) *Hepatology* 13: 977-994
16. Stibbe W, Gerlich W H (1983) *J Virol* 46: 626-628
17. Neurath A R, Kent S B H, Strick N, Parker K (1988) *Ann Inst Pasteur Vir* 139: 13-38
18. Theilmann L, Goeser T (1991) *Hepato-Gastroenterology* 38: 10-13
19. Machida A, Kishimoto S, Ohnuma N, Baba K, Itoh Y, Miyamoto H, Funatsu G (1984) *Gastroenterology* 86: 910-918
20. Pontisso P, Ruvoletto M G, Gerlich W H, Heermann K H, Bardini R, Alberti A (1989) *Virology* 173: 522-530
21. Krone B, Lenz A, Heermann K H, Seifer M, Xuanyong L, Gerlich W H (1990) *Hepatology* 6: 1050-1056
22. Heermann K H, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten M, Gerlich W H (1984) *J Virol* 52: 396-402
23. Persing D H, Varmus H E, Ganem D (1987) *J Virol* 61: 1672-1677

24. Biemans R, Thines D, Rungers T, De Wilde M, Cabenzon T (1991) *DNA and Cell Biology* 3: 191-200
25. Persing DH, Varmus HE, Ganem D (1986) *Science* 234: 1388-1395
26. Chisari FV, Filippi P, Buras J, McLachlan A, Poper H, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster R L (1987) *Proc Natl Acad Sci* 84: 6909-6913
27. Stein O, Fainaru M, Stein Y (1972) *Lab Invest* 26: 262-269
28. Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinnelli C, Dunsford HA, Sell S, Pinkert CA, Brinster RL, Palmiter RD (1987) *Cell* 59: 1145-1156
29. Neurath AR, Kent SBH, Strick N (1986) *Cell* 46: 429-436
30. Petit MA, Dubanchet S, Campel F, Voet P, Dangenet Ch, Hansen P (1991) *Virology* 180: 483-491
31. Pontisso P, Ruvoletto MG, Gerlich WH, Heermann KH, Bardini R, Alberti A (1989) *Virology* 173: 522-530
32. Neurath A R, Strick N, Sproul P, Ralph HE, Valinsky J (1990) *Virology* 176: 448-457
33. Neurath AR, Strick N, Sproul Ph (1992) *J Exp Med* 175: 461-469
34. Neurath AR, Strick N, Kent SBH (1986) *Vaccines* 4: 371-375
35. Gavilanes F, Gomes-Gutteries J, Aracil M, Gonzales-Ross JM, Ferragut JA, Guerro E, Peterson DR (1990) *Biochem J* 265: 857-864
36. Gerlich WH, Deepeh R, Heerman KH, Krone B, Lu X-Y, Seifer M, Thomssen R (1990) *Vaccines* 8: 63-68
37. Neurath AR, Strick N, Kent SBH, Parker K, Seto B, Givard M (1988) *Vaccines* 6: 229-234
38. Budkowska A, Dubreuil P, Maillard P, Poynard T, Pillot J (1990) *Hepatology* 6: 1271-1277
39. Ibarra MZ, Mara I, Bartolome J, Porres JG, Carreno V (1989) *Liver* 9: 153-158
40. Sinclair S, Wakefield A, Ley G (1990) *Springer Semin Immunopath* 12: 33-45
41. Milich DR, McLachlan A, Thorton GB (1987) *Vaccines* 5: 50-55
42. Barnaba V, Franco A, Alberti A, Benvenuto R, Balsano F (1990) *Nature* 345: 258-260
43. Ou J, Laub O, Rutter WJ (1986) *Proc Natl Acad Sci* 83: 1578-1582
44. Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ (1971) *Lancet* 2: 1225-1227
45. Pasek M, Goto T, Gilbert W, Zink B, Schaller H, McKay P, Leadbetter G, Murray K (1979) *Nature* 282: 575-579
46. Garcia PD, Ou JH, Rutter WJ, Walter P (1988) *J Cell Biol* 106: 1093-1104
47. Yeh Ch T, Liaw YF, Ou JH (1990) *J Virol* 64: 6141-6147
48. Gerlich WH, Goldman U, Muller R, Stibbe W, Wolff W (1982) *J Virol* 42: 761-766
49. Lanford RE, Notbvall L (1990) *Virology* 176: 222-233
50. Magnusius LO, Espmark JA (1972) *J Immunol* 109: 1017-1021
51. Bruss V, Gerlich WH (1988) *Virology* 163: 268-275
52. Miller RH (1987) *Science* 236: 722-725
53. Jean-Jean O, Lerrero M, Will M, Perricandet M, Resignol JM (1989) *Virology* 170: 99-106
54. Milich DR, McLachlan A, Moriarty A, Thornton GB (1987) *J Immunology* 139: 1223-1231
55. Bertoletti A, Ferrari C, Fiaccadori F, Penna A, Margolskee R, Schlicht HJ, Flower P, Guilhot S, Chisari FV (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10445-10449
56. Oldstone MBA, Lampert PW (1979) *Springer Semin Immunopathol* 2: 261-264
57. Pignatelli M, Waters J, Brown J, Lever A, Iwarson S, Schlaff Z, Gerety R (1986) *Hepatology* 6: 349-353
58. Zhou D-X, Taraboulos A, Ou J-H, Yen B (1990) *J Virol* 64: 4025-4028
59. Twu JS, Lee CH, Lin PM, Schloemer RH (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 252-256
60. Onji M, Lever AML, Thomas HC (1989) *Hepatology* 9: 92-96
61. Milich DR (1987) *Immunological Reviews* 99: 71-103
62. Machida A, Ohnuma H, Takai E, Tsuda F, Tanaka T, Naito M, Munekata E, Miyakawa Y, Mayumi M (1989) *Mol Immunol* 26: 413-421
63. Milich DR, McLachlan A (1986) *Science* 234: 1398-1401
64. Borisowa GP, Berzins I, Pushko PM, Pumpen P, Gren EJ, Tsibinogin VV, Loseva V, Ose V, Ulrich R, Siakkon H, Rosentha HA (1989) *FEBS Lett* 259: 121-124
65. Beesley KM, Francis MJ, Clarke BE, Beesley JE, Dopping-Hepenstal PJC, Clare JJ, Brown F, Romanos MA (1990) *Biotechnology* 8: 644-649
66. Ulrich R, Borisowa GP, Green E, Berzin I, Pumpen P, Eckert R, Ose V, Siakkou H, Gren EJ, von Baehr R, Kruger DH (1992) *Arch Virol* 126: 321-328
67. Castillo J, Bartolome J, Quiroga JA, Porves JC, Ravveno V (1990) *Liver* 10: 79-84
68. Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Price J, Raney AK, McLachlan A (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6599-6603
69. Ulrich PP, Bhat RA, Kelly I, Brunetto MR, Bonino F, Vyas GN (1990) *J Med Virol* 32: 109-118
70. Tong P-S, Li J-S, Vitviski L, Trepo C (1992) *Virology* 191: 237-245
71. Carmann WF, Fagan EA, Hadziyannis S, Karayoannis P, Tassopoulos NC, Williams R, Thomas HC (1991) *Hepatology* 14: 219-222
72. Uchida T (1993) *Microbial Immunol* 37: 425-439
73. Rossinck MJ, Siddigui A (1987) *J Virol* 61: 955-961
74. Kaneko S, Miller RH (1989) *J Infect Dis* 160: 903-904
75. Wakita T, Kakumu S, Shibata M, Yoshioka K, Ito Y, Shinagawa T, Takayanagi M, Morshima T (1991) *J Clin Invest* 88: 1793-1801

## 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”.

# Mechanizmy śmierci programowanej komórek (apoptozy)

## Mechanisms of the programmed cell death (apoptosis)

EWA SIKORA\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Znaczniki apoptozy
  - II-1. Morfologia komórki apoptotycznej
  - II-2. Synteza białka i mRNA
  - II-3. Endonukleazy i fragmentacja DNA
  - II-4. Inne enzymy
- III. Przekazywanie sygnału do apoptozy
  - III-1. Aktywacja receptora TCR
  - III-2. Rola receptorów glukokortykoidowych
  - III-3. cAMP i indukcja apoptozy
  - III-4. Czynniki nekrozy nowotworu (TNF)
  - III-5. Wolne rodniki tlenowe
  - III-6. Niedobór czynników wzrostowych
  - III-7. Udział wapnia w przekazywaniu sygnału do apoptozy
- IV. Geny indukowane w komórkach stymulowanych do apoptozy
- V. Udział protoonkogenów i onkogenów w apoptozie
- VI. Rola *p53* w apoptozie
- VII. Hamowanie apoptozy
- VIII. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** TNF — czynnik nekrozy nowotworu; TCR — receptor komórek T; ConA — konkanawalina A; PHA — fitohemaglutynina; GR — receptor glukokortykoidowy; GRE — sekwencja DNA wiążąca receptory glukokortykoidowe; PKA — kinaza białkowa zależna od cAMP; PKC — kinaza białkowa C.

### I. Wstęp

Śmierć komórek zwana nekrozą (martwicą) znana jest od bardzo dawna. Zachodzi ona pod wpływem bardzo różnorodnych czynników mechanicznych, fizycznych, chemicznych i biologicznych, które prowadzą do natychmiastowego (w ciągu kilku minut) uszkodzenia błony komórkowej i organelli, w tym również struktur jądrowych. Cały proces nekrozy może trwać zaledwie kilkanaście minut. Zawartość komórki nekrotycznej wydostaje się na zewnątrz powodując reakcję obronną organizmu w postaci stanu zapalnego. Rzadko kiedy nekroza ogranicza się do pojedynczych komórek; na ogół proces ten dotyczy dużej części tkanki [1, 2].

Śmierć komórek może jednak być, podobnie jak ich podziały, procesem aktywnym, charakteryzującym się indukcją genów i sekwencją pewnych zdarzeń bio-

### Contents:

- I. Introduction
- II. Markers of apoptosis
  - II-1. Morphology of apoptotic cell
  - II-2. mRNA and protein synthesis
  - II-3. Endonucleases and DNA fragmentation
  - II-4. Other enzymes
- III. Cellular signaling in apoptosis
  - III-1. T cell receptor (TCR) activation
  - III-2. Role of glucocorticoid receptors
  - III-3. cAMP and induction of apoptosis
  - III-4. Tumor necrosis factor (TNF)
  - III-5. Free oxygen radicals
  - III-6. Growth factors deprivation
  - III-7. Calcium and cellular transduction to apoptosis
- IV. Genes induced in cells stimulated to undergo apoptosis
- V. Role of protooncogenes and oncogenes in apoptosis
- VI. Role of *p53* in apoptosis
- VII. Inhibition of apoptosis
- VIII. Concluding remarks

chemicznych. Nazywana jest wtedy śmiercią fizjologiczną, programowaną, samobójczą lub najczęściej apoptozą (z greckiego opadanie płatków) [1, 3]. Terminów tych naogół używa się zamiennie, aczkolwiek coraz częściej termin apoptoza rezerwuje się wyłącznie do opisu charakterystycznych zdarzeń, jakie mają miejsce podczas wielu, choć nie wszystkich przypadków naturalnej, nieprzypadkowej, śmierci komórki. Ponieważ artykuł niniejszy stanowi próbę opisu mechanizmów aktywnej śmierci, autorka świadomie rezygnuje z dociekań terminologicznych używając wszystkich przedstawionych wyżej terminów jako synonimów naturalnej śmierci komórki.

Śmierć programowana zachodzi w procesie embriogenezy, morfogenezy, podczas wymiany komórek w tkankach proliferujących, takich jak np. skóra, czy nabłonki [1]. Ponad 90% komórek umiera podczas dojrzewania tymocytów w grasicy i komórek krwiotwórczych w szpiku kostnym [4]. Śmierć komórek jest niezbędna do utrzymania prawidłowej homeostazy organizmu. Również komórki nowotworowe umierają śmiercią samobójczą spontanicznie, a także pod wpływem promieniowania jonizującego i cytostatyków [5, 6]. Z apoptozą komórek nerwowych mamy prawdopodobnie do czynienia w procesach patologicznych takich jak choroba Alzheimera [7, 8]. Także limfocyty CD4<sup>+</sup> u ludzi chorych na AIDS umierają poprzez apoptozę [9, 10].

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



Apoptoza bardzo często dotyczy pojedynczych komórek i w odróżnieniu od nekrozy nie wywołuje stanu zapalnego, gdyż komórka rozpada się na tzw. ciała apoptotyczne, które są natychmiast trawione przez makrofagi lub sąsiadujące komórki (Ryc. 1). Apoptoza może trwać od kilku godzin do kilku dni [11].

Mechanizmom śmierci komórek do niedawna poświęcano znacznie mniej uwagi niż regulacji podziałów komórkowych, choć wydaje się, że obydwa procesy są równie złożone. Niemniej jednak w ciągu ostatnich kilku lat obserwujemy prawdziwą eksplozję badań dotyczących śmierci komórek. Świadczy o tym chociażby ilość prac przeglądowych jakie nieustannie się pojawiają [np. 2, 12-18].

## II. Znaczniki apoptozy

Komórki apoptotyczne poza specyficzną morfologią, charakteryzują się pewną sekwencją genetycznych i biochemicznych zdarzeń w nich zachodzących (Ryc. 1). Coraz więcej jednak badań wskazuje na różnorodność morfologicznego i biochemicznego oraz genetycznego obrazu śmierci komórki. Dlatego mówiąc o znacznikach apoptozy powinniśmy pamiętać, że nie zawsze w umierającej komórce występują one wszystkie naraz.

## II-1. Morfologia komórki

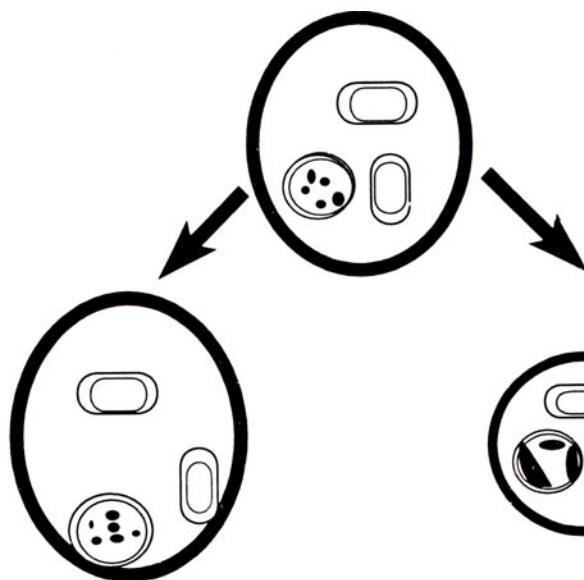
Morfologia komórki umierającej różni się w zależności od tego, czy mamy do czynienia ze śmiercią nekrotyczną, czy też samobójstwem komórki. Komórki nekrotyczne w początkowej fazie procesu są napęczniałe, a ich chromatyna tworzy agregaty. W kolejnej fazie następuje rozerwanie błony i całkowita dezintegracja struktur komórkowych. Natomiast komórki apoptotyczne są obkurczone, a chromatyna skondensowana w obrębie błony jądrowej. Z czasem błona komórkowa i błona jądrowa tworzą uwypuklenia odrywające się od komórki w postaci wyżej wspomnianych ciałek apoptotycznych, w których uwiecznione są morfologicznie niezmiennione organella komórkowe i chromatyna. Komórka wygląda jakby pączkowała [1].

## II-2. Synteza białka i mRNA

Śmierć programowana komórki jest procesem aktywnym. Wskazuje na to jej hamowanie przez inhibitory mRNA i białka. I tak, zarówno u owadów jak i płazów w czasie morfogenezy [19, 20] spontaniczną apoptozę hamowała aktynomycyna D (inhibitor syntezy mRNA), jak też cykloheksomid (inhibitor syntezy białka). Opóźnienie lub zahamowanie apoptozy przez

## Nekroza

- komórka napęczniała
- organella uszkodzone
- chromatyna uszkodzona

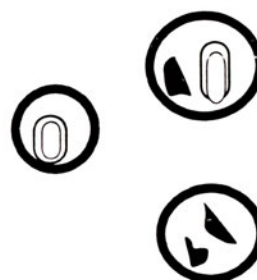


- liza komórki
- destrukcja organelli
- destrukcja chromatyny

## Fagocytoza Stan zapalny

## Apoptoza

- komórka obkurczona
- organella nieuszkodzone
- marginalizacja chromatyny



- tworzenie się ciałek apoptotycznych
- organella nienaruszone
- chromatyna pofragmentowana

## Fagocytoza

Ryc. 1. Schemat morfologicznych zmian komórki nekrotycznej i apoptotycznej.

inhibitory syntezy makrocząsteczek obserwowano także w wielu komórkach stymulowanych do apoptozy. Były to m.in. tymocyty traktowane deksametazonem (syntetyczny glukokortykoid) [21], limfocyty napromieniowane promieniami gamma oraz komórki limfoidalne i białaczkowe stymulowane do apoptozy poprzez aktywację receptora komórkowego T (TCR) [22-25]. Podobnie, zahamowanie syntezy mRNA i białka chroniło przed śmiercią komórki nerwowe hodowane *in vitro* bez czynników wzrostowych [26]. Jednakże opisywano również komórki stymulowane do apoptozy, w których inhibitory syntezy mRNA i białka nie hamowały ich śmierci [27], jak również takie, w których inhibitory syntezy makrocząsteczek wręcz indukowały apoptozę [28]. Świadczy to o wielkiej różnorodności mechanizmów prowadzących do nieprzypadkowej śmierci komórki.

### II-3. Endonukleazy i fragmentacja DNA

Do jednej z bardziej charakterystycznych cech komórek apoptotycznych należy obecność w nich DNA pofragmentowanego na odcinki stanowiące wielokrotność nukleosomów (180-200 par zasad) [1, 29]. Fragmentacja DNA stanowi prawdopodobnie pierwszy nieodwracalny etap apoptozy, choć obserwowany nie we wszystkich komórkach wykazujących morfologiczne cechy tego procesu [30, 31]. Za fragmentację DNA odpowiedzialna jest aktywacja endonukleaz, katalizujących rozerwanie wiązań internukleosomalnych [32, 33]. Jak dotychczas nie zidentyfikowano specyficznej nukleazy odpowiedzialnej za fragmentację DNA w komórkach ulegających apoptozie, choć bierze się pod uwagę trzy enzymy: NUC-18, DNAzę I, DNAzę II [34]. Aktywatorami dwóch pierwszych enzymów są jony wapnia i magnezu, a inhibitorami są jony cynku. W przypadku DNAzy II nie wykazano wpływu tych jonów na jej aktywność [34, 35].

Obecność pofragmentowanego DNA stanowi podstawę większości metod stosowanych do identyfikacji komórek umierających poprzez apoptozę. Jedną z najprostszych i najczęściej stosowanych jest elektroforeza DNA w żelu agarozowym [29]. Fragmenty o wielokrotności nukleosomów dają w żelu obraz charakterystycznej „drabinki”. Coraz częściej do badania komórek apoptotycznych wykorzystuje się szereg metod z zastosowaniem cytofluorometrii przepływowej. Większość nich opiera się na wykrywaniu komórek ze zdegradowanym DNA. Komórki apoptotyczne charakteryzują się zmniejszoną barwliwością DNA, co widać jako dodatkową populację komórek o mniejszej zawartości DNA niż komórki w fazie spoczynkowej [29, 36].

### II-4. Inne enzymy

Dotychczas poza endonukleazami zidentyfikowano kilkanaście enzymów, których aktywność wzrasta

w komórkach apoptotycznych.

Bardzo ważną rolę w apoptozie przypisuje się transglutaminazom tkankowym, których aktywność przyczynia się do powstania usieciowań ciałek apoptotycznych poprzez tworzenie krzyżowych wiązań pomiędzy białkami z udziałem  $\epsilon(\gamma\text{-glutamilo})\text{lizyny}$  [37, 38].

Ponadto w różnych komórkach obserwowano wzrost aktywności między innymi takich enzymów jak gamma-glutamilo transpeptydazy, rybonukleazy, aktywatora plazminogenu [15].

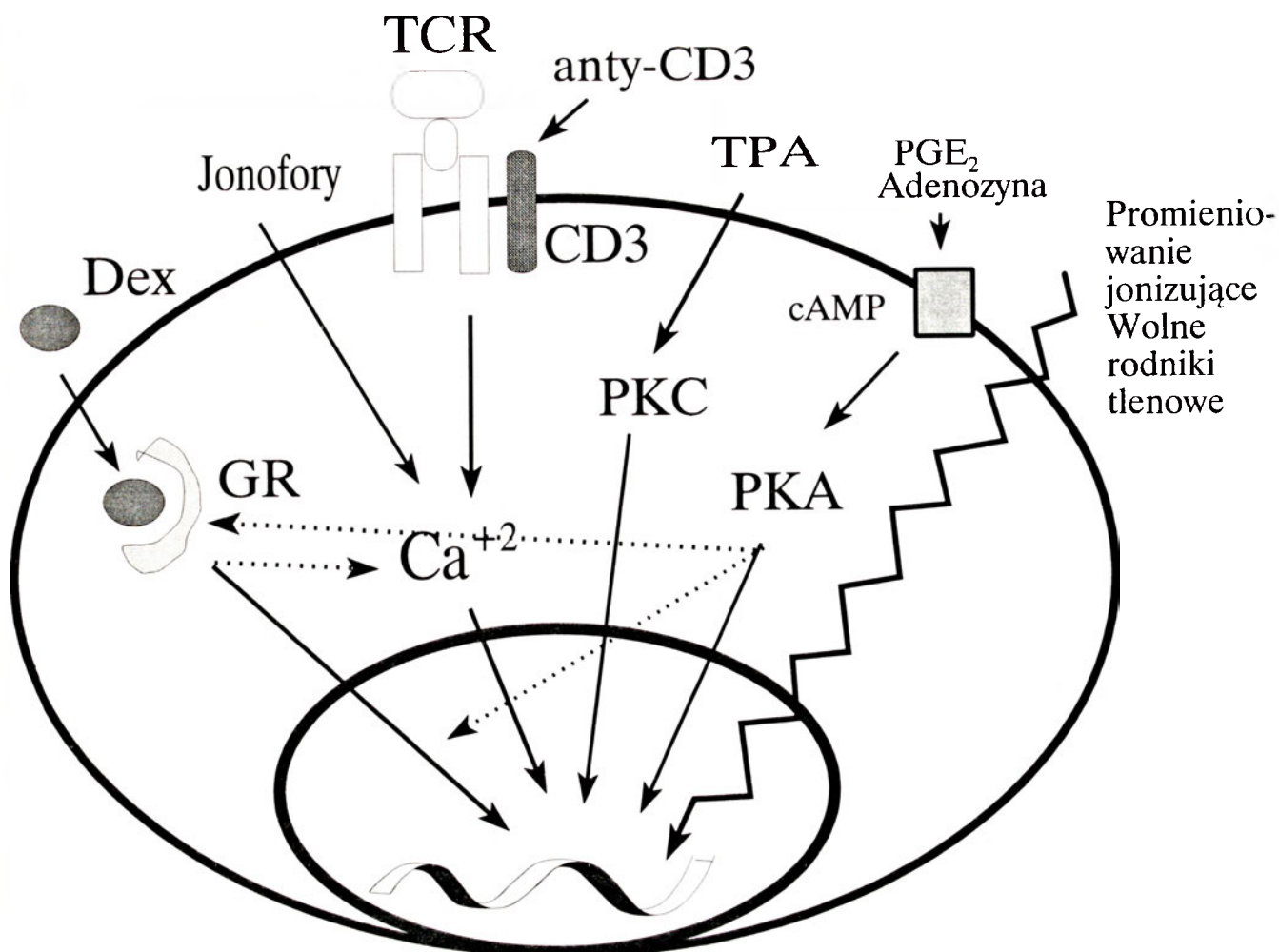
## III. Przekazywanie sygnału do apoptozy

Apoptozę może wywołać bardzo wiele różnorodnych czynników, zarówno (i) fizycznych takich jak różnego rodzaju promieniowanie, szok zimny i ciepły, (ii) chemicznych jak różne cytostatyki, wolne rodniki tlenowe, oraz (iii) biologicznych jak glukokortykoidy, czynnik martwicy nowotworu (TNF), przeciwciała anty Fas/APO-1, czy niedobór czynników wzrostowych. Wyczerpujący zestaw czynników wywołujących śmierć programowaną znajdzie czytelnik w pracy przeglądowej Sen'a [15]. Często te same czynniki wywołują również nekrozę. O tym czy komórka ulegnie przypadkowej śmierci, czy uruchomi program apoptozy decyduje (i) rodzaj czynnika indukującego śmierć (np. TNF wywołuje zarówno apoptozę jak i nekrozę) (ii) długość ekspozycji komórek i dawka czynnika stymulującego śmierć, jak to ma miejsce w przypadku różnych cytostatyków, lub w końcu (iii) typ komórek stymulowanych do śmierci [39, 40].

Niestety, ciągle niewiele jeszcze wiadomo na temat dróg przekazywania sygnałów komórkowych prowadzących do uruchomienia programu apoptozy. Z pewnością są one bardzo różnorodne tak jak czynniki wywołujące śmierć komórki. Stosunkowo najwięcej wiadomo na temat przekazywania sygnału do apoptozy w komórkach limfoidalnych. Są to komórki, które można doświadczalnie zastymulować do śmierci poprzez aktywację receptorów błonowych takich jak TCR, czy Fas/APO-1, receptorów cytosolowych takich jak glukokortykoidowe, jak również poprzez uszkodzenia DNA czy jonofory wapniowe. Niektóre z dróg aktywacji tymocytów do apoptozy pokazano na rycinie 2.

### III-1. Aktywacja receptora TCR

TCR (*T cell receptor*) jest receptorem tyrozynowym składającym się z kilku łańcuchów białkowych w tym łańcucha CD3. Dojrzałe limfocyty T rozpoznają obce antygeny poprzez specyficzne receptory TCR. Stymulacja tych receptorów, podobnie jak działanie plejotropowych czynników mitogennych, takich jak konkanawalina A (ConA) i fitohemaglutynina (PHA), prowadzi do wzrostu stężenia wapnia cytosolowego, syntezy interleukiny-2 i proliferacji komórek [4, 40a]. Paradoksalnie z pozoru, pobudzenie receptora TCR



Ryc. 2. Schemat dróg przekazywania sygnału do apoptozy stymulowanej w tymocytach przez różne czynniki. Dex — deksametazon; GR — receptor glukokortykoidowy; TCR — receptor komórek T; TPA — estry forboli; PGE<sub>2</sub> — prostaglandyna; PKC — kinaza białkowa C; PKA — kinaza białkowa A.

np. przez przeciwciało anti CD3, jak również stymulacja tymi samymi czynnikami mitogennymi takimi jak Con A czy PHA, ale niedojrzałych limfocytów (tymocytów), a także komórek mieszańcowych wywołuje śmierć poprzez apoptozę [23, 41, 42]. Tak więc ten sam początkowy sygnał może prowadzić, w zależności od stopnia zróżnicowania komórki na którą działa, do tak skrajnie różnych efektów jakie stanowią śmierć i podziały komórkowe.

### III-2. Rola receptorów glukokortykoidowych

Glukokortykoidy są hormonami sterydowymi produkowanymi w korze nadnerczy. Ich immunosupresyjne i przeciwnowotworowe działanie jest znane i wykorzystywane od dawna [43-45]. Niedojrzałe limfocyty T indukowane są do apoptozy poprzez glukokortykoidy już w fizjologicznych stężeniach [49]. Traktowanie glukokortykoidami zarówno ludzkich [46] jak i mysich [47, 48] komórek nowotworowych pochodzących od limfocytów T prowadzi do ich śmierci, nieraz w ciągu zaledwie kilku godzin od dodania do pożywki hormonu [50]. Obwodowe limfocyty T są całkowicie odporne na działanie glukokortykoidów [51].

Glukokortykoidy pełnią swoją biologiczną funkcję poprzez reakcję ze specyficznym wewnątrzkomórkowym receptorem zwanym w skrócie GR [52]. Sygnał do apoptozy jest ściśle związany z funkcją tych receptorów, gdyż komórki linii opornych na działanie glukokortykoidów mają zmienioną ilość, bądź funkcję receptorów glukokortykoidowych [47, 53]. Receptory hormonów sterydowych należą do dużej rodziny, w skład której wchodzi także receptory hormonów tyroidowych, kwasu retinoidowego i pochodnych witaminy D [54]. Wykazano, że aktywna, związana z ligandem forma receptora glukokortykoidowego, wiąże się do odcinka DNA o specyficznej sekwencji zwanej GRE (*glucocorticoid responsive elements*) w miejscu promotorowym genu docelowego [55, 56]. Jak wiele innych regulatorów transkrypcji, receptory glukokortykoidowe mogą stymulować ekspresję jednych genów, a hamować innych [54]. W bardzo wielu doświadczeniach polegających na transfekcji do komórek genów kodujących białko receptorowe, a także genów kodujących białka wchodzące w skład czynnika transkrypcyjny AP-1 (Fos, Jun) wykazano, że występuje wzajemne hamujące działanie tych dwóch czynników transkrypcyjnych. Może ono występować na poziomie reakcji białek lub w innych przypadkach

na poziomie wiązania z DNA (praca przeglądowa, [57]). Jak do tej pory brak jest danych doświadczalnych na temat oddziaływań tych dwóch czynników w komórkach stymulowanych do apoptozy. Nasze wstępne dane (S i k o r a, dane niepublikowane) wskazują na silne powinowactwo czynnika transkrypcyjnego AP-1 wyizolowanego z tymocytów stymulowanych do apoptozy deksametazonem do sekwencji specyficznej dla receptorów glukokortykoidowych (GRE).

### III-3. cAMP i indukcja apoptozy

Inny mechanizm indukcji apoptozy występuje w komórkach stymulowanych do śmierci przez podwyższenie poziomu cAMP w komórce. Zależy on od obecności w komórce funkcjonalnej kinazy A, która jest aktywowana przez cAMP (PKA) [58]. Wykazano, że większość mutantów nie odpowiadających na podwyższenie stężenia cAMP apoptozą ma zmienioną ekspresję lub funkcję PKA [59]. Ponadto trudności w uzyskaniu mutantów, opornych jednocześnie na glukokortykoidy i cAMP, mogą świadczyć o niezależności tych dwóch mechanizmów [60]. Ostatnio jednakże udało się wyselekcjonować mutanta mysich komórek limfoidalnych, który pomimo obecności zarówno funkcjonalnych receptorów GR, jak i funkcjonalnej PKA jest oporny na działanie zarówno glukokortykoidów jak i cAMP [61]. Prawdopodobnie więc te dwie drogi przekazywania sygnału komórkowego są niezależne tylko do pewnego momentu. Sądzi się, że cAMP bierze być może, udział w fosforylacji receptora glukokortykoidowego, gdyż antagonistą tego receptora całkowicie znosił indukcję apoptozy w tymocytach wywołowaną analogiem adenozyliny zwiększającym stężenie cAMP [62]. Niewykluczone, że interakcja tych dwóch dróg przekazywania sygnału występuje na poziomie regulacji transkrypcji [61]. Spostrzeżenie to wymaga jednakże doświadczalnego potwierdzenia.

### III-4. Czynniki nekrozy nowotworu (TNF)

Czynnik nekrozy nowotworu TNF- $\alpha$  produkowany przez makrofagi oraz limfotoksynę (TNF- $\beta$ ) produkowaną przez limfocyty identyfikowano pierwotnie jako czynniki antynowotworowe. Później wykazano, że mają one bardzo szerokie spektrum działania jako czynniki antywirusowe, immunoregulatorowe, a nawet stymulujące podziały komórkowe [64]. TNF- $\alpha$  w niektórych komórkach wywołuje zarówno nekrozę jak i apoptozę [40]. W komórkach wielu typów takich jak np. ludzkie komórki białaczkowe HL-60, czy też U937, a także mysie L929 wykazano tylko apoptotyczne działanie TNF- $\alpha$  [63]. Działanie TNF- $\alpha$  jest plejotropowe. Generuje on wolne rodniki tlenowe w tym podtlenek azotu i indukuje hydrolizę sfingolipidów do ceramidu [65]. Uważa się, że ceramid może być wewnątrzkomórkowym pośrednikiem w przekazywa-

niu sygnału do apoptozy wywołanej TNF- $\alpha$  [66]. Sam ceramid podobnie jak TNF- $\alpha$  wywoływał apoptozę w wielu mysich i ludzkich komórkach nowotworowych [63, 66]. Receptory TNF (typ I i II) należą do rodziny receptorów, w skład której wchodzi poza nimi receptor czynnika wzrostu nerwów [67], antygen CD40 limfocytów B [68], a także antygen Fas/Apo-1 [69]. Fas jest antygenem występującym w błonach mysich komórek, natomiast Apo-1 stanowi ludzki odpowiednik tego antygeny. Pobudzenie tego receptora przeciwciałem anti Fas prowadziło do apoptozy mysich komórek białaczkowych i fibroblastów, do których wprowadzono gen kodujący polipeptyd Fas [69]. Natomiast myszy, których tymocyty nie mają aktywnego Fas cierpią na chorobę autoimmunoreaktywną z powodu zaburzeń w apoptozie tych komórek skierowanych przeciwko własnemu antygenom [70]. Niedawno udało się zidentyfikować w limfocytach ligand tego receptora. Jest to białko transmembranowe o dużej homologii z TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$ . Jednakże sklonowany szczurzy ligand receptora Fas/Apo-1 nie aktywował receptorów TNF z ludzkich komórek [71]. Rola tego liganda i jego receptora wciąż pozostaje bardzo zagadkowa.

### III-5. Wolne rodniki tlenowe

Wiele fizycznych i chemicznych czynników indukujących apoptozę wywołuje stres oksydacyjny powodujący generację wolnych rodników tlenowych [72]. Na przykład, zarówno promieniowanie ultrafioletowe jak i gamma wywołują apoptozę, jak też generują powstawanie takich aktywnych form tlenu jak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i OH<sup>-</sup> [72]. Ostatnio zauważono, że podtlenek azotu, który jest wolnym rodnikiem tlenowym indukuje apoptozę w makrofagach i monocytach [73]. Obniżenie poziomu wewnątrzkomórkowych zmiataaczy wolnych rodników tlenowych często czyni komórkę bardziej wrażliwą na apoptozę indukowaną egzogenicznie podanymi wolnymi rodnikami. Odwrotnie, apoptozę wywołaną TNF można zahamować podając tioredoksynę, która jest zmiataczem wolnych rodników tlenowych [75]. Jaki może być udział wolnych rodników w indukcji apoptozy? Wiadomo, że wolne rodniki tlenowe prowadzą do uszkodzeń DNA, które z kolei aktywują poli(ADP-rybozo) polimerazę (praca przeglądowa [76]). Poli ADP-rybozylacja prowadzi do obniżenia wewnątrzkomórkowej puli NAD/NADH i spadku stężenia ATP. Pozbawienie komórki energii może stanowić bezpośrednią przyczynę jej śmierci. Ponadto wolne rodniki tlenowe prowadzą do peroksydacji lipidów błon komórkowych. W mitochondriach pod wpływem wolnych rodników tlenowych następuje wypływ wapnia [77]. Wolne rodniki tlenowe aktywują niektóre geny. Niewykluczone, że są to geny aktywne w procesie apoptozy. TNF na przykład indukuje aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B [78]. Również całkiem niedawno wykazano, indukcję tego

czynnika transkrypcyjnego podtlenkiem wodoru [79].

### III-6. Niedobór czynników wzrostowych

Bardzo wiele już wiemy na temat regulacji cyklu komórkowego i stymulacji komórek do podziału czynnikami wzrostu. Dodanie czynników wzrostowych do pożywki powoduje aktywację genów cyklu komórkowego i kaskadę wielu zdarzeń biochemicznych, w tym procesów fosforylacji [80, 81]. Niestety sytuacja odwrotna tzn. pozbawienie komórek czynników wzrostowych nie jest tak jasna. W wielu przypadkach prowadzi do zahamowania podziałów i apoptozy aczkolwiek trudno jest mówić o jednakowym mechanizmie regulującym ten proces we wszystkich przypadkach. Usunięcie epidermalnego czynnika wzrostu powoduje śmierć mysich komórek embrionalnych [82], natomiast niedobór czynnika wzrostu nerwu powoduje apoptozę szczurzych komórek PC12 i komórek neuronalnych [83]. Podobnie usunięcie z pożywki płytkowego czynnika wzrostu powoduje śmierć komórek glejowych [84]. Apoptozę spowodowaną usunięciem specyficznych czynników wzrostowych wielokrotnie obserwowano w przypadku progenitorowych komórek hematopoetycznych i komórek limfoidalnych [17]. Niedobór czynników wzrostowych z jednej strony może prowadzić do spadku ekspresji genów niezbędnych do przeżycia (np. *bcl-2*) lub aktywacji genów zaangażowanych w regulację apoptozy (*c-myc*, *p53*). Niewykluczone, że spadek pobudzenia receptorów czynników wzrostowych prowadzi do ekspresji nowych genów [17].

### III-7. Udział wapnia w przekazywaniu sygnału do apoptozy

Podobnie jak w wielu innych procesach komórkowych, w tym proliferacji, jony wapniowe wydają się odgrywać ważną rolę także w przekazywaniu sygnału do apoptozy [85]. Chociaż znane są przykłady hamowania apoptozy spowodowane wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia [86], to jednak w większości znanych przypadków wzrost stężenia cytozolowego wapnia towarzyszy indukcji apoptozy. I tak wzrost stężenia wapnia obserwowano w limfocytach stymulowanych do śmierci poprzez aktywację receptora TCR, a także przez glukokortykoidy i jonofory wapniowe [21, 87]. Różnica pomiędzy stymulacją komórki do apoptozy i do podziałów na tym etapie przekazywania sygnału dotyczy prawdopodobnie aktywności kinazy C. Stymulacja komórek do proliferacji związana jest ze wzrostem aktywności tego enzymu, podczas gdy aktywatory kinazy C, estry forbolu, często hamowały apoptozę [21, 88-91]. I odwrotnie, obserwowano indukcję apoptozy w komórkach traktowanych inhibitorami kinazy C. I tak na przykład, polimyksyna B indukowała apoptozę ludzkich limfocytów T [92], a staurosporyna komórek

wielu linii nowotworowych [93]. Jon wapnia jest aktywatorem zarówno endonukleaz (DNAzy I, NUC-18), jak również transglutaminaz tkankowych ulegających aktywacji w procesie apoptozy. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia jest również niezbędny do zmian jakie zachodzą w cytoskieletcie podczas tworzenia ciałek apoptotycznych [94].

W ludzkich komórkach białaczkowych obserwowano indukcję genu kalmoduliny pod wpływem dekсамetazonu [95]. Kalmodulina należy do białek wiążących wapń i bierze udział w regulacji aktywności bardzo wielu enzymów. Indukcja tego genu występowała tylko w komórkach z funkcjonalnymi receptorami glukokortykoidowymi. Komórki zmutowane, nie mające receptorów glukokortykoidowych nie wykazywały wzrostu ekspresji kalmoduliny [95].

### IV. Aktywacja genów związana z indukcją apoptozy

Programowana śmierć komórki, podobnie jak proliferacja, jako proces aktywny wymaga prawdopodobnie ekspresji wielu genów. Do dzisiaj zidentyfikowano kilkanaście genów, których wzrost ekspresji obserwuje się po zadziałaniu czynnika stymulującego apoptozę. Przy czym część z nich, tak jak np. *ced-3* i *ced-4*, ma związek tylko ze śmiercią programowaną, natomiast inne, tak jak np. protoonkogeny, biorą udział również w regulacji innych procesów.

Jednym z genów, którego ekspresja ulega indukcji w komórkach stymulowanych do apoptozy jest TRPM-2 (*testosterone repressed prostatic message-2*). Wzrost syntezy mRNA tego genu obserwowano m.in. w czasie regresji hormono-zależnego mysiego nowotworu Shionogi [96], w ludzkich komórkach nowotworu prostaty po działaniu chemioterapeutyków [97], po indukcji apoptozy w mysich komórkach nowotworowych L929 traktowanych TNF czy inhibitorami topoizomerazy II [98], oraz w umierających komórkach ludzkiego nowotworu sutka [99]. Wykazano wysoką homologię pomiędzy TRPM-2, a genem SGP-2 (*sulphated glykoprotein-2*), którego mRNA oraz białkowy produkt występuje w wielu tkankach (jądrach, prostatie, wątrobie, pęcherzu moczowym i innych) [100]. W komórkach apoptotycznych obserwuje się wielokrotny wzrost ilości mRNA tego genu, podobnie jak TRPM-2 [101]. Obydwa geny należą do tej samej rodziny co gen kodujący klastrynę związaną z procesem różnicowania komórek [102]. Trudno jest powiedzieć jaką rolę w komórkach ulegających apoptozie mogą odgrywać białka kodowane przez te geny. Wyizolowano również dwa klony mRNA tzw. RP-2 i RP-8 specyficzne dla tymocytów stymulowanych do apoptozy. Przypuszcza się, że funkcja tych mRNA powinna być ściśle związana z procesem programowanej śmierci [103].

U nicienia *Caenorhabditis elegans* zidentyfikowano geny ulegające ekspresji w komórkach umierających

śmiercią naturalną w procesie morfogenezy. Są to tzw. geny *ced-3*, *ced-4*. Gen *ced-4* koduje białko, które nie wykazuje żadnego podobieństwa do dotychczas znanych białek [104]. Natomiast gen *ced-3* koduje białko homologiczne z białkiem ICE (*interleukin- $\beta$ -convertig enzyme*), występującym w tkankach ssaków. ICE jest proteazą, aktywującą 1- $\beta$  interleukinę, pośredniczącą w reakcjach związanych ze stanem zapalnym [105]. Transfekcja genu *ICE* do szczurzych fibroblastów powodowała ich śmierć, aczkolwiek trudno jest cokolwiek powiedzieć o mechanizmie tego procesu [106].

## V. Udział protoonkogenów i onkogenów w apoptozie

Indukcję protoonkogenów *c-fos*, *c-jun* i *c-myc* obserwowano w wielu różnych komórkach stymulowanych do apoptozy (Tabela 1). Należą one do genów tzw. wczesnej odpowiedzi komórkowej i są również indukowane w komórkach stymulowanych m.in. do proliferacji [107, 113]. Protoonkogeny te grają rolę czynników transkrypcyjnych. Białka Fos i Jun tworzą dimery o nazwie czynnika transkrypcyjnego AP-1. W tymocytach szczurzych stymulowanych do apoptozy deksametazonem wykazano wzrost wiązania białka AP-1 ze specyficzną sekwencją DNA [114, 115]. Rolę protoonkogenów, a także czynników transkrypcyjnych w śmierci komórki omówiono szerzej w artykułach przeglądowych S i k o r y [116, 117]. Uważa się, że w pewnych przypadkach protoonkogeny, a w innych onkogeny mogą „uwrażliwiać” komórkę na apoptozę. Dobry przykład stanowić może tu mechanizm transformacji nowotworowej wywoływanej przez on-

kogennego adenowirusa zawierającego DNA. Do pełnej transformacji nowotworowej komórek niezbędna jest współpraca dwóch onkogenów tego wirusa, *E1A* i *E1B*. Przy czym, jak wykazano, sam onkogen *E1A* wywoływał apoptozę w komórkach nerki szczura podczas gdy jedno z dwóch białek onkogeny *E1B* (19-kDa) hamowało śmierć tych komórek, podobnie jak ludzki protoonkogen *bcl-2* [118, 119]. Tak więc wydaje się, że „nieśmiertelność” w postaci nieograniczonych podziałów nie może ujawnić się bez ekspresji genu indukującego śmierć. Ostatnio jednak wykazano, że wręcz przeciwnie produkt białkowy genu *E1A 12S*, hamował apoptozę szczurzych komórek powodując jednocześnie ich immortalizację. Udział *E1B* natomiast sprowadzałby się zatem do transformacji nowotworowej zimmortalizowanych komórek [120].

Wyniki innych doświadczeń zdają się jednak potwierdzać tezę o bardzo ścisłym związku pomiędzy progresją cyklu komórkowego indukowaną onkogenami a śmiercią komórki. Mianowicie wykazano, że gen chimeryczny pełniący funkcję czynnika transkrypcyjnego, tzw. *E2A-PBX1* powstały na skutek translokacji chromosomu 1 i 19 limfocytów B charakteryzującej niektóre typy białaczek wieku dziecięcego, powodował w myszach transgenicznym transformację nowotworową komórek limfoidalnych. Transformacja ta jednakże poprzedzona była masowym wymieraniem komórek progenitorowych zarówno B jak i T [121].

## VI. Udział *p53* w apoptozie

Białko *p53* jest produktem genu supresoru nowotworu i w formie niezmutowanej bierze udział w regulacji cyklu komórkowego\*<sup>1</sup>. Podwyższony poziom *p53* prowadzi do zatrzymania podziałów komórkowych [122]. Wykazano, że podwyższona ekspresja genu *p53* wywołuje apoptozę w wielu komórkach [123, 124]. Jednakże myszy pozbawione tego genu (tzw. *knock out*) rozwijały się bez żadnych zaburzeń mogących świadczyć o zachwianiu równowagi pomiędzy proliferacją i śmiercią komórek [125]. W innych doświadczeniach wykazano, że gen *p53* jest niezbędny do indukcji apoptozy w tymocytach, ale tylko wywoływanej przez czynniki uszkodzające DNA. Mianowicie tymocyty myszy pozbawionych *p53* umierały pod wpływem glukokortykoidów, natomiast wykazywały całkowitą oporność (zarówno *in vivo* jak i *in vitro*) na śmierć indukowaną promieniowaniem jonizującym [126, 127]. Doświadczenia te wykazują, że istnieją przynajmniej dwie drogi indukcji apoptozy, przy czym tylko jedna z nich zależałaby od *p53*. Rola *p53* w indukcji apoptozy jest niezbyt jasna. Być może wzrost ekspresji *p53* wpływa specyficznym na aktywację genów indukowanych w czasie apoptozy [128]. Niewykluczone, że udział *p53* w apoptozie związany jest

\*<sup>1</sup> Własności genu *p53* omówiono dokładniej w artykule Henryka Berbecia *Post. Biochem.* (1994) 40: 6-10

**Tabela 1.**

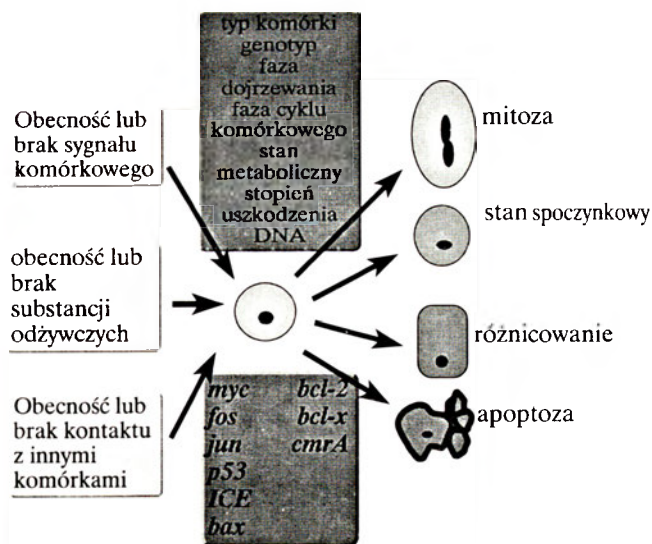
Indukcja protoonkogenów w komórkach stymulowanych do apoptozy.

komórki	czynnik indukujący apoptozę	protoonkogen	źródło
szczurze fibroblasty	niedobór czynników wzrostowych	<i>c-myc</i>	[107]
szczurza prostata	kastracja	<i>c-fos</i> , <i>c-myc</i>	[108]
mysi nowotwór Shiongi	kastracja	<i>c-fos</i> , <i>c-myc</i>	[96]
szczurze tymocyty	deksametazon	<i>c-fos</i> , <i>c-jun</i> <i>c-myc</i>	[109]
mysie limfocyty interleukinozależne	niedobór interleukiny	<i>c-fos</i> , <i>c-jun</i>	[110]
komórki nerwowe	kwas kainowy	<i>c-fos</i>	[111]
ludzkie komórki HUVE	TNF	<i>c-jun</i>	[112]
ludzkie komórki MCF-7	niedobór estrogeny	<i>c-fos</i>	[99]

z rolą tego genu supresora nowotworu w mechanizmie reperacyjnym komórki. Jeśli uszkodzenia nie są zbyt rozległe, to po dokonaniu napraw komórka podejmuje normalną proliferację. Jeśli jednak przekraczają one możliwości naprawcze komórki to „popęlnia ona samobójstwo” w „ucieczce” przed transformacją nowotworową, do której prowadziłyby powstałe mutacje. Rola *p53* w apoptozie wydaje się jednak jeszcze bardziej skomplikowana jeżeli weźmiemy pod uwagę fakt, że w leukemicznych komórkach interleukinozależnych zahamowanie ekspresji *p53* powodowało wzrost ich przeżywalności. Z drugiej strony nadekspresja *p53* przyspieszała ich śmierć, ale tylko w nieobecności interleukiny 3. Dodanie do pożywki tej cytokiny całkowicie równoważyło „śmiercionośny” efekt *p53*. Wynik tych doświadczeń sugeruje, że *p53* bierze udział w regulacji apoptozy indukowanej nie tylko uszkodzeniami DNA. Można sądzić, że przynajmniej w niektórych komórkach *p53* ma swój udział w przekazywaniu sygnału poprzez czynniki wzrostowe [129].

## VII. Hamowanie apoptozy

Śmierć komórek jest niezbędna w utrzymaniu prawidłowej ich liczby w organizmie. Stanowi także jeden z mechanizmów obronnych przyczyniając się do usuwania komórek uszkodzonych i zmutowanych. Potencjalnie każda komórka organizmu jest zdolna do uruchomienia programu śmierci. O tym, czy to nastąpi czy nie, decyduje bardzo wiele czynników zarówno wewnętrznych jak i zewnętrznych (Ryc. 3). O wewnętrznych możliwościach komórki do popęlnienia samobójstwa stanowi prawdopodobnie wzajemne oddziaływanie genów indukujących apoptozę z jednej strony i hamujących ten proces, z drugiej. Do dzisiaj udało się badaczom poznać kilka takich antagonistycznie działających „układów genów”. Są to geny *ced-3*, *ced-4* i gen *ced-9*, geny *bcl-2* i *bax*, geny *bcl-x* oraz *ICE* i *crmA*.



Ryc. 3. Zewnętrzne i wewnętrzne czynniki wpływające na stan komórki.

U obłęca *C. elegans* w procesie morfogenezy umiera 131 komórek. W komórkach tych są aktywne tzw. geny „śmierci” *ced-3* i *ced-4*. Natomiast w pozostałych komórkach, które przeżywają okres morfogenezy jest aktywny gen *ced-9*, który jak wykazano hamuje apoptozę [130].

W komórkach ssaków występuje gen *bcl-2*, który wykazuje 22% strukturalnej homologii z genem *ced-9* i homologię funkcjonalną w hamowaniu apoptozy [131, 132]. Po raz pierwszy gen *bcl-2* zidentyfikowano w komórkach ziarnicy złośliwej, nowotworu limfocytów B, w miejscu translokacji chromosomu 14 i 18. W wyniku tej translokacji następuje wzmożona synteza mRNA *bcl-2*, gdyż gen ten dostał się pod kontrolę sekwencji regulatorowej ciężkiego łańcucha immunoglobuliny [133, 134]. Później niejednokrotnie wykazywano, że rola *bcl-2* wiąże się raczej z przeżywalnością komórek niż stymulowaniem ich do proliferacji. Protoonkogen ten np. hamował śmierć wyselekcjonowanych komórek hematopoetycznych, które pozbawiono limfokin [135, 136]. Limfocyty T, zarówno wyizolowane z grasicy jak też obwodowe otrzymywane z myszy transgenicznych, w których dokonano transfekcji genu *bcl-2* przeżywały pomimo traktowania ich w sposób, który normalnie powoduje śmierć komórek (pozbawienie czynników wzrostowych, ekspozycja na promieniowanie jonizujące, glukokortykoidy, estry forbolu, jonomycynę, azydek sodu) [137]. W innych doświadczeniach wykazano hamowanie pod wpływem *bcl-2* delekcji klonalnej tymocytów, która zachodzi poprzez apoptozę [138]. Wykazano również, że błonowe białko 1 wirusa Epstein-Barr rozregulowuje ekspresję *bcl-2* i blokuje apoptozę w komórkach zainfekowanych tym wirusem [139]. Komórki nerwowe szczura, w których dokonano transfekcji ludzkiego genu *bcl-2*, wykazywały w hodowli znacznie wydłużoną przeżywalność (do kilku tygodni), nawet gdy pozbawiono je czynnika wzrostu nerwu [140].

Gen *bcl-2* hamuje również apoptozę wywołaną protoonkogenem *c-myc*. Komórki chemiczne, które wykazywały zarówno ekspresję jednego jak i drugiego genu charakteryzowały się znacznie większą przeżywalnością niż komórki, w których indukowano tylko *c-myc* [141]. Podobnie indukcja *c-myc* w szczurzych fibroblastach powodowała śmierć morfologicznie scharakteryzowaną jako apoptozę. Jeśli w komórkach dokonano transfekcji genu *bcl-2* wtedy nie tylko przeżywały, ale również zaczynały się dzielić [142]. Szczegółowe badania rozmieszczenia białka Bcl-2 w różnych tkankach wykazały obecność jego w miejscach, w których zachodzą procesy różnicowania komórek i ich selekcji przez apoptozę. Bcl-2 zdaje się występować w komórkach, które są już zróżnicowane i nie podatne na apoptozę [143]. Ostatnio wykazano, że białko Bcl-2 współdziała w regulacji apoptozy z tzw. białkiem Bax. Obydwa białka wykazują duże podobieństwo w sekwencji aminokwasów i tworzą ze sobą kompleksy. Jeżeli w komórce jest nadmiar Bcl-2 to

wtedy wiązuje ono całą pulę białka Bax. Pozostałe białko Bcl-2 natomiast tworzy homodimery. Taka sytuacja pozwala komórce na przeżycie. Odwrotnie, jeśli w komórce występuje nadmiar Bax, to ilościowo dominujące homodimery tego białka przechylają szalę w stronę śmierci komórki [144]. Interesujące jest jaką funkcję pełnią te białka. Jeśli o funkcji białka Bax nic jeszcze nie możemy powiedzieć, to na temat biochemicznej roli Bcl-2 pojawiły się już pierwsze doniesienia. Białko Bcl-2 zlokalizowane jest w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, błonie jądrowej i częściowo w siateczce śródplazmatycznej [131, 145]. Nie wykazano jednakże żadnego związku pomiędzy Bcl-2, a oksydacyjną fosforylacją. Postuluje się natomiast, że Bcl-2 może brać udział w „zmiataniu” wolnych rodników tlenowych, bądź też w przeciwdziałaniu efektów przez nie wywoływanych w indukcji apoptozy. W mysich limfocytach gen *bcl-2* całkowicie zapobiegał apoptozie indukowanej nadtlakiem wodoru, jak również nadekspresja tego genu znosiła całkowicie peroksydację lipidów powodowaną zwykle przez wolne rodniki tlenowe [146]. Postuluje się też udział Bcl-2 w przekazywaniu sygnałów komórkowych poprzez związek z białkiem R-ras [147]. Mechanizm ochrony komórki przed śmiercią z udziałem *bcl-2* i *bax* nie jest jedyny, wykazano bowiem, że w myszach pozbawionych *bcl-2* genu komórki układu nerwowego rozwijały się prawidłowo [148].

Innym kandydatem do ochrony komórki przed śmiercią może być niedawno wyizolowane, białko zwane Bcl-x, które występuje w formie długiej i krótkiej. Przy czym dłuższa z nich podobnie jak Bcl-2 miałaby chronić komórki przed śmiercią, a krótsza, podobnie jak Bax, stymulować je do apoptozy [149].

Inną parę genów działających antagonistycznie z punktu widzenia „życia i śmierci” komórek stanowią mogą geny *ICE* i *crmA*. Wykazano, że nadekspresja *ICE* powodowała śmierć szczurzych fibroblastów. Zahamowanie apoptozy w tych komórkach uzyskano poprzez mikroiniekcję *bcl-2* lub genu wirusa ospy bydłowej *crmA*, którego białkowy produkt jest inhibitorem proteazy *ICE* [108]. Mikroiniekcja genu *crmA* hamowała także śmierć komórek nerwowych kurczenia wywołowaną niedoborem czynnika wzrostu nerwu [150]. Wykazano także, że śmierć tych komórek może być indukowana nadekspresją *ICE*. Brakuje jednakże doświadczeń, w których bezpośrednio by wykazano, że *crmA* hamuje śmierć komórek nerwowych indukowaną genem *ICE* lub jego produktem białkowym.

Wydaje się, że lista genów zdolnych do zahamowania apoptozy jest otwarta. Szczególnie dobrym źródłem do ich poszukiwania powinny być komórki zróżnicowane, mniej podatne na spontaniczną apoptozę od komórek proliferujących. I tak np. z komórek leukemicznych stymulowanych do różnicowania estrami forbolu wyizolowano gen *MCL1* o sekwencji podobnej do sekwencji genu *bcl-2* [151].

## VIII. Uwagi końcowe

Drogi aktywacji komórki do apoptozy mogą być bardzo różnorodne. Nie jesteśmy w stanie dzisiaj odpowiedzieć na pytanie, w którym momencie występuje połączenie tych dróg i indukcja procesów, które są jednakowe niezależnie od bodźca wywołującego śmierć i typu komórki, w której ona następuje. Wydaje się jednak wielce prawdopodobne, że drogi te krzyżują się na etapie aktywacji i interakcji czynników transkrypcyjnych. Funkcje czynników transkrypcyjnych pełnią produkty genów *c-fos* i *c-jun* tworząc dimery o nazwie AP-1. Również białko Myc, p53, a także receptory glukokortykoidowe pełnią funkcję czynników transkrypcyjnych. Niestety, nie wiadomo jeszcze jakie geny mogą podlegać regulacji przez te czynniki transkrypcyjne w procesie apoptozy.

### Podziękowanie

Autorka pragnie serdecznie podziękować Pani Prof. B. Grzelakowskiej-Sztabert za dyskusję i cenne wskazówki pomocne w przygotowaniu niniejszej pracy.

Artykuł otrzymano 16 maja 1994 r.

Zaakceptowano do druku 3 czerwca 1994 r.

### Piśmiennictwo

1. Wyllie AH, Kerr JFR, Curie AR (1980) *Int Rev Cyt* **68**: 251-306
2. Cohen JJ (1993) *Immunol Today* **14**: 126-130
3. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) *Br J Cancer* **26**: 239-257
4. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1991) W: Cellular and Molecular Immunology, Saunders Company
5. Smets LA (1994) *Anti-Cancer Drugs* **5**: 3-9
6. Wyllie AH (1992) *Cancer Metast Rev* **11**: 95-103
7. Forloni G (1993) *Funct Neurol* **8**: 211-225
8. Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz EJ, Cotman CW (1993) *Proc Acad Sci USA* **90**: 7952-7955
9. Meyaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijster MJ, Keet RPM, Miedema F (1992) *Science* **257**: 217-218
10. Ameisen JC (1992) *Immunol Today* **13**: 388-391
11. Williams GT, Smith CA, McCarthy NJ, Grimes EA (1992) *Trends Cell Biol* **2**: 263-267
12. Williams GT, Smith CA (1993) *Cell* **74**: 777-779
13. Fesus L (1993) *FEBS Lett* **328**: 1-5
14. Martin SJ, Green DR, Cotter TG (1994) *Trends Biol Sci* **19**: 26-30
15. Sen S (1992) *Biol Rev* **67**: 287-319
16. Evans VG (1993) *Cell Biol Internat* **17**: 461-476
17. Collins MCL, Rivas AL (1993) *Trends Biochem Sci* **18**: 307-309
18. Bursh W, Oberhammer F, Schulte-Herman R (1992) *Trends Pharmac Sci* **13**: 245-251
19. Weber R (1969) W: Lysosomes in Biology and Pathology t 2 Dingle JT, Fell HB (red) North Holland Publishing Company, Amsterdam str 437-461
20. Lockshin RA, Wong TR (1981) *J Cell Biol* **91**: 211a
21. McConkey DJ, Nicotera P, Hartzell P, Bel-lomo G, Wyllie AH, Orrenius S (1989) *Arch Biochem Biophys* **269**: 365-370
22. Yamada T, Ohyama H (1988) *Int J Radiat Biol* **53**: 65-75
23. Ucker DS, Ashwell JD, Nickas G (1989) *J Immunol* **143**: 3461-3469



24. Shi Y, Sahai BM, Green DR (1989) *Nature* **339**: 625-626
25. Lanotte M, Riviere JB, Hermouet S, Houge G, Vintermyr OK, Gjersten BT, Doeskeland SO (1991) *J Cell Physiol* **146**: 73-80
26. Martin DP, Schmidt ES, DiStefano PS, Lowry OH, Carter JG, Johnson EM (Jr.) (1988) *J Cell Biol* **106**: 829-844
27. Kruman II, Gukovskaya AS, Petrunskaya VV, Beletsky IP, Trepakova ES (1992) *J Cell Physiol* **153**: 112-117
28. Martin SJ, Lenon SV, Bonham AM, TG Cotter TG (1990) *J Immunol* **145**: 1859-1867
29. Compton MM (1992) *Cancer Methas Revs* **11**: 105-119
30. Ormerod MG, O'Neill CF, Robertson D, Har- rap KR (1994) *Exp Cell Res* **211**: 231-237
31. Cohen GM, Sun X-M, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN (1992) *Biochem J* **286**: 331-334
32. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH (1990) *Am J Pathol* **136**: 593-608
33. Cohen JJ, Duke RC (1984) *J Immunol* **132**: 38-42
34. Peitsch MC, Mannherz HG, Tschopp J (1994) *Trends Cell Biol* **4**: 37-41
35. Gaido ML, Cidlowski JA (1991) *J Biol Chem* **266**: 18580-18585
36. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gor- czycza W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F (1992) *Cytometry* **13**: 795-808
37. Fesus L, Thomazy V, Falus A (1987) *FEEBS Lett* **284**: 104-108
38. Fesus L, Davies PJ, Piacentini M (1991) *Eur J Cell Biol* **56**: 170-177
39. Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG (1991) *Cell Profil* **24**: 203-214
40. Laster SM, Wood JG, Gooding LR (1988) *J Immunol* **141**: 2629-2634
- 40a. Jakóbsiak M (1992) W: Kawiak J, Mirecka J, Olszewska M, Warchol J (red) *Podstawy Cytofizjologii*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str 516-547
41. McConkey DJ, Hartzell P, Amadorpez JF, Or- renius S, Jondal M (1989) *J Immunol* **143**: 1801-1806
42. Odaka Ch, Kizaki H, Tadakuna T (1990) *J Immunol* **144**: 2096-2101
43. Dougherty TF (1952) *Physiol Rev* **32**: 379-401
44. Claman HN (1972) *N Engl J Med* **287**: 388-397
45. Bansal N, Houle AG, Melnikovich G (1990) *J Cell Physiol* **143**: 105-109
46. Norman NN, Thompson EB (1977) *Cancer Res* **37**: 3785-3791
47. Harris AW (1970) *Exp Cell Res* **60**: 341-348
48. Horibata K, Harris AW (1970) *Exp Cell Res* **60**: 61-77
49. Iwata M, Hanaoka S, Sato K (1991) *Eur J Immunol* **21**: 643-648
50. Bourgeois S, Newby RF (1977) *Cell* **11**: 425-430
51. Nieto MA, Gonzales A, Gambon F, Diaz- Es- pada F, Lopez-Rivas A (1992) *Clin Exp Immunol* **88**: 341-344
52. Miesfeld RL (1989) *Crit Rev Biochem Mol Biol* **24**: 101-117
53. Dieken ES, Miesfeld RL (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 589-597
54. Evans RM (1988) *Science* **240**: 889-894
55. Scheidreit C, Beato M (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 3029-3033
56. Payvar FP, Franco D, Firestone GL, Edgar B, Wrange O, Okert S, Gustafsson J-A, Yamamo- to KR (1983) *Cell* **35**: 381-392
57. Ponta H, Cato ACB, Herrlich P (1992) *Biochim Biophys Acta* **1129**: 255-261
58. Insel PA, Bourne HR, Coffino P, Tomkins GM (1975) *Science* **190**: 896-898
59. Fredrich U, Coffino P (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 679-683
60. Gerhing U, Coffino P (1977) *Nature* **268**: 167-169
61. Dowd DR, Miesfeld RL (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 3600-3608
62. McConkey D, Orrenius S, Okert S, Jondal M (1993) *FASEB J* **7**: 580-585
63. Jarvis WD, Kolesnick R, Fornari FA, Traylor RS, Gewirtz D, Grant S (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 73-77
64. Beutler B, Cerami A (1989) *Annu Rev Immunol* **7**: 625-655
65. Kim M-Y, Linardic C, Obeid L, Hannun Y (1991) *J Biol Chem* **266**: 484-489
66. Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA (1993) *Science* **259**: 1769-1771
67. Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Seghal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M (1986) *Cell* **47**: 545-554
68. Stamenkovic I, Clark EA, Seed B (1989) *EMBO J* **8**: 1403-1410
69. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizu- shima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Naga- ta S (1991) *Cell* **66**: 233-243
70. Cohen PL, Eisenberg RA (1991) *A Rev Immun* **9**: 243-269
- F 71. Suda T, Takahashi T, Golstein T, Nagata S (1993) *Cell* **75**: 1169-1178
72. Buttke TM, Sandstrom PA (1994) *Immunol Today* **15**: 7-10
73. Halliwell B, Gutteridge JMC (1990) *Methods En- zymol* **186**: 1-85
74. Albina JE, Cui S, Mateo RB, Reicher JS (1993) *J Immunol* **150**: 5080-5085
75. Matsuda M, Masutani H, Nakamura H, Miyaji- ma S, Yamauchi A, Yonehara S (1991) *J Immunol* **147**: 3837-3841
76. Sikora E (1989) *Post Biochem* **35**: 563-574
77. Gunter TE, Pfeiffer DR (1990) *Am J Physiol* **258**: C755-C786
78. Schutze S, Potthoff K, Machleidt T, Berkovic D, Wiegmann K, Kronke M (1992) *Cell* **71**: 765-776
79. Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA (1993) *EMBO J* **12**: 2005-2015
80. Grzelakowska-Sztabert B (1992) *Post Biochem* **38**: 98-107
81. Kawiak J (1990) *Post Biol Kom* **17**: 325-333
82. Rawson CL, Loo DT, Duimstra JR, Hedstrom OR, Schmidt EE, Barnes DW (1991) *J Cell Biol* **113**: 671-680
83. Batistatou A, Greene LA (1991) *J Cell Biol* **115**: 461-471
84. Barres BA, Hart IK, Coles SR, Burne JF, Voy- vodic JT, Richardson WD, Raff MC (1992) *Cell* **70**: 31-46
85. Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S (1992) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **32**: 449-470
86. Rodriguez-Tarduchy R, Collins M, Lopez-Ri- vas R (1990) *EMBO J* **9**: 2997-3002
87. Iseki R, Mukai M, Iwata M (1991) *J Immunol* **147**: 4286-4292
88. McConkey DJ, Hartzel P, Jondal M, Orrenius S (1989) *J Biol Chem* **264**: 13399-14002
89. Rodriguez-Tarduchy G, Lopez-Rivas R (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **164**: 1069-1075
90. Tomei LD, Kanter P, Wenner CE (1981) *Biochem Biophys Res Commun* **115**: 324-331
91. Forbes IJ, Zalewski PD, Giannakis C, Cowled PA (1992) *Exp Cell Res* **198**: 367-372
92. Lucas M, Solano F, Sanz F (1991) *FEBS Lett* **279**: 19-20
93. Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn KW, Pommier Y (1994) *Exp Cell Res* **211**: 314-321
94. Fowlkes BJ, Pardoll DM (1989) *Adv Immunol* **44**: 207-264
95. Dowd DR, MacDonald PN, Komm BS, Haus- sler MR, Miesfeld R (1991) *J Biol Chem* **266**: 18423-18426
96. Rennie PS, Brucovsky N, Buttyan R, Benso M, Cheng H (1988) *Cancer Res* **48**: 6309-6312
97. Kyprianou N, Isaacs JT (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **165**: 73-81
98. Kyprianou N, Alexander RB, Isaacs JT (1991) *J Natl Cancer Inst* **83**: 346-350
99. Kyprianou N, English HF, Davidson NE, Isa- acs JT (1991) *Cancer Res* **51**: 162-166

100. Slawin K, Sawczuk IS, Olesson CA, Buttyan R (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **172**: 160-164
101. Bettuzzi S, Troiano L, Davalli P, Tropea F, Ingletti MC, Grassilli E, Monti D, Corti A (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **175**: 810-815
102. French LE, Chonn JJ, Ducrest D, Baumann B, Belin D, Wohlewend A, Kiss JZ, Sappino AP, Tschopp J, Schifferli JA (1993) *J Cell Biol* **122**: 1119-1130
103. Owens GP, Cohen JJ (1992) *Cancer Metast Rev* **11**: 149-156
104. Yuan J, Horvitz HR (1992) *Development* **116**: 309-320
105. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993) *Cell* **75**: 641-653
106. Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweig E, Yuan J (1993) *Cell* **75**: 653-660
107. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC (1992) *Cell* **69**: 119-128
108. Buttyan R, Zakeri Z, Lockshin R, Wolgemuth D (1988) *Mol Endocrinol* **2**: 650-657
109. Grassilli E, Carcereri de Prati A, Monti D, Troiano L, Menegazzi M, Barbieri D, Franceschi C, Suzuki H (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **188**: 1261-1266
110. Colotta F, Polentarutti N, Sironi M, Mantovani A (1992) *J Biol Chem* **267**: 18278-18283
111. Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Baker SJ, Miao GG, Schilling K, Robertson LM, Curran T, Morgan JI (1993) *Nature* **363**: 166-169
112. Dixit VM, Marks RM, Sarma V, Prochownik EV (1989) *J Biol Chem* **264**: 16905-16909
113. Angel P, Karin M (1991) *Biochim Biophys Acta* **1072**: 129-157
114. Sikora E, Grassilli E, Bellesia E, Torino L, Franceschi C (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **192**: 386-391
115. Sikora E, Grassilli E, Radziszewska E, Bellesia E, Barbieri D, Franceschi C (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **197**: 709-715
116. Sikora E (1993) *Acta Biochim Polon* **40**: 389-394
117. Sikora E (1993) *Post Biochem* **39**: 212-220
118. White E, Sabbatini P, Debbas M, Wold WSM, Kusher DI, Gooding L (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 2570-2580
119. Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7742-7746
120. Quinlan MP (1993) *Oncogene* **8**: 3289-3296
121. Dederda DA, Walter EK, LeBrun DP, Sen-Majumdar A, Stevens ME, Barsh GS, Cleary ML (1993) *Cell* **74**: 833-843
122. Michalovitz D, Harvey O, Oren M (1990) *Cell* **62**: 671-680
123. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M (1991) *Nature* **353**: 345-347
124. Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J (1992) *Proc Acad Sci USA* **89**: 4495-4499
125. Donehower LA, Harvey LA, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A (1992) *Nature* **356**: 215-221
126. Lowe S, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T (1993) *Nature* **362**: 847-849
127. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH (1993) *Nature* **362**: 849-852
128. Kastan MB, Zhan Q, elDeiry WS, Carrier F, Jackson T, Walsh WV (1992) *Cell* **71**: 587-597
129. Gottlieb E, Haffner R, von Ruden T, Wagner EF, Oren M (1994) *EMBO J* **13**: 1368-1374
130. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz R (1992) *Nature* **356**: 494-499
131. Reed JC (1994) *J Cell Biol* **124**: 1-6
132. Hengartner MO, Horvitz HR (1990) *Cell* **76**: 665-668
133. Tsujimoto J, Finger LS, Tunis J, Nowell PC, Croce CM (1984) *Science* **226**: 1097-1099
134. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ (1985) *Cell* **41**: 899-906
135. Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) *Nature* **335**: 440-442
136. Nunez G, London L, Hockenbery D, Alexander M, McKearn JP, Korsmeyer SJ (1990) *J Immunol* **144**: 3602-3610
137. Strasser A, Harris AW, Cory S (1991) *Cell* **67**: 889-899
138. Siegel RM, Katsumata M, Miyashita T, Louine DC, Greene MI, Reed JC (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7003-7007
139. Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, Longnecker R, Kieff E, Rickson A (1991) *Cell* **65**: 1107
140. Garcia I, Martinou Y, Tsujimoto Y, Martinou J-C (1992) *Science* **258**: 302-304
141. Bissonnette RP, Echeverri A, Mahboubi A, Green DR (1992) *Nature* **359**: 552-556
142. Fanidi A, Harrington EA, Evan GI (1992) *Nature* **359**: 554-556
143. Hockenbery D, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6961-6965
144. Olvai ZN, Milliman K, Korsmeyer SJ (1993) *Cell* **74**: 609-619
145. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990) *Nature* **348**: 334-336
146. Hockenbery DM, Olvai ZN, Yin X-M, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) *Cell* **75**: 241-251
147. Fernandez-Sarabia MR, Bischoff JR (1993) *Nature* **366**: 274-275
148. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR (1993) *Cell* **75**: 229-240
149. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema ChE, Ding E, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB (1993) *Cell* **74**: 597-608
150. Gagliardini V, Fernandez P-A, Lee RKK, Drexler HCA, Rotello RJ, Fishman MC, Yuan J (1994) *Science* **263**: 826-828
151. Kozopas KM, Heather TY, Buchan L, Zhou P, Craig RW (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3516-3520

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

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

# Telomerowa hipoteza starzenia się komórek

## The telomere hypothesis of cell aging

EWA JARUGA\*

### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Telomery — struktura i znaczenie
- III. Telomeraza
- IV. Telomery a starzenie się komórek *in vitro* i *in vivo*
- V. Telomerowa hipoteza starzenia się komórek

### I. Wprowadzenie

Starzenie się i śmierć komórek przez nieuchronność i powszechność tych procesów budzą zainteresowanie wielu badaczy, o czym świadczyć może mnogość teorii dotyczących tej dziedziny [1-11].

Ostatnio ukazał się w *Postęпах Biochemii* artykuł\* o roli protoonkogenów, okogenów i antyonkogenów w starzeniu się i unieśmiertelnianiu komórek. Wspomniano w nim o telomerowej hipotezie starzenia się, jako próbie wyjaśnienia zjawiska ograniczonej zdolności do podziałów prawidłowych komórek o niezmiennym kariotypie. Hipoteza ta była i jest przedmiotem intensywnych badań w celu jej weryfikacji. Przez szeroki zakres stosowalności hipotezy obejmujący tak rozległe dziedziny jak gerontologia czy onkologia z pewnością zasługuje na bliższe z nią zapoznanie.

Proces starzenia się komórek w hodowlach tkankowych zaczęto badać, gdy Hayflick i Moorhead obalili mit o nieśmiertelności komórek hodowli prawidłowych stworzony przez Carrela i Ebellinga w latach 1912-1946 [12]. Nowatorskim było nie tyle stwierdzenie, że hodowane przez nich ludzkie fibroblasty mają ograniczoną zdolność do podziałów (limit Hayflicka), ile wykazanie, że komórki te są normalne, nie stransformowane nowotworowo. Zaproponowali oni, że zanik zdolności replikacyjnych nie wynika z błędów metodycznych popełnionych w czasie hodowli, lecz jest związany ze starzeniem się na poziomie komórkowym [13-15]. Obserwacje te zostały potwierdzone w wielu doświadczeniach również w odniesieniu do innych komórek [16-22].

Długość życia *in vitro* normalnych komórek somatycznych wydaje się zależeć od ilości podziałów, nie zaś

### Contents:

- I. Introduction
- II. Telomeres — structure and function
- III. Telomerase
- IV. Telomeres and cell aging *in vitro* and *in vivo*
- V. The telomere hypothesis of cell aging

od bezwzględnego upływu czasu. Komórki takie żyją dowolnie długo w warunkach niesprzyjających podziałom np. w niskiej temperaturze czy przy niedostatecznym stężeniu czynników wzrostowych w środowisku. W warunkach optymalnych komórki dzielą się do uzyskania limitu podziałów, jakby „odliczając” podziały wcześniejsze np. przed zamrożeniem [21, 23-25]. Inaczej zachowują się komórki rozrodcze, nowotworowe i unieśmiertelnione. Te dzielą się nieograniczenie [26].

Co stanowi „licznik podziałów” w normalnych komórkach somatycznych oraz dlaczego nie działa on w komórkach nowotworowych, unieśmiertelnionych czy rozrodczych?

W 1973 r. Olovnikov zwrócił uwagę na fakt, że chromosomy liniowe z każdą rundą replikacyjną tracą fragment DNA na swych końcach (telomerach), co wynika z właściwości polimerazy DNA syntetyzującej tylko w kierunku 5'-3' i wymagającej wolnej grupy 3'-OH DNA lub startera RNA. Jest to zjawisko niepełnej replikacji (*the endreplication problem*, Ryc. 1), która prowadząc do utraty genów może powodować śmierć komórki [27].

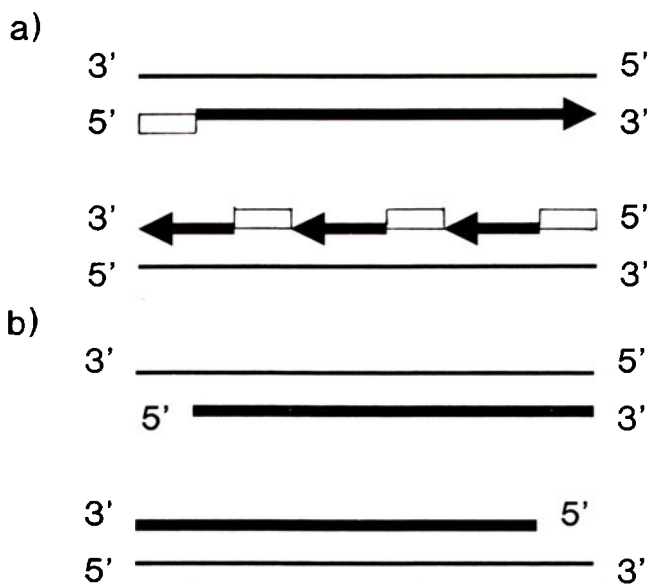
Poniższy artykuł przedstawia propozycję wyjaśnienia mechanizmu ograniczania liczby podziałów komórkowych poprzez niepełną replikację liniowych chromosomów normalnych komórek somatycznych, czego odzwierciedleniem jest ciągłe skracanie telomerów.

### II. Telomery — struktura i znaczenie

Telomery stanowią heterochromatynowy obszar na końcach ramion chromosomów eukariotycznych zawierający odcinki DNA skompleksowane z białkami specyficznymi wiążącymi telomery. Telomerowy DNA

\* Studentka piątego roku biologii molekularnej, Uniwersytet Łódzki, Katedra Biofizyki Molekularnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

\* Ewa Sikora, „Nieśmiertelność, starzenie i śmierć komórek. Rola protoonkogenów, onkogenów i antyonkogenów”, *Post Biochem* (1993) tom 39, str. 212-220.



**Ryc. 1.** Zjawisko niepełnej replikacji liniowych chromosomów.  
 a) Synteza potomnego DNA (szeroka linia) przez polimerazę DNA odbywa się na obu niciach macierzystych (wąska linia) równocześnie. Polimeraza DNA wymaga obecności startera RNA (pusty prostokąt) syntetyzowanego przez prymazę. Na matrycy zorientowanej w kierunku 3'-5' (czyli zgodnie z ruchem widełek replikacyjnych) synteza zachodzi w sposób ciągły (długa strzałka), zaś na matrycy skierowanej przeciwnie — w sposób nieciągły, czyli drogą fragmentów Okazaki (krótkie strzałki).  
 b) Starterowe odcinki RNA są wycinane, a fragmenty potomnego DNA (szeroka linia) łączone w całość dzięki polimerazie DNA. Zapelnione mogą być tylko luki wewnętrzne. Zewnętrzne zostawiają wiszące końce macierzystego DNA, które nie zostało zreplikowane.

charakteryzuje się tandemowo powtarzającymi się, prostymi sekwencjami nukleotydów o dużej zawartości guaniny w nici biegnącej w kierunku t.zw. 5'-3' końca cząsteczki DNA (Tab. 1) [28-36]. Nie wykryto krótkich, tandemowo powtarzających się sekwencji DNA w telomerach stawonogów, mięczaków i szkarłupni [37]. DNA telomerów jest konserwatywny ewolucyjnie, na co wskazywać może niezmiennosc sekwencji (TTAGGG) u kręgowców, oraz telomerowa lokalizacja tej sekwencji bez względu na liczbę czy długość chromosomów [31, 38]. Telomerowy DNA liczy od kilkuset par zasad u drożdży czy orzęsków do kilku tysięcy par zasad u kręgowców [39].

**Tabela 1.**

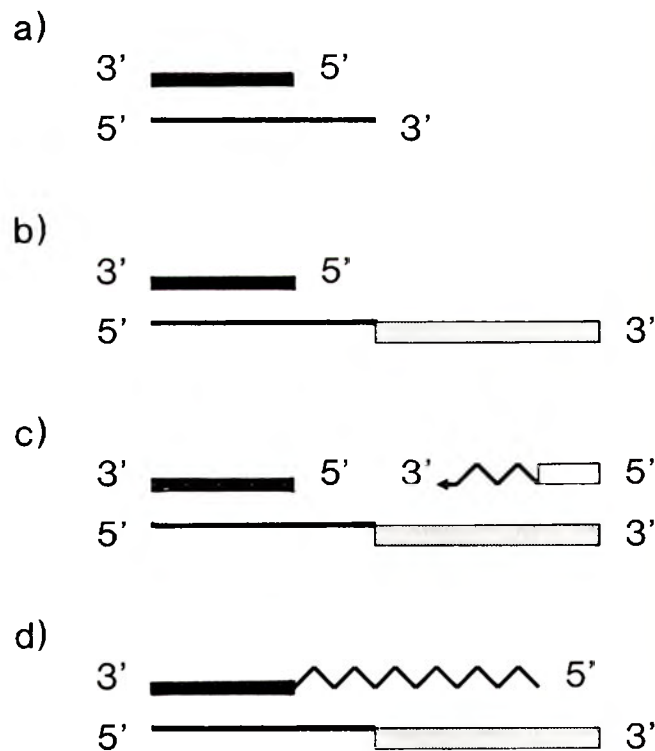
Przykłady powtarzających się sekwencji nukleotydów w telomerach różnych organizmów.

Element powtarzający się	Organizm	Przypisy
G <sub>1-3</sub> T	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[31]
AGGGTT	<i>Homo sapiens</i>	[32]
GGGGTT	<i>Tetrachymena thermophila</i>	[33]
GGGGTTTT	<i>Euplotes crassus</i>	[34]

Telomery wpływają na stabilność chromosomów. Złamane chromosomy, pozbawione naturalnych zakończeń, ulegają fuzji tworząc m.in. dwucentryczne chromosomy [40]. Obecność tej i innych aberracji chromosomowych, w tym strukturalnych i liczbowych, wykazano w hodowli starych fibroblastów ludzkich [13, 18, 20]. Nie stwierdzono fuzji naturalnych chromosomów, czy nawet chromosomów z delecjami w telomerowej sekwencji [41, 42]. Telomery stanowią obronę przed degradacją końców chromosomów. Białka specyficznie wiążące telomery chronią *in vitro* telomerowy DNA przed metylacją i działaniem egzonukleaz pełniąc być może podobną funkcję *in vivo* [43, 44].

Telomery także, oprócz centromerów, biorą udział w kształtowaniu architektury jądra interfazowego przez oddziaływania typu: chromosom-chromosom, chromosom-błona jądrowa [45]. Prawdopodobnie w czasie podziału komórkowego umożliwiają rozdzielanie acentrycznych chromosomów dzięki połączeniu z białkami cytoszkieletu, a dokładniej filamentami pośrednimi: laminami jądrowymi i wimentyną [46, 47].

Telomery pozwalają na pełną replikację chromosomów liniowych. Po degradacji startera RNA (Ryc. 2)



**Ryc. 2.** Rola telomerazy w pełnej replikacji chromosomów liniowych.

a) W wyniku niepełnej replikacji pozostaje wiszący koniec 3' macierzystej nici DNA (wąska linia) tak zwana nić G.  
 b) Telomeraza dosyntetyzuje do nici G sekwencję telomerową (zapelniony prostokąt).  
 c) Przedłużona macierzysta nić DNA staje się matrycą dla prymazy, która prowadzi syntezę starterowego RNA (pusty prostokąt). Dzięki jego obecności polimeraza DNA może rozpocząć nieciągłą syntezę nici (linia łamana) zapleniającej lukę.  
 d) Pierwszy starter RNA ulega degradacji tworząc wiszący koniec 3' nici macierzystej.

pozostaje luka przy końcu 5' potomnej nici długości kilkudziesięciu do kilkuset par zasad (rozmiary startera lub fragmentu Okazaki). Do wiszącego końca 3' macierzystej nici DNA zostaje dosyntetyzowana sekwencja telomerowa w kierunku 5'-3' dzięki telomerazie (patrz niżej) [48, 49] lub na drodze rekombinacji [50] telomerów [51]. Ta wydłużona nić staje się celem ataku prymazy, syntetyzującej starter RNA, dając możliwość polimerazie DNA przeprowadzenia nieciągłej syntezy potomnej nici, która zapełni lukę. Oczywiście ów pierwszy starter RNA ulega degradacji i znów powstaje przerwa na końcu 5' potomnej nici, jednak tym razem dotyczy to sekwencji telomerowej, nie zaś kodującej informację.

W interpretacji wyników badań nad zależnością liczby podziałów komórkowych *in vitro* od długości telomerów pomoże znajomość mechanizmu ich replikacji.

### III. Telomeraza

Za syntezę telomerów odpowiada enzym telomeraza. Jest to polimeraza DNA zależna od RNA (odwrotna transkryptaza), dość nietypowa, gdyż matryca RNA stanowi integralną część enzymu. Potwierdzeniem jest komplementarność sekwencji RNA telomerazy np. 5' CAACCCCAA 3' z *Tetrahymena thermophila* [48] czy 5' CAAAACCCCAAAA 3' z *Euplotes crassus* [49] wobec powtarzających się ich sekwencji telomerowych, odpowiednio: TTGGGG i TTTTGGGG. Zmiany w sekwencji RNA telomerazy np. 5' CGACCCCAA 3' mają odzwierciedlenie w kolejności zasad telomeru 5' GGGGTC 3' [47].

Enzym rozpoznaje telomerowy koniec 3' macierzystej nici DNA bardziej dzięki nietypowej strukturze drugorzędowej zdeterminowanej obecnością reszt guaninowych, niż dzięki sekwencji nukleotydów [52]. Telomeraza nie rozpocznie syntezy, jeśli koniec 3' chromosomu zawiera odcinki bogate w reszty A + T, C, czy o dowolnej kolejności nukleotydów [48, 52]. Ich sekwencja wydaje się jednak istotna ze względu na regulację długości telomerów. Doświadczenia na orzęskach z gatunku *Tetrahymena thermophila* pokazały, że mutacje telomerazowego RNA mogą powodować zarówno skracanie, jak i wydłużanie sekwencji telomerowych. W obu jednak przypadkach ujawnia się ten sam fenotyp: zaburzenia podziałów komórkowych, osłabienie organizmu, starzenie się i śmierć. Można założyć, że w komórkach tych występuje białko regulatorowe specyficznie wiążące nić G, konkurencyjne względem telomerazy. Wtedy zmiana sekwencji telomerowej obniża powinowactwo regulatora do niej faworyzując telomerazę, a tym samym powoduje wydłużanie telomeru [47]. Jeśli więc po każdej rundzie replikacyjnej chromosomy tracą końcowe fragmenty, to znaczy, że nie działa telomeraza, a komórka z każdym podziałem zmniejsza swe szanse na przeżycie pozbywając się kolejnych partii genów.

### IV. Telomery a starzenie się komórek *in vitro* i *in vivo*

Rolę telomerów w pełnej replikacji chromosomów potwierdzają liczne badania. Delecje w telomerowej sekwencji chromosomów muszki owocowej *Drosophila* zakłócają prawidłowy przebieg replikacji [41]. Każda runda replikacyjna wiąże się ze stratą około 2 par zasad, co powoduje ubytek 36-96 par zasad w czasie przypadającym na podwojenie populacji komórek [42].

U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* stwierdzono pojawianie się w późnej fazie S cyklu komórkowego odcinków TG<sub>1-3</sub> [53]. Ich synteza, jak się przypuszcza, przebiega głównie na drodze rekombinacji telomerów [51], choć nie wyklucza się innych sposobów [54]. Nie bez znaczenia jest tu gen *est1* kodujący prawdopodobnie białko wchodzące w skład drożdżowej telomerazy [55, 56], choć nie udało się jak dotąd wykazać aktywności telomerazowej u drożdży *in vivo*. Mutacja *est1*<sup>-</sup> prowadzi do powolnej lecz postępującej utraty terminalnych sekwencji (G<sub>1-3</sub>T)<sub>n</sub> (*ever shorter telomeres*), przy czym większość komórek słabiej dzieli się i umiera [55].

W hodowanych *in vitro* ludzkich, normalnych fibroblastach pobranych od dawców w okresie płodowym, po urodzeniu i aż do ich późnej starości, stwierdzono, że w czasie przypadającym na podwojenie populacji komórek następuje skracanie telomerów o około 2 tysiące par zasad DNA. Przy tym komórki wykonują o 10 podziałów mniej na każdy tysiąc traconych zasad DNA. Jednocześnie całkowita ilość DNA również zmniejsza się, co odsuwa podejrzenie transpozycji [57].

Fibroblasty pacjentów z zespołem Hutchinsona-Gilforda (fenotyp przyspieszonego starzenia się) charakteryzują się mniejszą liczbą podziałów *in vitro* niż kontrolne fibroblasty zdrowych dawców w tym samym wieku. Wykazano, że telomery komórek pacjentów są krótsze w porównaniu z komórkami zdrowych osób [58].

Niewielki, lecz znaczący spadek długości telomerów DNA fibroblastów ludzkich zaobserwowano w czasie starzenia się *in vivo*. U dawców w wieku od 0 do 93 lat stwierdzono spadek 15 ± 6 par zasad na rok (r = -0.43), co daje około 1500 par zasad w ciągu całego życia, czyli prawie 30% telomerowego DNA [58].

Telomery leukocytów krwi obwodowej płodu są średnio o 12 tysięcy par zasad krótsze niż telomery plemników. Analogicznie w przypadku nabłonka błony śluzowej okrężnicy różnica ta wynosi 14 tysięcy par zasad [59].

Można zauważyć zbieżność między długością sekwencji telomerowej a liczbą podziałów komórkowych *in vitro*, jak również zależność: wiek dawcy — długość telomeru.

W odróżnieniu od wyżej przedstawionych danych dotyczących chromosomów komórek somatycznych, długość telomerów plemników nie ulega zmniejszeniu,

lecz nawet w niewielkim stopniu zwiększa się wraz z wiekiem dawcy. W komórkach linii rozwojowej plemników również nie stwierdzono skracania telomerów [58, 55, 35]. Niezmiennosc długości sekwencji telomerowej dotyczy również nowotworowych komórek HeLa, w których wykazano obecność telomerazy [60]. Można się zastanawiać, przez analogię, czy w komórkach linii rozwojowej plemników działa podobny mechanizm rekompensujący straty wywołane niepełną replikacją chromosomów liniowych. Niestety z powodu niedostatecznej czułości metody oznaczania telomerazy, jak również ze względu na trudności w przygotowaniu ekstraktów ze świeżych tkanek nie udało się wykazać aktywności telomerazowej dla komórek rozrodczych [61].

## V. Telomerowa hipoteza starzenia się komórek

Wyniki przedstawionych wyżej badań posłużyły do sformułowania telomerowej hipotezy starzenia się [58, 61, 62]. Zakłada się, że komórki rozrodcze zawierają telomerazę przeciwdziałającą skracaniu telomerów, co gwarantuje przekazywanie z pokolenia na pokolenie chromosomów o tej samej długości. W normalnych komórkach somatycznych telomeraza podlega represji, gdyż nie stwierdza się jej aktywności, a telomery ulegają skróceniu z każdym podziałem komórek *in vitro* i *in vivo*. Gdy ubytek chromosomu jest odpowiednio duży, mówimy wówczas, że osiągnięty zostaje punkt kontrolny podziałów (*checkpoint*) — komórka przestaje się dzielić (*limit Hayflicka*). Nie ma jednak bezpośrednich dowodów na to, że osiągnięcie tego punktu jest spowodowane zmniejszeniem długości telomerów. *Hartley* sugeruje, że być może skracanie sekwencji telomerowej zmienia ważne ze względu na rozdzielanie chromosomów acentrycznych oddziaływania typu: telomery — białka cytoszkieletu [46, 47, 61].

Limit *Hayflicka* może zostać przekroczony, co zaobserwowano w komórkach gryzoni po działaniu mutagenami, karcenogenami i onkogenami jak również w wyniku transfekcji [63, 64]. Częstość uniesmiertelniania tych komórek jest większa niż ludzkich fibroblastów. W przypadku tych ostatnich transformację nowotworową wywołać mogą takie czynniki jak małpi wirus SV40, adenowirusy, ludzki wirus brodawczaka [63, 65, 66]. Wykazano, że w dzielących się komórkach nowotworu płuc, okrężnicy, jajników i nowotworu Wilma telomery ulegają skróceniu. Sekwencje telomerowe DNA komórek badanych nowotworów stanowią od 20 do 90% ilości DNA telomerów normalnych komórek tego samego pacjenta [59]. Mogłoby to oznaczać, że w komórkach, które pod wpływem wcześniej wymienionych czynników przekroczyły punkt kontroli podziałów, telomeraza jest nadal nieaktywna, co prowadzi do dalszych strat materiału genetycznego z każdą rundą replikacyjną. W komórkach nowotworowych HeLa telomery nie ulegają skróceniu, co sugeruje, że nastąpiła tu reaktywacja telomerazy [60].

*Wright* i *Shay* zaproponowali model dwustopniowego mechanizmu komórkowego starzenia się zależny od zmian długości telomerów [66-68]. Komórki hodowane *in vitro* po wykonaniu określonej liczby podziałów przestają dzielić się w wyniku włączenia pierwszego mechanizmu starzenia się M1 (ang. *mortality stage 1*). Zgodnie z hipotezą geny regulujące etap M1 mogą być zlokalizowane w subtelomerowym DNA, który stanowi heterochromatynowy obszar. Jego wielkość według autorów ma być proporcjonalna do długości telomerów. Tym samym utrata terminalnej części chromosomu może prowadzić do zmniejszenia obszaru zajmowanego przez heterochromatynę i uaktywnienia genów włączających M1. Wiadomo, że mechanizm M1 jest regulowany między innymi przez białko RB i białko p53, których inaktywacja umożliwia wejście w fazę S cyklu komórkowego [27, 65, 69-73]. Włączenie pierwszego mechanizmu starzenia się byłoby związane z niemożnością przeprowadzenia inaktywacji tych białek, co ma miejsce w starych komórkach.

Możliwe jest jednak obejście tego etapu przez zastosowanie czynnika, który wiążąc białka RB i p53 inaktywuje je umożliwiając wykonanie dodatkowych podziałów komórkowych. W ten sposób działają białka onkogenne E6 i E7 wirusa papiliomy, białka E1A i E1B wirusa adenomy oraz antygen T wirusa SV40 [63-66, 70, 71]. Ominięcie M1 nie oznacza, że pierwszy mechanizm starzenia się przestał funkcjonować. Pod nieobecność wyżej wymienionych czynników komórka ponownie przestaje się dzielić. Dlatego, aby przekroczyć limit *Hayflicka*, wymagane jest dostarczanie inaktywatorów białek RB i p53. Ominięcie M1 nie uaktywnia telomerazy, co prowadzi do dalszej redukcji materiału genetycznego [59], występowania licznych aberracji chromosomowych i wysokiej śmiertelności wśród tych komórek, które przekroczyły limit *Hayflicka* [14, 19, 21]. Ten kryzys został nazwany drugim mechanizmem starzenia się M2 (ang. *mortality stage 2*) i podobnie jak M1 może zostać ominięty.

Wyłączenie M2 jest prawdopodobnie możliwe dzięki mutacji genu warunkującego w sposób bezpośredni lub pośredni inaktywację represora telomerazy, co przywraca komórkom aktywność telomerazową [70].

Doświadczenia z hybridami otrzymanymi w wyniku fuzji normalnych, ludzkich fibroblastów z ludzkimi komórkami nieśmiertelnych linii pokazały, że fenotyp komórkowego starzenia się jest dominujący. Określono cztery grupy komplementacyjne dla recesywnego fenotypu nieśmiertelności badając szereg różnych nieśmiertelnych linii ludzkich komórek. Nie wykazano zależności między typem komórek, ich pochodzeniem, rodzajem wywoływanego przez nie nowotworu a przynależnością do danej grupy komplementacyjnej. Żadna z badanych linii komórkowych nie należała do więcej niż jednej takiej grupy. Wyniki świadczą o tym, że uniesmiertelnianie zależy od nielicznych, specyficznych genów [27, 74-76].

Biorąc pod uwagę te wyniki zaproponowano tetramerową budowę represora telomerazy [70]. Wyłączenie mechanizmu starzenia się komórek M2 miałyby nastąpić z chwilą wywołanej mutacją inaktywacji choćby jednej z podjednostek represora.

W świetle przedstawionych tu prac starzenie się jest ucieczką przed nowotworzeniem zabezpieczaną w ludzkich komórkach przez dwa różne, niezależnie działające mechanizmy. Ich włączenie według telomerowej hipotezy starzenia się nastąpiłoby po czasie odmierzonym przez liczbę podziałów komórkowych. Wyłączenie zaś wymagałoby zaistnienia równocześnie aż dwóch niezależnych zdarzeń, co może tłumaczyć oporność ludzkich komórek na transformację nowotworową.

Artykuł otrzymano 6 kwietnia 1994 r.

Zaakceptowano do druku 3 czerwca 1994 r.

## Piśmiennictwo

1. Rustig RL (1993) *Świat Nauki* 2: 84-95
2. Olson CB (1987) *Mech Ageing Dev* 41: 1-28
3. Sohal RS (1993) *Aging Clin Exp Res* 5: 3-17
4. Harman D (1992) *Mutation Research* 275: 257-266
5. Sohal RS (1976) *Interdiscipl Topics Gerontol* 9: 25-40
6. Cutler RG (1984) W: Pryor WA (red) *Free Radicals in Biology* 6. Academic Press, New York, str 371-428
7. Saul RL, Gee P, Ames BN (1987) W: Warner HR (red) *Modern Biological Theories of Aging*. Raven Press, New York, str 113-129
8. Richardson A, Birchenall-Sparks MC, Staecker JL (1983) *Rev Biol Res Ageing* 1: 275-294
9. Russell RL (1987) W: Warner HR (red) *Modern Biological Theories of Aging*. Raven Press, New York, str 35-61
10. Toussaint O, Houbion A, Remacle J (1992) *Mech Ageing Dev* 65: 65-83
11. Sen S (1992) *Biol Rev* 67: 287-319
12. Witkowski J (1985) *Trends Biochem Sci* 10: 258-260
13. Hayflick L, Moorhead PS (1961) *Exp Cell Res* 25: 585-621
14. Hayflick L (1965) *Exp Cell Res* 37: 614-636
15. Hayflick L (1992) *Exp Gerontol* 27: 363-368
16. Goldstein S (1990) *Science* 249: 1129-1133
17. Goldstein S (1974) *Exp Cell Res* 83: 297-302
18. Saksela E, Moorhead PS (1963) *Proc Natl Acad Sci USA* 50: 390-395
19. Tuffery AA, Baker SU (1973) *Exp Cell Res* 76: 186-190
20. Sherwood SW, Rush D, Ellsworth JL, Schimke RT (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9086-9090
21. Dell'Orco RT, Mertens JG, Kruse PF (1974) *Exp Cell Res* 84: 363-366
22. Cristofalo VJ, Pignolo RJ, Cianciarulo FL, DiPaolo BR, Rotenberg MO (1992) *Exp Gerontol* 27: 429-432
23. Dell'Orco RT, Merten JG, Kruse PF (1973) *Exp Cell Res* 77: 356-360
24. Brunk U, Ericson JLE, Ponten J, Westermarck B (1973) *Exp Cell Res* 79: 1-14
25. Daniel CW, Young LJT (1971) *Exp Cell Res* 65: 27-32
26. Smith JR, Yi Ning, Pereira-Smith O (1992) *Am J Clin Nutr* 55: 1215S-1221S
27. Olovnikov AM (1973) *J Theor Biol* 14: 181-190
28. Blackburn EH (1990) *Science* 249: 489-490
29. Blackburn EH (1991) *Nature* (Lond) 350: 569-573
30. Szostak JW, Blackburn EH (1982) *Cell* 29: 245-255
31. Moyzis RK, Buckingham JH, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff PL, Wu JR (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6622-6626
32. Greider CW, Blackburn EH (1985) *Cell* 43: 405-413
33. Zakian VA (1989) *Ann Rev Genet* 23: 579
34. Cross SH, Allshire RC, McKay SJ, McGill NI, Cooke HJ (1989) *Nature* (Lond) 338: 771-774
35. Brown WR (1989) *Nature* (Lond) 338: 774-776
36. Kilian A, Kleinhofs A (1992) *Mol Gen Genet* 235: 153-156
37. Biessmann H & Mason JM (1992) *Adv Genetics* 30: 185-249
38. Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7049-7953
39. Murray AW, Szostak JW (1983) *Nature* (Lond) 305: 189-193
40. McClintock B (1940) *Genetics* 26: 234-282
41. Mason JM, Strobel E, Green MM (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6090-6094
42. Biessmann H, Carter SB, Mason JM (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1758-1761
43. Gottschling DE, Zakian VA (1986) *Cell* 47: 195-205
44. Raghuraman MK, Cech TR (1989) *Cell* 59: 719-728
45. Agard DA, Sedat JW (1983) *Nature* (Lond) 302: 676-681
46. Shoeman RL, Wadle S, Scherbath A, Traub (1988) *J Biol Chem* 263: 18744-18749
47. Liang-Yu G, Bradley JD, Attardi LD, Blackburn E (1990) *Nature* (Lond) 344: 126-132
48. Greider CW, Blackburn E (1989) *Nature* (Lond) 337: 331-337
49. Shippen-Lentz D, Blackburn E (1990) *Science* 247: 546-552
50. Putrament A (1980) W: Lasota Z (red) *Biologia molekularna, informacja genetyczna* t2. PWN, Warszawa, str 411-432
51. Wang SS, Zakian VA (1990) *Nature* (Lond) 345: 456-458
52. Greider CW, Blackburn E (1987) *Cell* 51: 887-898
53. Wellinger RJ, Wolf AJ, Zakian VA (1993) *Cell* 72: 51-60
54. Lundblad V, Blackburn E (1993) *Cell* 73: 347-360
55. Lundblad V, Szostak JW (1989) *Cell* 57: 633-643
56. Lundblad V, Blackburn E (1990) *Cell* 60: 529-530
57. Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) *Nature* (Lond) 345: 458-460
58. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai V, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10114-10118
59. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC (1990) *Nature* (Lond) 346: 866-868
60. Morin GB (1988) *Cell* 59: 521-529
61. Harley CB (1991) *Mutation Res* 256: 271-282
62. Harley CB, Vaziri H, Counter M, Allsopp RC (1992) *Exp Gerontology* 27: 375-382
63. Shay JW, Wright WE, Werbin H (1991) *Biochim Biophys Acta* 1072: 1-7
64. Meek RL, Bowman PD, Damek CW (1977) *Exp Cell Res* 107: 277-284
65. Shay JW, Wright WE (1989) *Exp Cell Res* 184: 109-118
66. Wright WE, Shay JW (1992) *Exp Gerontol* 27: 383-389
67. Wright WE, Shay JW (1992) *Trends Genet* 8: 193-197
68. Shay JW, Wright WE, Werbin H (1993) *Int J Oncol* 3: 559-563
69. Warner HR, Campisi J, Cristofalo VJ, Miller RA, Papaconstantinou J, Pereira-Smith O, Smith JR, Wang E (1992) *J Gerontol* 47: B182-B189
70. Shay JW, Van Der Haegen BA, Ying Y, Wright WE (1993) *Exp Cell Res* 209: 45-52
71. Shay JW, Pereira-Smith O, Wright WE (1991) *Exp Cell Res* 196: 33-39
72. Kirschner M (1992) *Trends Biochem Sci* 17: 281-285
73. Grzelakowska-Sztabert B (1992) *Post Biochem* 38: 98-107
74. Pereira-Smith O, Smith JR (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6042-6046
75. Pereira-Smith O, Smith JR (1983) *Science* 221: 964-966
76. Pereira-Smith O (1992) *Exp Gerontol* 27: 441-445

# Mechanizmy działania antysensownych oligodeoksyrybonukleotydów

## Antisense oligodeoxyribonucleotides — mechanisms of action

ARKADIUSZ SZKLARCZYK\*

### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Rozpoznawanie sekwencji docelowej przez antysensowne oligodeoksyrybonukleotydy (asODN)-hybrydyzacja asODN z RNA
  - II-1. Powinowactwo asODN do RNA
  - II-2. Specyficzność rozpoznania sekwencji docelowej
- III. Mechanizmy oddziaływania antysensownych ODN z mRNA
  - III-1. Sekwencje regulujące metabolizm RNA jako cel dla asODN
    - III-1-a. Sekwencje uczestniczące w cięciu i składaniu pre-mRNA
    - III-1-b. Rejon 5'UTR mRNA
    - III-1-c. Rejon 3'UTR mRNA
    - III-1-d. Zahamowanie translacji
  - III-2. Aktywacja RNazy H za pomocą asODN
- IV. Wybór optymalnej sekwencji mRNA jako miejsca oddziaływania z asODN
- V. Podsumowanie

**Wykaz stosowanych skrótów:** AMV — avian mieloblastoma virus; asODN — antysensowne oligodeoksyrybonukleotydy; BP — punkt rozgałęzienia w procesie cięcia i składania pre-mRNA; eIF — eukariotyczny czynnik inicjujący translację; HSV — herpes simplex virus; IE — geny wczesne; MMLV — murine Moloney leukemia virus; M-ODN — metylofosforanowy analog ODN; nt — nukleotydy; O-ODN — oligodeoksyrybonukleotyd; RNaza H — rybonukleaza H; S-ODN — tiofosforanowy analog ODN; TAT — białko transaktywujące oddziałujące z sekwencją TAR; TAR — sekwencja regulująca transkrypcję genów wirusa HIV; Tm — temperatura topnienia; 5'ss — sekwencja donorowa w procesie cięcia i składania pre-mRNA; 3'ss — sekwencja akceptorowa; 5'UTR — rejon nieulegający translacji 5' mRNA; 3'UTR — rejon nieulegający translacji 3' mRNA.

### I. Wprowadzenie

Antysensowne oligodeoksyrybonukleotydy (asODN) są to chemicznie zsyntetyzowane związki o długości 10-30 nukleotydów. AsODN znalazły zastosowanie jako związki selektywnie blokujące ekspresję genów poprzez oddziaływanie z mRNA. Istota ich działania polega na wysoce swoistym połączeniu (hybrydyzacji) z odpowiadającą im sensowną sekwencją RNA. Miejsce hybrydyzacji determinuje następne etapy działania asODN. Na przykład połączenie z sekwencją regulato-

### Contents:

- I. Introduction
- II. Target sequence recognition by antisense oligodeoxyribonucleotides (asODN)-hybridization of a asODN with RNA
  - II-1. AsODN affinity to RNA
  - II-2. Specificity of target sequence recognition
- III. Mechanisms of asODN interacting with mRNA
  - III-1. Regulatory sequences of RNA as a target for asODN
    - III-1-a. Sequences of pre-mRNA involved in splicing
    - III-1-b. 5'UTR mRNA region
    - III-1-c. 3'UTR mRNA region
    - III-1-d. Translational arrest
  - III-2. RNase H activation by asODN
- IV. Choice of optimal sequence of mRNA as a place of interaction with asODN
- V. Summary

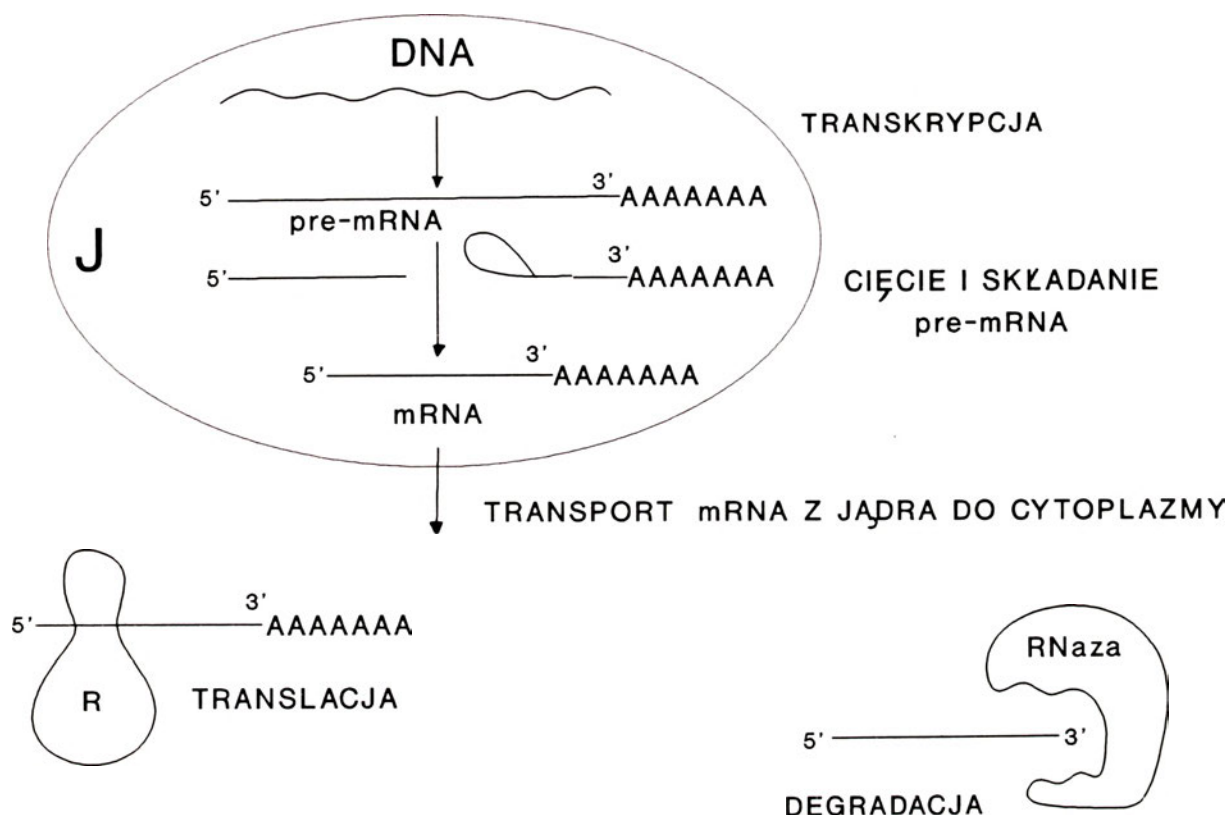
rową może zablokować dostęp właściwego ligandu (np. białka) i zaburzyć proces cięcia i składania pre-mRNA (ang. *splicing*), jego transport, stabilność, przebieg translacji (Ryc. 1). Niektóre asODN charakteryzują zdolność aktywowania enzymu komórkowego RNazy H mogącego przeciąć RNA w miejscu hybrydyzacji asODN.

Analogi asODN otrzymuje się w wyniku modyfikacji wiązania fosfodwuestrowego, deoksyrybozy oraz zasad purynowych i pirymidynowych. Otrzymane analogi asODN różnią się wieloma cechami, takimi jak: stabilność, zdolność wnikania do komórek, parametry hybrydyzacji oraz mechanizmy działania i efekty toksyczne [1]. Jediną wspólną cechą analogów asODN jest wysoce specyficzne oddziaływanie z RNA zgodne z zasadą komplementarności. Rycina 2 przedstawia budowę kilku, najlepiej scharakteryzowanych w układach biologicznych, analogów ODN. Inne często stosowane modyfikacje asODN polegają na dołączeniu różnych związków chemicznych np. cholesterolu (ułatwia wnikanie do komórek), akrydyny (zwiększa siłę wiązania z RNA) [1].

Idea wpływania na ekspresję genów za pomocą związków antysensownych narodziła się ponad dwadzieścia pięć lat temu, jednakże dopiero w ostatnim czasie asODN zyskały rangę narzędzia badawczego. AsODN okazały się skuteczne *in vitro*, w hodowlach komórkowych a także w różnych układach *in vivo*.

\* Student AM w Warszawie, Pracownia Hodowli Komórek i Tkanki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa





Ryc. 1. Metabolizm RNA w komórce eukariotycznej. Podczas transkrypcji następuje przepisanie informacji genetycznej DNA na pierwotny transkrypt (pre-mRNA). Pre-mRNA podlega przemianie potranskrypcyjnej polegającej na wycinaniu intronów i składaniu eksonów w układ charakterystyczny dla mRNA. Dojrzałe mRNA transportowane jest do cytoplazmy gdzie następuje translacja czyli synteza białka. Kolejnym ważnym procesem w metabolizmie mRNA jest jego degradacja. Wszystkie wymienione procesy podlegają złożonej regulacji czasowej i przestrzennej. C — cytoplazma; J — jądro komórkowe; R — rybosom; RNaza — rybonukleaza.

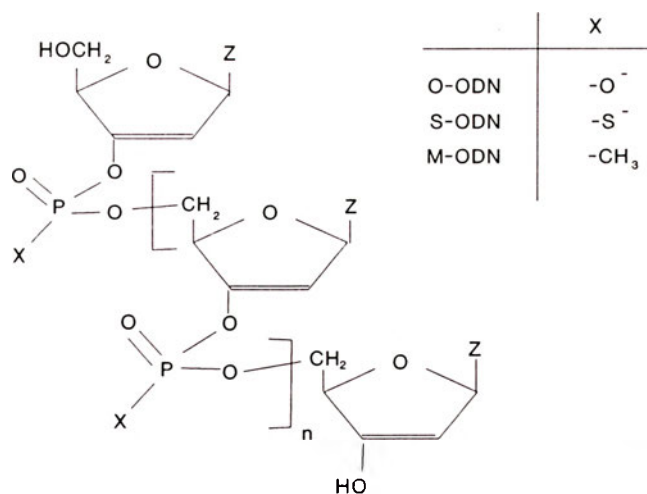
Czynione są próby zastosowania asODN w leczeniu, np. jako cytostatyków. Szczegółowe poznanie mechanizmów działania, parametrów farmakokinetycznych oraz efektów ubocznych zadecyduje o możliwości syntezy związku w pełni swoistego, aktywnego i bezpiecznego.

## II. Rozpoznawanie sekwencji docelowej przez asODN-hybrydyzacja asODN z RNA

Pierwszym etapem oddziaływania asODN jest jego połączenie z docelowym RNA czyli hybrydyzacja. Powstała hybryda powinna być odpowiednio stabilna, co zależy od powinowactwa asODN z docelową sekwencją RNA. Równie istotna jest specyficzność rozpoznania sekwencji docelowej. Jedynie w takiej sytuacji asODN będą wpływały wyłącznie na ekspresję wybranego genu. Oba parametry hybrydyzacji: powinowactwo i specyficzność zależą od wielu czynników, z których część może podlegać pełnej kontroli doświadczalnej. Miarą obu parametrów jest temperatura topnienia ( $T_m$ ) hybrydy asODN-RNA, czyli temperatura, w której połowa asODN jest połączona z RNA (im bardziej stabilne wiązanie asODN:RNA tym wyższa  $T_m$ ) i zmiana wolnej energii hybrydy  $\Delta G$ .

### II-1. Powinowactwo asODN do RNA

Powinowactwo ODN do RNA wynika z możliwości utworzenia wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi zasadami purynowymi i pirymidynowymi zgodnie z zasadą Watsona i Cricka oraz powstania



Ryc. 2. Budowa najczęściej stosowanych analogów ODN. O-ODN — oligodeoksyrybonukleotyd; S-ODN — tiofosforanowy analog ODN; MP-ODN — metylofosforanowy analog ODN.

układu przestrzennego zasad o korzystniejszej energii wewnętrznej. Reakcja ta zależy od szeregu zmiennych takich jak: warunki reakcji (np. temperatura i siła jonowa roztworu), długość i budowa oddziałujących cząsteczek. Minimalna długość antysensownego ODN konieczna do osiągnięcia specyficzności hybrydyzacji (rozdz. II-2) wynosi zwykle około 12-14 nukleotydów.

Budowa chemiczna ODN ma znaczny wpływ na powinowactwo wobec mRNA. Dla przykładu  $T_m$  hybrydy O-ODN (GCT CTC TGG C) z RNA wynosi  $51^\circ\text{C}$  ( $\Delta G$ -11.2 kcal/mol), natomiast hybrydy 2'-O-metylo-ODN (GCU CUC UGG C) z RNA  $68.1^\circ\text{C}$  ( $\Delta G$ -18.6 kcal/mol) [2]. Różnica powinowactwa dwóch najczęściej stosowanych analogów O-ODN i S-ODN, wyrażona przez temperaturę topnienia  $T_m$ , wynosi  $1/2^\circ\text{C}$  na wiązanie na korzyść pierwszego. Oznacza to, że O-ODN tworzy z RNA trwalszą hybrydę, niż S-ODN [1]. Zwiększenie powinowactwa można osiągnąć poprzez odpowiednią modyfikację ODN, np. przez przyłączenie związku interkalującego (np. akrydyny), dostarczającego dodatkową energię wiązania. W pewnych warunkach jednak zbyt wysokie powinowactwo może zmniejszać specyficzność reakcji (rozdz. II-2).

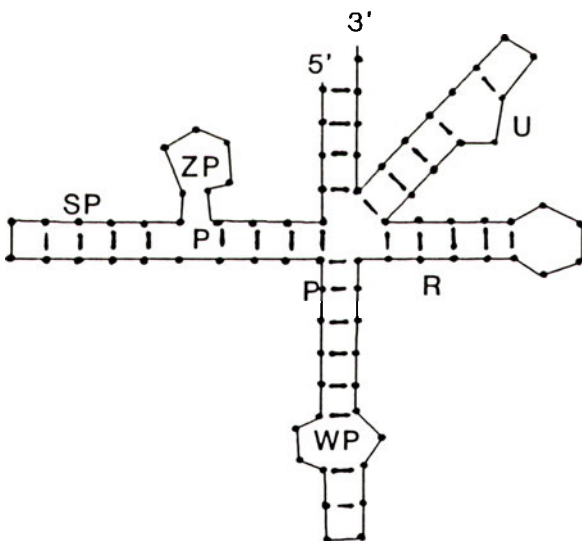
Znaczący wpływ na powinowactwo ODN wobec

RNA ma struktura RNA. RNA jest cząsteczką o złożonej konfiguracji przestrzennej. W wyniku międzycząsteczkowych oddziaływań powstają struktury drugorzędowe typu szpilki do włosów (*hairpin*), pnia (*stem*), złącza (*junctions*), wybrzuszenia (*bulges*), wewnętrznej pętli (*internal loop*) czy pseudowęzła (*pseudoknots*) (Ryc. 3).

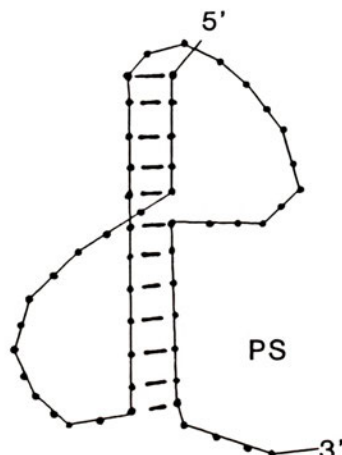
Przy założeniu, że wiązanie z RNA następuje tylko w wyniku oddziaływań typu Watsona-Cricka, czyli, że jednoniciowy ODN hybryduje z ciągłą sekwencją pojedynczej nici RNA istnieje kilka możliwych sytuacji:

- 1) ODN reaguje z naturalnym jednoniciowym fragmentem RNA
- 2) ODN konkuruje z jedną nicią struktury dwuniciowej o połączenie z drugą nicią RNA jeśli struktura ta ulega rozpleceniu w dowolnej sytuacji fizjologicznej.
- 3) reakcja z asODN zaburza trwałą strukturę RNA, co wymaga dostarczenia dodatkowej energii, zatem asODN musi wykazywać wyższe powinowactwo wobec RNA niż naturalna sekwencja.

Wydaje się jednak, że reguły rządzące oddziaływaniami pomiędzy ODN i mRNA są bardziej skomplikowane niż przedstawione wyżej sytuacje. Przykładem niech będą wyniki doświadczenia przeprowa-



- SP - SZPILKA DO WŁÓSÓW
- ZP - ZEWNĘTRZNA PĘTLA
- P - PIĘĆ
- R - ROZGAŁĘZIENIE
- U - UWYPUKLENIE
- WP - WEWNĘTRZNA PĘTLA
- PS - PSEUDOWĘZEŁ



Ryc. 3. Struktury drugorzędowe RNA.

dzonęgo *in vitro*, w którym badano wiązanie asODN z różnymi odcinkami syntetycznego RNA o strukturze szpilki do włosów [3]. Sekwencja docelowa dla asODN miała strukturę pnia, pętli lub obu fragmentów jednocześnie. Okazało się, że powinowactwo asODN wobec odcinka jednoniciowego RNA przy końcu 5' pętli i w środku pętli jest takie jak wobec kontrolnego (sensownego) jednoniciowego ODN. Z kolei ODN komplementarne z sekwencją jednoniciową końca 3' pętli, pnia (sekwencja dwuniciowa) lub sekwencją w miejscu przejścia struktury pnia w strukturę pętli (sekwencja mieszana jedno- i dwuniciowa), hybrydyzowały  $10^6$  razy słabiej. Interesujące jest, że sama obecność w pełni komplementarnej sekwencji jednoniciowej (koniec 3' pętli) nie zapewnia odpowiedniego powinowactwa, równie ważne jest jej umiejscowienie w cząsteczce RNA. Możliwe jest, że przyłączenie ODN zmienia konfigurację przestrzenną RNA i jedynie w części przypadków energia wewnętrzna nowego układu jest korzystna.

Ilustracją drugiej sytuacji może być doświadczenie, w którym uzyskano efektywną hybrydyzację asODN komplementarnego z sekwencją U6 RNA odpowiedzialną za połączenie z U4 RNA [4]. W naturze U6 i U4 RNA hybrydują ze sobą na kilku odcinkach podczas formowania aktywnego kompleksu w procesie cięcia i składania pre-mRNA. W doświadczeniu asODN efektywnie współzawodniczyły z U4 RNA o związanie się z sekwencjami U6 RNA.

Przyjmuje się, że wiele sekwencji RNA zdolnych do wiązania białek regulatorowych, zawiera trwałe, konserwatywne ewolucyjnie struktury przestrzenne, stabilizowane dodatkowo przez wiązające się z nimi białka. Zmiana konfiguracji takiej sekwencji, np. po hybrydyzacji z asODN, może hamować działanie białka regulatorowego. Przykładem takich oddziaływań jest sekwencja regulatorowa TAR znajdująca się w każdym mRNA wirusa HIV-1. Z sekwencją tą wiąże się białko transaktywujące TAT, co powoduje zwiększenie ekspresji genów wirusowych. Sekwencja TAR tworzy pętle (6 nukleotydów, nt), krótki pień (4 nt) i wewnętrzne wyrzucenie (3 nt). Rozplecenie krótkiego pnia umożliwia powstanie jednoniciowej struktury o długości 17 nt. Koszt energetyczny takiej reakcji wynosi 5.2 kcal/mol, podczas gdy koszt rozplecenia kolejnego fragmentu pnia (3 nt) i powstania pętli o długości 23 nt wynosi 12.3 kcal/mol [5]. Zatem w przypadku sekwencji TAR dostarczenie już niewielkiej energii np. przez związanie asODN o wysokim powinowactwie z RNA, umożliwia powstanie sekwencji oddziałującej z asODN. Wykazano także, że anty-TAR-ODN skutecznie hamują ekspresję genów wirusowych i replikację wirusa HIV-1 *in vivo* [6].

Cząsteczka RNA, transportowana poprzez różne przedziały komórkowe o odmiennych własnościach fizyko-chemicznych, podlegać może różnorodnym przemianom w wyniku zmian środowiska fizycznego, oddziaływania z białkami i innymi RNA, dojrzewania,

translacji, degradacji. Podczas translacji rybosomy przesuujące się wzdłuż cząsteczki mRNA destabilizują jego strukturę drugorzędową. Ograniczone zdolności rozplatania struktury drugorzędowej rejonu 5'UTR (ang. *5' untranslated region*) wykazuje kompleks preinicjujący 43S (rozdz. III). Wydaje się, że wszystkie te zjawiska mogą wpływać na przebieg hybrydyzacji. Jednakże słabe ich poznanie stoi na przeszkodzie w pełni kontrolowanego zastosowania asODN w regulacji ekspresji genów.

## II-2. Specyficzność rozpoznania sekwencji docelowej RNA przez asODN

Specyficzność hybrydyzacji asODN i RNA pojmowana jest jako zdolność rozpoznania jedynej, w pełni komplementarnej sekwencji mRNA i oparta jest na zasadzie komplementarności Watsona-Cricka. A, T, G, C asODN łączą się odpowiednio z U, A, C, G RNA. Teoretycznie przy odpowiednio długiej sekwencji RNA układ nukleotydów w sekwencji jest niepowtarzalny (a więc charakterystyczny dla danego genu). Zatem asODN w pełni komplementarny do tej sekwencji powinien oddziaływać tylko z wybranym mRNA. Minimalna długość ODN rozpoznającego swoiście wybrane mRNA w komórce ludzkiej wynosi 11-15 nukleotydów (nt) a zależy od składu zasad ODN (11 w przypadku ODN zawierającego wyłącznie nukleotydy G i C, 15 w przypadku ODN zawierającego jedynie A i T; różnica wynika z przewagi A i T nad G i C w genomowym DNA) [7]. Wydaje się, że jest to jednocześnie długość optymalna. Przy zwiększeniu długości ODN prawdopodobieństwo rozpoznania innej sekwencji maleje. Jednakże istnieje możliwość hybrydyzacji fragmentu ODN z mRNA (ODN o długości 20 nt to jednocześnie 9 różnych ODN o długości 12 nt itd., każdy z tych odcinków może hybrydyzować z komplementarną sekwencją [8]).

Możliwa jest też hybrydyzacja z błędami (połączenie niezgodne z zasadą komplementarności). Warunki doświadczenia powinny zatem sprzyjać procesowi swoistej hybrydyzacji oraz ograniczać reakcje niespecyficzne (patrz niżej).

Teoretyczna długość zapewniająca swoistość asODN odnosi się do układu doskonałego, tj. takiego, w którym RNA i ODN istnieją w formie jednoniciowej, a sekwencje docelowe RNA są jednakowo dostępne i jednakowo ważne (uruchamiające mechanizmy efektorowe). W rzeczywistości specyficzność wynika z warunków doświadczenia oraz parametrów danego układu i zależy od analogu, długości i stężenia ODN oraz jego powinowactwa do sekwencji docelowej.

Wykazano, że poprzez odpowiedni dobór stężenia asODN oraz ich długości można zwiększyć swoistość działania pięciokrotnie [2]. W doświadczeniu porównywano asODN o długości 17 nt (komplementarny wobec sekwencji od nukleotydu 27 do 43 mRNA genu *Ha-ras*), 15 nt (28-42) i 19 nt (26-44) w stosunku do

mRNA prawidłowego i zmutowanego genu *Ha-ras*. Najbardziej skuteczny (hamowanie ekspresji genu docelowego) był asODN o długości 19 nt, ale jednocześnie działał najmniej specyficznie (hamował ekspresję obu genów, zmutowanego i prawidłowego). AsODN o długości 15 nt działał wyłącznie na zmutowany gen, ale jego skuteczność była 8-krotnie niższa od poprzedniego. Najbardziej swoiście i skutecznie działał asODN o długości 17 nt, jednakże jego specyficzność bliska 100% przy stężeniu 100nM malała do 60% przy stężeniu 2.5 raza większym.

Specyficzność staje się podstawowym problemem w sytuacji, gdy celem dla asODN jest gen różniący się od genu prawidłowego sekwencją zmutowaną w wyniku mutacji punktowej. W takim przypadku jedynie wybór sekwencji zmutowanej może zapewnić odpowiednią selektywność działania asODN. Zamiana G na T w 12 kodonie protoonkogenu *Ha-ras* prowadzi do wbudowania glicyny w miejscu waliny w białko Ras i powstania białka onkogenego. Połączony z akrydyną asODN o długości 9 nukleotydów, komplementarny z sekwencją obejmującą 10, 11 i 12 kodon mRNA onkogenu *Ha-ras* hamował ekspresję tego genu, podczas gdy ekspresja protoonkogenu *Ha-ras* pozostała niezmienną [9, 10]. AsODN powodował zahamowanie proliferacji komórek T24 raka pęcherza moczowego (mających zmutowany protoonkogen *Ha-ras*) [9], podczas gdy wzrost komórek HBL100 zawierających dwie kopie dzikiego genu *Ha-ras*, pozostawał niezaburzony.

Niepełna komplementarność asODN i sekwencji docelowej powinna uniemożliwiać ich połączenie. Destabilizująca wartość mutacji zależy od jej rodzaju i miejscowienia. Koszt energetyczny zamiany G na A wynosi  $-3.6 \Delta T_m$  ( $^{\circ}\text{C}$ , różnica w temp. topnienia), podczas gdy zamiana C na G  $-19.4 \Delta T_m$  [2]. Korzystając z tej prawidłowości, w przypadku obecności kilku zmutowanych punktowo sekwencji mRNA, można wybrać sekwencję z mutacją, która zapewni największą specyficzność. Zgodnie z przewidywaniem delekcje nukleotydów w środku sekwencji bardziej destabilizują hybrydę, niż delekcje umiejscowione na krańcach sekwencji.

Odmienne ocenę specyficzności działania asODN sugerują wyniki doświadczenia z użyciem żabich oocytów, do których wstrzyknięto egzogenne mRNA [8]. Porównano efekt asODN w pełni i częściowo komplementarnych z badaniami mRNA. Okazało się, że asODN działały również przy niepełnej komplementarności. Jednak warunki doświadczenia, takie jak temperatura ( $23^{\circ}\text{C}$ ), czy wybór miejsca mutacji (jedynie na krańcach asODN), zdecydowanie sprzyjały oddziaływaniom niespecyficznym.

Przedstawione wyżej prawidłowości dotyczą sytuacji, w których hybrydyzacja przebiega według zasady komplementarności Watsona i Cricka pomiędzy ciągłymi sekwencjami. Połączenie asODN z RNA może także zaistnieć w wyniku utworzenia potrójnej helisy

między dwuniciowym pniem i jednoniciowym ODN [11]. Poza tym asODN może hybrydyzować z sekwencją nieciągłą np. z krótkimi jednoniciowymi sekwencjami poprzedzielanymi odcinkami o strukturze szpilki do włosów. Trudno jest obecnie ocenić, jak bardzo zjawiska takie mogą wpływać na swoistość działania asODN.

Podsumowując, skuteczne i swoiste połączenie asODN z mRNA to pierwszy etap działania antysensownych oligodeoksyrybonukleotydów. Zależy ono od ich powinowactwa do docelowej sekwencji RNA. Nie wszystkie sekwencje RNA są równie dostępne dla asODN. Specyficzność hybrydyzacji może ulec poprawie poprzez dobór sekwencji RNA oraz długości i stężenia asODN.

### III. Mechanizmy oddziaływania antysensownych ODN z mRNA

Swoista i skuteczna hybrydyzacja zapoczątkowuje kolejne etapy oddziaływania asODN z sekwencjami mRNA. Jednym z głównych mechanizmów końcowych jest współzawodnictwo z naturalnym ligandem np. czynnikami montażu mRNA, białkami aktywującymi translację, rybosomami, o związanie z odpowiednią sekwencją mRNA. Innym mechanizmem jest aktywacja RNazy H, enzymu hydrolizującego RNA w hybrydzie ODN-RNA.

#### III-1. Sekwencje regulujące metabolizm RNA jako miejsce docelowego działania asODN

##### III-1-a. Sekwencje pre-mRNA uczestniczące w cięciu i składaniu pre-mRNA

Proces cięcia i składania pre-mRNA (ang. *splicing*) polega na wycięciu intronów i połączeniu eksonów w układ sekwencji stanowiący dojrzałe mRNA [12]. Jest to proces wysoce specyficzny i zależny od działania złożonego układu molekularnego, w skład którego wchodzi peptydy i RNA tworzące U snRNP (ang. *U small nuclear ribonucleoproteins*) oraz inne czynniki regulatorowe. SnRNA (ang. *small nuclear RNA*) rozpoznają (poprzez specyficzną hybrydyzację) kluczowe sekwencje pre-mRNA: 5'ss i 3'ss (ang. *5' splicing site*), leżące odpowiednio na granicy ekson-intron i intron-ekson, a zatem określające pozycje intronu (5'-intron-3') oraz sekwencje BP (ang. *branching point*). Rozpoznanie miejsca 3'ss rozpoczyna kaskadę reakcji umożliwiających odpowiednie zorientowanie cząsteczki pre-mRNA, przecięcie jej w 5'ss, tymczasowe połączenie 5'ss z BP i końcowe połączenie sąsiadujących eksonów.

Wykazano, że asODN komplementarne z wybranymi sekwencjami snRNA skutecznie blokują proces cięcia i składania pre-mRNA *in vitro* [4, 13, 14].

Wyniki innych doświadczeń wskazały na możliwość zahamowania ekspresji genów za pomocą asODN

swoiście wpływających na proces cięcia i składania pre-mRNA [15, 16]. Zastosowano M-ODN (metylofosforanowy analog) komplementarny z 5' ss pre-mRNA genu wczesnego 4 (IE-4) wirusa opryszczki (HSV-1). Nieprawidłowej wielkości mRNA IE-4 (z dodatkowym fragmentem intronu) stanowił ok. 20% ogólnej ilości transkryptu tego genu. Jednocześnie obserwowano prawie całkowite zahamowanie syntezy białek wirusowych i replikacji wirusa. Obserwowany efekt był wysoce specyficzny w odniesieniu do badanej sekwencji (asODN do przypadkowej sekwencji intronu nie miały żadnego efektu), jak i w odniesieniu do wirusa (asODN nie hamowały replikacji wirusa HSV-2, pomimo że homologia sekwencji docelowej wynosiła 65%). Podobne wyniki uzyskano stosując asODN komplementarne z sekwencją 3' ss pierwotnych transkryptów genów IE-22 i IE-47 wirusa HSV-1 [17].

W jednej z rzadkich form  $\beta$ -talasemii (choroba wywołana nieprawidłową strukturą łańcucha  $\beta$  hemoglobiny) mutacja punktowa w drugim intronie genu  $\beta$ -globiny tworzy nieprawidłowe sekwencje 5' ss oraz aktywuje ukryte sekwencje 3' ss. W takiej sytuacji aparat cięcia i składania pre-mRNA wykorzystuje zarówno prawidłowe sekwencje ss, jak i nowo powstałe w wyniku mutacji. Powoduje to powstanie transkryptów: prawidłowych i nieprawidłowych w proporcji 1:2. 2'-O-metylooligorybonukleotydy komplementarne z błędnymi sekwencjami 3' ss lub 5' ss przywarły prawidłowy proces cięcia i składania pre-mRNA  $\beta$ -globiny [18]. Prawdopodobnie asODN po hybrydyzacji ze zmutowanymi sekwencjami i utworzeniu stabilnej struktury drugorzędowej blokowały dostęp czynników montażu do błędnych sekwencji ss, co umożliwiło wykorzystanie sekwencji prawidłowych.

### III-1-b. Rejon nieulegający translacji 5'RNA

Eukariotyczne mRNA oraz RNA niektórych wirusów zawierają rejon niekodujący w pozycji 5' od kodonu startowego (ang. 5' *untranslated region*, 5'UTR) zakończony strukturą czapeczki (ang. *cap*). Odpowiedzialny jest on za stabilność RNA w jądrze komórkowym, regulację wycięcia pierwszego intronu, transport mRNA z jądra do cytoplazmy oraz inicjację translacji [19]. W obrębie tej sekwencji powinny się zatem znajdować miejsca rozpoznawane przez czynniki regulujące wyżej wymienione procesy. Efekt asODN byłby wynikiem ich współzawodnictwa z naturalnymi czynnikami regulatorowymi o miejsce wiązania. Zaznaczyć należy, że choć efekty anty-5'UTR-ODN, takie jak zmiana stabilności mRNA, zaburzenie obróbki pierwszego intronu i transportu mRNA z jądra do cytoplazmy są bardzo prawdopodobne, jak dotąd brak bezpośrednich dowodów na ich obecność.

Pierwszym etapem procesu inicjacji translacji jest połączenie białkowego czynnika inicjującego translację eIF-4F (ang. *eukaryotic initiation factor 4F*) ze

strukturą czapeczki. Umożliwia to oddziaływanie z rejonem 5'UTR innych czynników eIF-4A i eIF-4B i aktywację kompleksu preinicjującego 43S (podjednostka 40S rybosomu z czynnikiem eIF-2 oraz Met-tRNA<sup>Met</sup>). Aktywny kompleks preinicjujący przesuwa się w kierunku 3', aż napotka kodon startowy. Przyłączenie podjednostki 60S umożliwia rozpoczęcie translacji [20].

Przyjmuje się, że podstawowy proces inicjacji translacji może być dodatkowo regulowany. Dobrze poznana jest regulacja translacji mRNA ferrytyny (białka magazynującego żelazo) [20, 21]. W rejonie 5'UTR (ok. 30-40 nt od czapeczki) znajduje się sekwencja o konfiguracji szpilki do włosów IRE (ang. *iron responsive element*) miejsce wiązania białka IRE-BP (ang. IRE binding protein). Na oddziaływanie IRE-BP z mRNA wpływają jony Fe<sup>2+</sup>. Zahamowanie inicjacji translacji zależy od stabilizacji struktury IRE przez białko (przy niskim stężeniu Fe<sup>2+</sup>), co uniemożliwia prawidłowe oddziaływanie czynników inicjujących i kompleksu 43S z RNA. Z innych badań wynika, że samo istnienie rejonu o strukturze przestrzennej wyższego rzędu (bez stabilizującego białka, o energii do  $\Delta G < -50$  kcal/mol) nie blokuje inicjacji translacji, jeśli miejsce jego powstania znajduje się w kierunku 3' od miejsca przyłączenia kompleksu 43S. Wynika to z aktywności helikazowej (rozplatającej) kompleksu preinicjującego.

Można wyróżnić kilka mechanizmów oddziaływania asODN w rejonie 5'UTR. W szczególności hybrydyzacja asODN:

1. zmienia strukturę przestrzenną odcinka RNA i zaburza przyłączanie podstawowych czynników inicjujących translację;

2. blokuje przyłączanie białek regulatorowych (aktywatorów lub represorów). Mechanizm pierwszy może być uniwersalny, drugi zaś specyficzny dla określonej populacji mRNA.

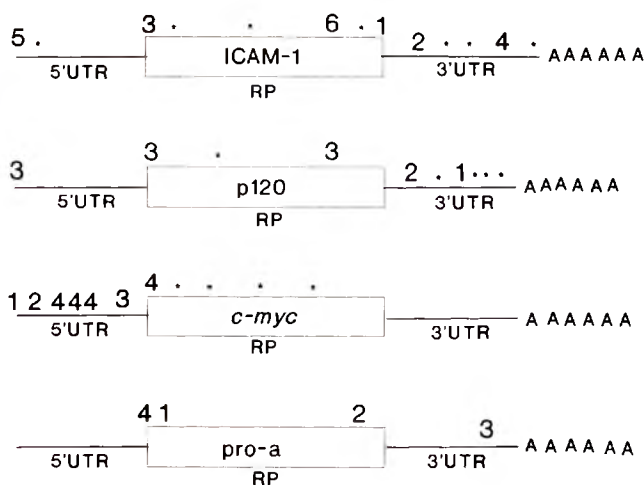
W jednym z doświadczeń badano oddziaływanie pomiędzy czynnikami inicjującymi translację, rejonem 5'UTR mRNA reowirusów a asODN. ODN komplementarne wobec pierwszych 15 nukleotydów tej sekwencji hamowały wiązanie podjednostki  $\alpha$  czynnika eIF-4F z czynnikami eIF-4A oraz eIF-4B [22]. W innym doświadczeniu wykazano, że asODN do końcowych sekwencji rejonu 5'UTR syntetycznego RNA i wystające kilka nukleotydów poza czapeczkę powodowało zaś hamowanie wiązania czynnika eIF-4E do RNA. W tym przypadku efekt ten był zależny od liczby i rodzaju nukleotydów wystających poza koniec 5'RNA [23].

W ostatnim czasie zidentyfikowano sekwencje regulatorowe RNA wirusa HIV-1 np. TAR i RRE, wiążące odpowiednio białka transaktywujące TAT i REV. TAT po połączeniu z TAR nasila transkrypcję RNA wirusowego. Wykazano, że asODN komplementarne z sekwencją TAR (rozd. II-1) blokował ekspresję genów wirusowych i replikację wirusów.

Niektóre geny zawierają kilka miejsc startu transkrypcji. Powoduje to powstanie transkryptów różniących się długością, sekwencją i strukturą rejonu 5'UTR [19]. W mRNA ICAM-1 (kodującego białko zaliczane do rodziny adhezyjnych) 5'UTR może mieć długość 41, 124 i 319 nukleotydów długości, w zależności od rodzaju komórki lub warunków środowiska. Wybór rejonu 5'UTR jako miejsca oddziaływania asODN stwarza możliwość wybiórczego zablokowania ekspresji określonej subpopulacji mRNA.

### III-1-c. Rejon niekodujący 3'mRNA

Spośród kilkunastu ODN, komplementarnych wobec różnych sekwencji mRNA ICAM-1, najbardziej efektywne były ODN hybrydujące z sekwencją położoną 300 nt za miejscem zakończenia translacji, w rejonie 3'UTR (ang. *3' untranslated region*) (Ryc. 4) [24]. asODN specyficzne wobec innych sekwencji rejonu 3'UTR były mniej lub całkowicie nieskuteczne. W doświadczeniu opisanym wyżej możliwe jest, że odszczerpienie końca 3' (w wyniku działania RNazy H, rozdz. III-3) w określonym miejscu 3'UTR (inne 3'UTR-asODN były mniej skuteczne) powodowało zmianę w układzie sekwencji destabilizujących i wyzwało szybką degradację mRNA kodującego ICAM-1.



Ryc. 4. Wybór optymalnej sekwencji mRNA — miejsca oddziaływania z asODN. Cyfry określają przybliżoną lokalizację sekwencji, które stanowiły cel dla asODN. Miejsce hybrydyzacji asODN, który najsilniej hamował ekspresję genu, oznaczone jest cyfrą 1. Miejsca hybrydyzacji innych asODN oznaczone są w kolejności przez cyfry od 2 do 6. \* oznacza miejsce hybrydyzacji asODN o skuteczności poniżej 50%. 5'UTR — rejon nieulegający translacji 5'mRNA; RP — rejon ulegający translacji (kodujący) mRNA; 3'UTR — rejon nieulegający translacji 3'mRNA; ICAM-1 — adhezyjna, komórki HUVEC [24]; p120 — cyklina, komórki HeLa [31]; c-myc — czynnik transkrypcyjny, komórki HL-60 [30]; pro-a — prothymozyna  $\alpha$ , komórki RPMI 8226 [29].

### III-1-d. Zahamowanie translacji

Zebrano wiele dowodów na możliwość skutecznego zablokowania translacji przez asODN, komplemen-

tarne wobec kodonu startowego AUG i początkowych sekwencji kodujących [26]. Niestety mechanizm tego procesu nie jest znany. Wydaje się, że asODN blokują przyłączenie podjednostki rybosomalnej 60S do kompleksu 43S i mRNA w miejscu startu translacji. Sprzeczne doniesienia dotyczą skuteczności asODN komplementarnych wobec środkowych i końcowych sekwencji kodujących [24, 27-31]. Nie wyjaśnione jest też oddziaływanie hybrydy asODN:mRNA z rybosomami. Wiadomo, że organella te rozplatają strukturę drugorzędową RNA, powinny też destabilizować hybrydę asODN:mRNA [20, 32, 33].

### III-2. Aktywacja RNazy H przez asODN

Substratem RNazy H jest hybryda RNA:DNA. RNAza H występuje zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie, aktywnie dzielących się komórek i uczestniczy w procesie replikacji DNA, podczas którego hydrolyzuje oligorybonukleotydy służące jako startery.

Pierwsze doświadczenia, sugerujące możliwość aktywacji RNazy H przez asODN, przeprowadzono w systemie translacji *in vitro* z użyciem lizatu z retikulocytów królika [34, 35]. Pomimo, że aktywność RNAzy H w preparacie lizatu retikulocytów stanowi 1-2% aktywności występującej w komórkach jądrowych okazało się, że zahamowanie ekspresji badanych genów było wynikiem fragmentacji mRNA. Analiza RNA wykazała obecność fragmentów mRNA  $\alpha$  i  $\beta$  globiny, zaś miejsce cięcia odpowiadało miejscu wiązania asODN. Dodanie inhibitora RNAzy H poli(rA)-oligo(dT) przwracało ekspresję genów globin. Podobne obserwacje poczyniono analizując losy endogennej i egzogennej mRNA w oocytach mysich i żabich po zastosowaniu odpowiednich asODN komplementarnych wobec sekwencji kodujących [36, 37].

Inne dowody potwierdzające udział RNazy H w procesie hamowania ekspresji genów przez asODN pochodzą z badań nad retrowirusami. Kluczowym enzymem cyklu życiowego retrowirusów jest odwrotna transkryptaza. Okazało się, że jedna z podjednostek odwrotnej transkryptazy ma aktywność RNazy H. W jednym z doświadczeń uzyskano zahamowanie syntezy cDNA wirusów AMV (ang. *avian myeloblastoma virus*) i MMLV (ang. *murine Moloney leukemia virus*) stosując asODN. Analiza RNA wykazała jego przecięcie w miejscu hybrydyzacji z asODN. Jeśli odwrotna transkryptaza została pozbawiona (w wyniku mutacji) aktywności RNazy H, asODN nie hamowały odwrotnej transkrypcji [38-40]. Wydaje się, że taki układ powinien być szczególnie efektywny i specyficzny w blokowaniu ekspresji genów wirusowych. Przy obecności asODN, odwrotnej transkrypcji będzie towarzyszyła degradacja RNA wirusowego.

RNAza H hydrolizuje w kompleksie RNA-DNA jedynie RNA, zatem jedna cząsteczka ODN może wyzwać degradację wielu cząsteczek RNA. Pseudo-

katalityczne działanie ODN w obecności RNazy H sugerowały wyniki doświadczenia, w którym S-ODN komplementarne wobec sekwencji kodującej mRNA  $\beta$ -globiny króliczej wstrzyknięto do oocytów żaby razem z docelowym mRNA [37]. Przy stężeniu ODN czterokrotnie niższym od stężenia RNA obserwowano degradację połowy cząsteczek mRNA.

Wydawać by się mogło, że aktywacja RNazy H powinna być kluczowym mechanizmem efektorowym asODN. Bez względu na lokalizację hybrydy przecięcie RNA niszczyłoby tę cząsteczkę nieodwracalnie. Okazało się jednak, że taka prawidłowość nie zawsze istnieje. Komórki białaczki monocytarnej U937 zawierają aktywną RNazę H. AsODN komplementarne wobec pierwszych kodonów mRNA *c-myc* hamowały syntezę białka Myc w tych komórkach. Jednocześnie nie wykazano degradacji mRNA *c-myc* [41].

#### IV. Wybór optymalnej sekwencji mRNA jako miejsca oddziaływania z asODN

Wybór optymalnej sekwencji docelowej mRNA i odpowiednie zaprojektowanie asODN jest sprawą kluczową dla zapewnienia skuteczności i swoistości jego działania. Stosuje się tu kilka metod. Jedną z nich polega na opracowaniu modelu struktury drugorzędowej mRNA docelowego, wyliczeniu energii wiązania z poszczególnymi sekwencjami i wreszcie na wyborze najbardziej odpowiedniej sekwencji w danym układzie doświadczalnym [42, 43]. Inną metodą, jak dotąd najczęściej stosowaną, jest testowanie wielu ODN komplementarnych wobec wybranych sekwencji mRNA, pod względem skuteczności [24, 29-31]. Rycina 4 przedstawia skuteczność asODN w stosunku do różnych sekwencji kilku mRNA. Dużą skuteczność wykazują asODN komplementarne wobec sekwencji z kodonem startowym. Jest to istotne, gdyż dla większości genów znane są jedynie sekwencje cDNA. W tym przypadku mechanizmem działania będzie zatrzymanie translacji. Skuteczność asODN hybrydujących w rejonie 5'UTR lub 3'UTR świadczyć może o decydującym znaczeniu tych sekwencji w regulacji ekspresji genów. Mechanizmem działania może być tu blokowanie dostępu naturalnych ligandów (aktywatorów lub represorów) lub przecięcie mRNA. Pamiętać jednak należy, że brak lub mniejszy efekt danego ODN może świadczyć zarówno o nikłym znaczeniu dla ekspresji genu wybranej sekwencji RNA, jak również o słabym powinowactwie asODN wobec RNA.

#### V. Podsumowanie

asODN stanowią nową klasę narzędzi badawczych oraz potencjalnych terapeutów pozwalających na wysoce specyficzną ingerencję w proces ekspresji genu na etapie metabolizmu mRNA. Pierwszym etapem działania asODN jest selektywne rozpoznanie i połączenie czyli hybrydyzacja z docelową sekwencją

mRNA. Selektywność działania asODN można poprawić poprzez wybór odpowiedniego analogu, długości i stężenia asODN oraz sekwencji mRNA. asODN oddziałując z sekwencją mRNA blokują dostęp naturalnych ligandów regulujących metabolizm mRNA lub wyzwalają enzymatyczną hydrolizę mRNA. Mechanizmy efektorowe, wtórne do hybrydyzacji, zależą od lokalizacji sekwencji docelowej w cząsteczce mRNA oraz od właściwości samego układu doświadczalnego. Wyboru najbardziej optymalnej sekwencji docelowej, w większości przypadków, dokonuje się metodą prób i błędów spośród puli wielu asODN.

#### Podziękowanie

Serdecznie dziękuję Panu Docentowi Leszkowi Kaczmarskiemu, Panu Magistrowi Kubie Filipkowskemu, Pani Doktor Bożenie Kamińskiej-Kaczmarskiej, Pani Magister Izabelli Figiel i Panu Docentowi Cezaremu Szczylikowi za dyskusję i cenne uwagi.

Artykuł otrzymano 18 kwietnia 1994 r.

Zaakceptowano do druku 3 czerwca 1994 r.

#### Piśmiennictwo

1. Cook PD (1993) W: Crooke ST, Lebleu B (red) *Antisense Research and Applications*, CRC Press, str 149-189
2. Freier SM (1993) W: Crooke ST, Lebleu B (red) *Antisense Research and Applications*, CRC Press, str 67-82
3. Lia WF, Monia BP, Ecker DJ, Freier SM (1992) *Biochemistry* 31: 12055-12061
4. Blencowce BJ, Sproat BS, Rydel U, Barabino S, Lamond AI (1989) *Cell* 59: 531-539
5. Ecker DJ (1993) W: Crooke ST, Lebleu B (red) *Antisense Research and Applications*, CRC Press, str 387-399
6. Vickers T, Baker BF, Cook PD, Zounes M, Buckheit RW, Germany J, Ecker DJ (1991) *Nucleic Acids Res* 19: 3359-3368
7. Helene C (1991) *Eur J Cancer* 27: 1466-1471
8. Woolf TM, Melton DA, Jennings CGB (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7305-7309
9. Saison-Behmoaras T, Tocque B, Rey I, Chassignol M, Thoung NT, Helene C (1991) *The EMBO J* 10: 1111-1118
10. Monia BP, Johnston JF, Ecker DJ, Zounes MA, Lima WF, Freier SM (1992) *J Biol Chem* 267: 18995-19962
11. Brossalina E, Pascolo E, Toulme JJ (1993) *Nucleic Acids Res* 21: 5616-5622
12. Green MR (1991) *Ann Rev Cell Biol* 7: 559-599
13. Black DL, Steitz JA (1986) *Cell* 46: 697-704
14. Black DL, Chabot B, Steitz JA (1985) *Cell* 42: 737-750
15. Smith CC, Aurelian L, Reddy MP, Miller PS, Ts'o POP (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2787-2791
16. Kulka M, Smith CC, Aurelian L, Fischelevich R, Meade K, Miller P, Ts'o POP (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6868-6872
17. Jacob A, Duval-Valentin, Ingrand D, Thuong NT, Helene C (1993) *Eur J Biochem* 216: 19-24
18. Dominski Z, Kole R (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8673-8677
19. Baker BF (1993) W: Crooke ST, Lebleu B (red) *Antisense Research and Applications*, CRC Press, str 37-49
20. Kozak M (1992) *Annu Rev Cell Biol* 8: 197-225
21. Melefs O, Hentze MW (1993) *BioEssays* 15: 85-90
22. Lawson GT, Ray BK, Dodds JT, Grifo JA, Abramson RD, Merrick WC, Betsch DF, Weith HL, Thach RE (1986) *J Biol Chem* 261: 13979-13989
23. Baker BF, Miraglia L, Hagedorn CH (1992) *J Biol Chem* 267: 11495-11499

24. Chiang MY, Chan H, Zounes MA, Freier SM, Lima WF, Bennet FC (1991) *J Biol Chem* **266**: 18162-18171
25. Sachs A (1993) *Cell* **74**: 413-421
26. Mirabelli CH, Crooke ST (1993) W: Crooke ST, Lebleu B (red) *Antisense Research and Applications*, CRC Press, str 7-36
27. Haauptle MT, Frank R, Dobberstain B (1986) *Nucl Acids Res* **14**: 1427-1448
28. Nomokonova NY, Gorn VV, Vlasow VV (1993) *Molec Biol* **27**: 193-199
29. Sburlati AR, Manrow RE, Berger SL (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 253-257
30. Bacon TA, Wickstrom E (1991) *Oncogene Res* **6**: 13-19
31. Perlaky L, Saijo Y, Busch RK, Bennett CF, Mirabelli CK, Crooke ST, Busch H (1993) *AntiCancer Drug Design* **8**: 3-14
32. SA Liebhaber, Cash FE, Shakin SH (1984) *J Biol Chem* **259**: 15597-15602
33. Shakin SH, Liebhaber SA (1986) *J Biol Chem* **261**: 16018-16025
34. Minshull J, Hunt T (1986) *Nucl Acids Res* **14**: 6433-6451
35. Walder RY, Walder JA (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 5011-5015
36. Dash P, Lotan I, Knapp M, Kandel ER, Goelet P (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7896-7900
37. Shuttleworth J, Colman A (1988) *EMBO J* **7**: 427-434
38. Loreau N, Boiziau C, Verspieren P, Shire D, Toulme JJ (1990) *FEBS Lett* **252**: 53-56
39. Boiziau C, Thoung NT, Toulme JJ (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 768-772
40. Hatta T, Kim SSG, Nakashima H, Yamamoto N, Sakamoto K, Yokoyama S, Takaku H (1993) *FEBS Lett* **330**: 161-164
41. Rosolen A, Kyle E, Chavany C, Bergan R, Kalman ET, Crouch R, Neckers L (1993) *Biochimie* **75**: 79-87
42. Stull R, Taylor LA, Szoka FC (1992) *Nucleic Acids Res* **20**: 3501-3508
43. Mitsuhashi M, Cooper A, Ogura M, Shinagawa T, Yano K, Hosokawa T (1994) *Nature (Lond)* **367**: 759-761

## Apirazy — enzymy kontrolujące stężenie wolnych nukleotydów w komórkach i tkankach

## Apyrases — enzymes involved in the control of nucleotides level in cells and tissues

MICHAŁ ALEKSANDER KOMOSZYŃSKI\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Klasyfikacja apiraz
- III. Charakterystyka apiraz
- IV. Mechanizm katalizy
- V. Funkcja ektoapiraz w układzie nerwowym
- VI. Apirazy a purynoreceptory
- VII. Udział apiraz w regulacji aktywności 5'-nukleotydu, cyklazy adenylowej i recyklicacji nukleotydów
- VIII. Rola ektoapiraz w układzie krwionośnym
  - VIII-1. Udział w procesach agregacji płytek
  - VIII-2. Udział w procesach regulacji ciśnienia krwi
- IX. Regulacja przepuszczalności błon i transport substancji wysokocząsteczkowych
- X. Metaboliczna rola endoapiraz
  - X-1. Udział apiraz w procesach syntezy skrobi
  - X-2. Apirazy regulują poziom  $P_i$  w komórkach
- XI. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** EDRF — endotelialny czynnik relaksujący; FSBA — 5'p(flurosulfonylo)benzyladenozyna;  $K_{sh} = v \text{ ATP} / v \text{ ADP}$  ( $v$  = szybkość hydrolizy substratów).

### Contents:

- I. Introduction
- II. Classification of apyrases
- III. Characteristic of apyrases
- IV. Mechanism of catalysis
- V. Role of ectoapyrases in nervous system
- VI. Apyrases as purinoreceptors
- VII. Apyrases function in regulation of the activity of 5' nucleotidase, adenyl cyclase and nucleotide recycling
- VIII. Role of apyrases in vascular system
  - VIII-1. Apyrases participate in platelet aggregation
  - VIII-2. Apyrases participate in vasodilation and vasoconstriction
- IX. Regulation of permeability of membranes and transport of some large macromolecules
- X. Metabolic function of endoapyrases
  - X-1. Participation of apyrases in synthesis of starch
  - X-2. Apyrases are involved in regulation of the  $P_i$  level in the cell
- XI. Concluding remarks

### I. Wstęp

Apirazy (dwufosfohydrolazy ATP — EC 3.6.1.6) są enzymami znanymi od ponad 40-tu lat. Odkryte i opisane po raz pierwszy w 1945 r. przez Meyerhofa [1] są jedynymi enzymami hydrolizującymi ATP, których funkcja metaboliczna nie została dotąd w pełni poznana.

\* Dr, Zakład Biochemii, Instytut Biologii, UMK, ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń



Badania ostatnich dziesięciu lat udowodniły, że adenozytrójfosforan jest nie tylko źródłem energii w komórce, lecz również nośnikiem informacji [2-4]. Podobną funkcję pełnią powstające w wyniku hydrolizy tego nukleotydu ADP, AMP i adenozylna [2, 5, 6]. Związki te kontrolują różne, często przeciwstawne, procesy metaboliczne, w związku z tym w komórkach i tkankach muszą istnieć mechanizmy regulujące ich stężenie. ATP i ADP są substratami wielu enzymów. Niektóre z nich, w tym ATPazy, wykorzystują energię wiązań pirofosforanowych do syntez, transportu jonów i metabolitów [7]. Apirazy również hydrolizują ATP jednak nie uczestniczą w żadnym z wcześniej wymienionych procesów. Specyficzny mechanizm hydrolizy substratów przez apirazę wskazuje, że może ona kontrolować, w komórkach i tkankach, stężenie nukleotydów bogatych w energię i powstających w wyniku ich hydrolizy produktów o niskim potencjale energetycznym. Celem mojego artykułu jest prezentacja wyników, które po około 50 latach, pozwoliły na sformułowanie hipotezy o udziale apiraz w regulacji poziomu nukleotydów w komórkach i tkankach.

## II. Klasyfikacja apiraz

Apirazy charakteryzują się zbliżonymi właściwościami kinetycznymi i strukturalnymi [8-15] tworząc wyrazistą grupę systematyczną. Różnią się jednak rozpuszczalnością i lokalizacją co stanowi podstawę ich klasyfikacji (Ryc. 1). Możemy wyróżnić dwie formy tego enzymu: rozpuszczalną „R” uzyskaną z supernatantów komórek roślinnych i ze śliny owadów [9, 16], oraz związaną z membranami formę „M” [9-12, 17]. Obie formy mogą występować jako endoapirazy „I” („RI” i „MI”) o centrum katalitycznym znajdującym się we wnętrzu komórki [14, 17] i ektoapirazy „O” („RO” i „MO”) o centrum katalitycznym zlokalizowanym poza komórką [12, 18, 19].

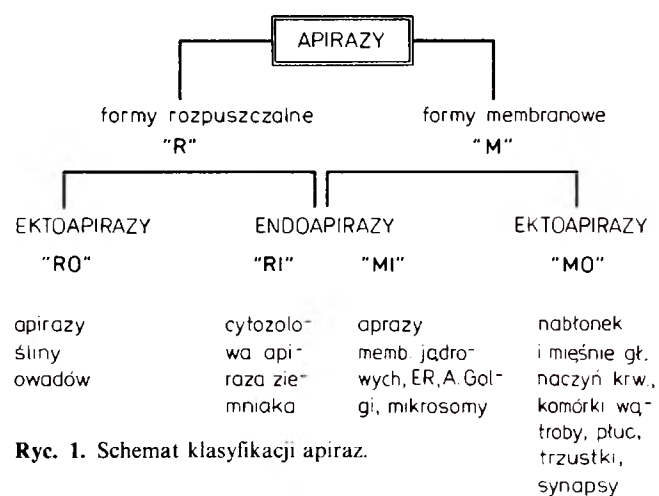
## III. Charakterystyka apiraz

Obecność dwufosfohydrolaz ATP stwierdzono we wszystkich dotychczas przebadanych tkankach eukariotów [8-16, 18] oraz w komórkach nowotworowych [10]. Brak jest jednak jednoznacznych danych o obecności ektoapirazy w komórkach i tkankach roślin.

Większość dotychczas opisanych dwufosfohydrolaz ATP zbudowanych jest z pojedynczego polipeptydu i charakteryzuje się brakiem grup -SH [10, 11, 15, 19-22]. Masa cząsteczkowa większości apiraz roślinnych waha się od 40-51 kDa, podczas gdy apirazy zwierzęce charakteryzują się większą i bardziej zróżnicowaną wielkością cząsteczek [13, 23]. Ektoapirazy izolowane z wątroby szczura, śledziony wołu oraz trzustki świni są glikoproteinami [11, 18, 23]. Karboksylowy koniec łańcucha białkowego ektoapiraz znajduje się po stronie cytoplazmatycznej błony. Po stronie ekstracytoplazmatycznej występują 2 fragmenty struk-

tury o sekwencji odpowiadającej miejscom wiązania nukleotydów oraz aminowy koniec łańcucha białkowego [18].

Apirazy niezależnie od źródła ich pochodzenia są enzymami o niskiej specyficzności substratowej i katalizują rozpad zarówno nukleotydów dwu- jak i trójfosforanowych oraz pirofosforanu tiaminy [8, 15, 21, 23]. Oczyszczone preparaty apiraz nie hydrolizują nieograniczonego pirofosforanu i estrowych wiązań fosforanowych [8, 21, 23]. Enzymy z różnych źródeł różnią się szybkością hydrolizy ATP i ADP. Stosunek hydrolizy ATP do ADP ( $K_{sh}$  [ATP/ADP]) większości apiraz zawiera się pomiędzy 1 i 2 [8, 9, 14, 24]. Optimum pH apiraz roślinnych jest bliskie 6.5 [8, 9, 14, 24], podczas gdy optimum pH enzymów zwierzęcych znajduje się w przedziale alkalicznym [9, 10, 12]. Apirazy są silnie hamowane przez związki chelatujące [8, 11, 22], i azydki [2, 10, 12], a w niektórych przypadkach przez  $HgCl_2$  [19, 25] i analogi ATP [10, 11, 26]. Silnym inhibitorem apirazy z mikrosomów pszenicy oraz rozpuszczalnego enzymu z bulw ziemniaka jest triflupromazyna [17, 27].

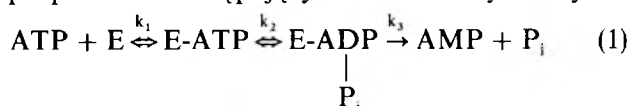


Ryc. 1. Schemat klasyfikacji apiraz.

## IV. Mechanizm katalizy

Poznanie mechanizmu katalizy stanowi podstawę dla zrozumienia metabolicznej roli apirazy. Apiraza hydrolizuje ATP do AMP i 2 cząsteczek ortofosforanu. Adenozylna, jako produkt, pojawia się we wczesnym stadium reakcji, przy ogromnym nadmiarze substratu w stosunku do produktów [8, 24, 26]. Inaczej zachowują się ATPazy, które w analogicznych warunkach hydrolizują ATP do ADP i ortofosforanu [7].

Stosując  $\gamma$  [ $^{32}P$ ]ATP i  $\beta$  [ $^{32}P$ ]ADP wykazano, że dodanie do znakowanego ATP równomolarnych ilości nieznakowanego ADP powoduje obniżenie o 50% ilości  $\beta$  lub  $\gamma$   $^{32}P_i$  uwalnianego z ATP [24]. Sugeruje to, że nieradioaktywny ADP konkuruje o miejsce aktywne tylko z wolnym enzymem. Na tej podstawie autorzy zaproponowali następujący mechanizm hydrolizy:



Tę hipotezę w pełni potwierdzają nasze badania nad apirazą z mikrosomów kielków pszenicy [8, 26], w których wykazaliśmy, że dodanie do optymalnych stężeń ATP — 1 mM ADP nie przyspiesza, ale też nie hamuje szybkości reakcji. Szybkość hydrolizy nie jest więc ograniczona stężeniem wolnego ADP. Ponadto analog ATP z dołączoną do  $\gamma$  fosforanu siarką hamuje hydrolizę obu substratów, podczas gdy ADP-S jest słabym inhibitorem enzymu i dlatego powinowactwo enzymu do ATP wydaje się być większe niż do ADP [26]. W tej sytuacji niewielkie ilości powstającego w początkowej fazie reakcji ADP i ogromny nadmiar ATP w mieszaninie reakcyjnej nie pozwala na ponowne wiązanie ADP z centrum katalitycznym apirazy [8]. Powyższe dane oraz zbliżone wartości  $K_m$  dla ATP i ADP potwierdzają, że prezentowany powyżej schemat jest zgodny z mechanizmem działania enzymu (1).

## V. Funkcja ektoapiraz w układzie nerwowym

Już w latach siedemdziesiątych wysunięto hipotezę o udziale pochodnych adenozyliny w procesach transmisji [2], ponieważ w zakończeniach synaptycznych oprócz pęcherzyków wypełnionych neurotransmiterami stwierdzono gromadzenie się pęcherzyków zawierających ATP. Drogą egzocytozy pęcherzyki przedostają się do przestrzeni synaptycznej, a uwolniony z nich ATP powoduje depolaryzację błony postsynaptycznej i transmisję sygnału do następnego neuronu lub płytki nerwowo-mięśniowej [2, 28-30] (Ryc. 2). Podanie do przestrzeni śródsynaptycznej  $\alpha,\beta$ -metyleno-ATP (analogu ATP) związku, który nie ulega hydrolizie enzymatycznej, powoduje 100-krotne wzmocnienie sygnału nerwowego [2]. Ten fakt, podobnie jak i gromadzenie w przestrzeni synaptycznej AMP i adenozyliny potwierdzają udział ATP w transmisji. Badania ostatnich trzech lat wykazały, że ATP gra rolę neurotransmitera w centralnym i obwodowym układzie nerwowym. W ostatnich dwóch latach stwierdzono, że transmisja sygnału między neuronami udźeczki mózgu szczura i w nerwach obwodowych świnki morskiej trwa mimo obecności substancji blokujących receptory nikotynowe, glutaminianowe,  $\gamma$ -aminomasłowe, noradrenalinowe oraz adenozylinowe [31, 32]. Jedynym inhibitorem tego sygnału okazała się suramina substancja hamująca wiązanie ATP z receptorem, typu  $P_2$ . Natomiast analog ATP —  $\alpha,\beta$  metyleno ATP usuwał wywołaną suraminą blokadę sygnału [31]. Powyższe dane wskazują na obecność purynoreceptorów również w centralnym i obwodowym układzie nerwowym ssaków. Dotychczasowe badania pozwoliły na wyodrębnienie w komórkach zwierzęcych purynoreceptorów charakteryzujących się wysokim powinowactwem wobec ATP i ADP, określanym jako receptory  $P_2$ ,  $P_{\gamma 2}$ ,  $P_{\gamma 2}$ ,  $P_{\chi 2}$ ) [2-4] oraz receptorów  $P_1$  o niskim powinowactwie do wspomnianych nukleotydów, a wysokim wobec AMP i adenozyliny. Receptory  $P_1$  są blokowane przez

metyloksantynę, a ich aktywacja powoduje wzrost ilości cAMP [2, 3, 5]. Receptor  $P_2$  blokuje suraminą, a analogi ATP powodują wzmocnienie sygnału [1, 2, 7]. ATP jest bardzo szybkim przekaźnikiem sygnałów wywołujących ostry wzrost i równie gwałtowny spadek pobudzenia nerwowego [2, 3, 31]. Potwierdza to błyskawiczna degradacja znajdującego się w szczelinie synaptycznej ATP, w wyniku której powstają duże ilości adenozyliny oraz inozyny i niewielkie ilości AMP i ADP [2, 4, 33]. Tak więc, ATP spełnia 4 z 5 warunków stawianych neurotransmitterom, mianowicie:

- 1 — synteza i przechowanie przekaźnika odbywa się w zakończeniu nerwowym;
- 2 — stymulacja nerwów uwalnia neurotransmitter;
- 3 — użyty egzogenicznie wywołuje odpowiedź postsynaptyczną;
- 4 — niehydrolizujące analogi tego związku wzmocniają stymulację nerwową;
- 5 — w zakończeniach nerwowych występują enzymy powodujące modyfikację neurotransmitera a tym samym przerwanie sygnału.

W przypadku ATP enzymem degradującym agonistę może być apiraza, która z innym ektoenzymem — 5'-nukleotydażą, występuje w dużych ilościach w błonach synaptycznych [2, 33, 34]. Apiraza hydrolizując oba wiązania pirofosforanowe substratu produkuje AMP oraz ortofosforan. Ponieważ AMP wykazuje niewielkie powinowactwo wobec purynoreceptorów  $P_2$ , receptor zostaje uwolniony, a stymulacja efektora przerwana (Ryc. 2) [2, 31, 33, 34]. Wskazuje to, że w procesie transmisji apirazy grają podobną rolę jak acetylocholinesterazy. Nie biorą w nim udziału ATPazy, ponieważ podstawowymi produktami reakcji z ich udziałem jest ADP i ortofosforan [35], a ADP ma również wysokie powinowactwo wobec receptora  $P_2$  [2]. O udziale apirazy w przekazywaniu sygnałów świadczą również niektóre dane kinetyczne. Dane te wskazują, że analogi ATP hamują większość dotychczas opisanych apiraz zwierzęcych i roślinnych [2, 10, 11, 26], podobnie jak silny lek psychotropowy triflupromazylna [17, 27]. Ponadto  $K_{sh}$  apiraz izolowanych z tkanki nerwowej jest większa od 1, podczas gdy  $K_{sh}$  enzymów z aorty uczestniczących w metabolizmie ADP zbliżona jest do jedności [12].

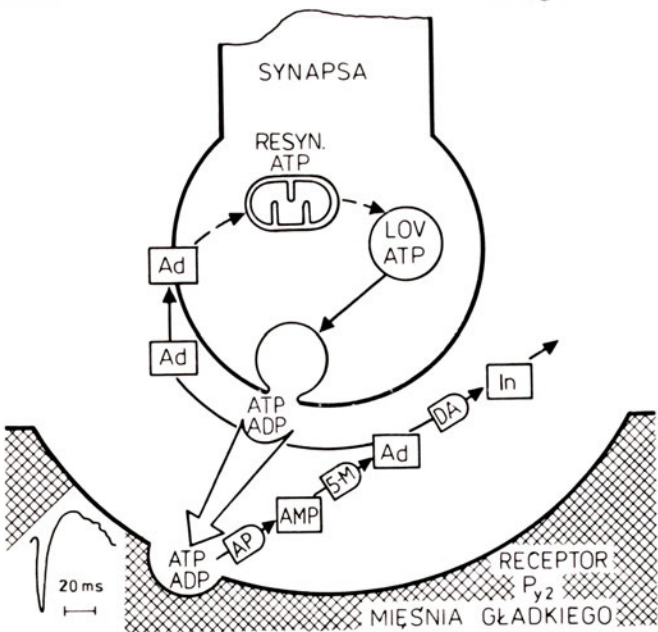
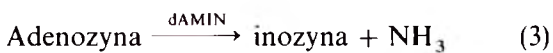
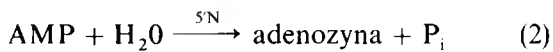
## VI. Ektoapirazy a purynoreceptory

Wyniki niektórych badań sugerują, że ektoapiraza membranowa jest purynoreceptorem typu  $P_2$ . Komórki i narządy zawierające receptory  $P_2$  wykazują również wysoką aktywność dwufosfohydrolazy ATP [2, 33, 34, 12]. Receptor  $P_2$  i apiraza wykazują niewielką specyficzność względem nukleotydów, jednak apiraza nie hydrolizuje, a receptor  $P_2$  nie wiąże AMP [2, 3]. Suramina, antagonist receptoru  $P_2$  silnie hamuje apirazę [36]. Najnowsze badania nad ektoapirazą wątroby wykazały, że jest ona fosforylowana przez kinazę tyrozynową insuliny [3, 37, 38]. Analiza

struktury tego enzymu wskazuje, że ma ona domenę (Lys-Arg-X-...-X-Ser) fosforylowaną przez zależną od c-AMP kinazę białkową. Enzym zawiera również fragment sekwencji o strukturze podobnej jak białka fosforylowane przez kinazę tyrozynową [18, 39]. Domena ta znajduje się wewnątrz komórki, podczas gdy centrum aktywne enzymu po zewnętrznej stronie jej błony. Powyższe dane pozwalają sądzić, że apirazy uczestniczą nie tylko w degradacji związków z receptorem ATP i ADP, lecz również w przetwarzaniu lub modulowaniu sygnałów na purynoreceptorach P<sub>2</sub>.

## VII. Udział apirazy w regulacji aktywności 5'-nukleotyduazy, cyklazy adenylowej i recykliczacji nukleotydów

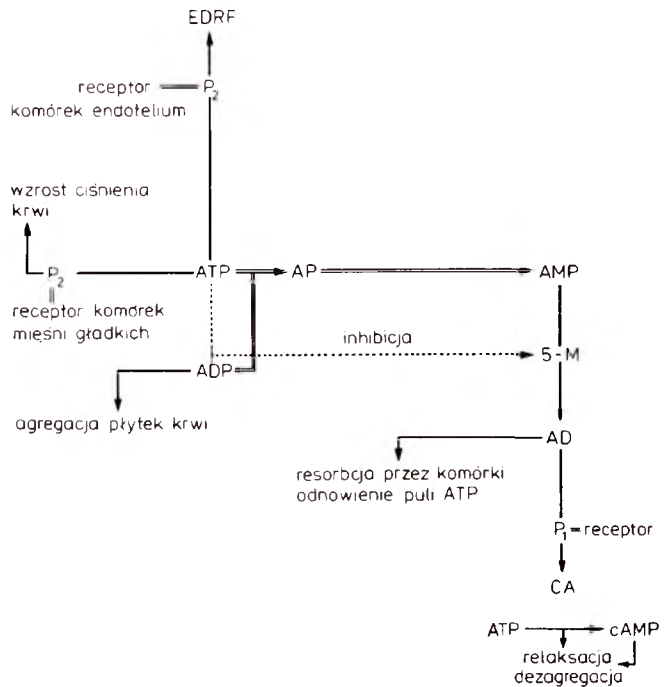
Oprócz apirazy w przestrzeni synaptycznej występują duże ilości 5'-nukleotyduazy [2, 33], której aktywność jest hamowana przez ADP i ATP i aktywowana przez AMP (Ryc. 2) [40]. Apiraza zmieniając stosunek (ATP + ADP)/AMP reguluje działanie tego enzymu. Wynikiem dwóch kolejnych reakcji z udziałem obu enzymów (reakcja 2a, b i 3) jest adenozyzna. Adenozyzna, w przeciwieństwie do AMP, przenika przez błony komórkowe, a następnie ulega fosforylacji uzupełniając pulę nukleotydów w komórce (Ryc. 2) [2]



Ryc. 2. Przemiany nukleotydów w przestrzeni synaptycznej podczas transmisji sygnału nerwowego z udziałem ATP. AP — apiraza; 5M — 5'-nukleotyduaza; Ad — adenozyzna; DA — deaminaza adenozyzny; In — inoizyna; LOV ATP — egzocytarne pęcherzyki wypełnione ATP.

Fakt, że metyloksantyna blokuje receptory P<sub>1</sub> i hamuje aktywność cyklazy adenylowej, sugeruje, że receptor P<sub>1</sub> związany jest z cyklazą [2, 41]. Adenozyzna stymuluje cyklazę, powodując wzrost zawartości cAMP w komórkach [6] i z udziałem dezaminazy ulega dalszej przemianie do inoizyny (reakcja 3) [2, 42]. Być może, podczas uwolnienia receptora P<sub>1</sub> dezaminaza pełni taką samą funkcję jak apiraza w przypadku receptora P<sub>2</sub>.

Omówione w tym rozdziale badania wskazują na możliwość kooperacji apirazy i 5'-nukleotyduazy. Wyjaśnia to dlaczego w przestrzeni synaptycznej znajdujemy dużo adeniny oraz inoizynę, a nie ADP lub AMP. Współdziałanie obu enzymów uwalnia receptor od agonisty oraz indukuje syntezę cAMP (Ryc. 2, 3) [5, 41].



Ryc. 3. Udział ektoapiraz w regulacji aktywności niektórych enzymów i procesów zachodzących w układzie krwionośnym. AP — apiraza; 5M — 5'-nukleotyduaza; CA — cyklaza adenylowa EDRF NO — tlenek azotu — „endotelialny czynnik relaksujący”.

## VIII. Rola ektoapiraz w układzie krwionośnym

### VIII-1. Udział w procesach agregacji płytek

Proces agregacji płytek może przebiegać trzema różnymi szlakami: z udziałem trombiny, kolagenu, lub poprzez wzrost poziomu ADP [5]. W przestrzeni okołokomórkowej nieuszkodzonych tkanek stężenie ADP < 10<sup>-7</sup>M, a podczas ich uszkodzenia gwałtownie rośnie wywołując agregację płytek [5, 43]. Podobne zjawisko powodują niektóre substancje regulujące metabolizm układu krwionośnego [2, 44]. Dwie obserwacje sugerują, że apiraza uczestniczy w hamowaniu

zależnej od ADP agregacji płytek. Po pierwsze, na powierzchni komórek nabłonka i mięśni gładkich naczyń krwionośnych ssaków występują duże ilości ektoapirazy [12], a po drugie, występują tam wcześniej omówione purynoreceptory [3, 5]. Ślina wielu gatunków pluskwiaków i pajęczaków odżywiających się krwią, zawiera apirazę jako czynnik antyhemostatyczny [43]. W doświadczeniach *in vitro* wykazano też, że hydroliza ADP przez apirazę izolowaną z naczyń krwionośnych wołu i śliny owadów zapobiega agrogowaniu płytek [13, 16, 43, 44]. Naszym zdaniem, antyhemostatyczna rola omawianego enzymu polega nie tylko na obniżaniu ilości ADP w układzie. Równie istotna jest aktywacja (przez powstający AMP) 5'-nukleotydu i wzrost stężenia adenozyliny, która wiążąc się z receptorami  $P_1$  stymuluje cyklazę adenylową (Ryc. 3). W wyniku tych przemian w komórkach endotelium powstaje cAMP, które również zapobiega agregacji płytek [5].

— bezpośrednio, przez obniżenie stężenia ADP w układzie oraz

— pośrednio, przez wzrost stężenia AMP.

## VIII-2. Udział w procesach regulacji ciśnienia krwi

Ektoapirazy biorą również udział w regulacji ciśnienia krwi. Związanie ATP z receptorami  $P_2$  komórek endotelium układu krwionośnego uwalnia czynnik o nazwie „*endothelium derived relaxing factor*” (EDRF) (Ryc. 2). Czynnik ten łatwo przenika przez błony komórkowe i powoduje relaksację mięśni gładkich naczyń obniżając ciśnienia krwi [30, 43]. Badania ostatnich lat wskazują, że w tkankach ssaków rolę EDRF gra powstający w wyniku przemian argininy tlenek azotu (NO) [5]. Wnika on łatwo do komórki i aktywując cyklazę guanylową powoduje wzrost stężenia cGMP, który niezależnie od cAMP hamuje agregację płytek [5]. Apirazy, tak jak w poprzednich przypadkach hydrolizują agonistę uwalniając receptor i AMP [30, 43].

Inny efekt wywołuje transmisja bodźca nerwowego do komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Związanie ATP z receptorem  $P_2$  płytki nerwowomięśniowej powoduje depolaryzację błony, co wyzwała skurcz mięśni gładkich i wzrost ciśnienia krwi (Ryc. 3). Związana z powierzchnią komórek apiraza degraduje ATP, uwalnia receptor i AMP. Powstająca, w wyniku kooperacji z 5'-nukleotyduzą, adenozylina stymuluje cAMPazę. Rośnie poziom cAMP, który włącza mechanizmy obniżające ciśnienie krwi [2, 5, 30, 33, 45]. Stwierdzono również, że analogi ATP powodują wzrost ilości ATP w erytrocytach i nie hamują aktywności kinazy nukleotyduowej [46]. Niektóre z tych analogów są inhibitorami apirazy [26], w związku z tym prawdziwym wydaje się stwierdzenie, że apirazy uczestniczą w regulacji poziomu ATP w komórce.

Reasumując, wysoka wartość ilorazu  $ATP + ADP/AMP$  wskazuje, że uruchomione są procesy stymulacji efektorów w układzie nerwowym i krwionośnym. Wynikiem tego jest skurcz naczyń, wzrost ciśnienia krwi i agregacja płytek. Wzrost stężenia AMP obniża wartość tego ilorazu i powoduje rozszerzenie naczyń i obniżenie ciśnienia krwi lub zapobiega agregacji płytek.

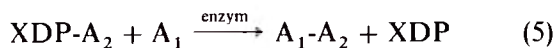
## IX. Regulacja przepuszczalności błon i transport substancji wysokocząsteczkowych

Milimolowe stężenia ATP, GDP lub GTP stymulują wnikanie niektórych białek do komórek lub frakcji jądrowej (działania tego nie ma GMP) [47-51]. Białka i inne substancje o masie cząsteczkowej od 1 do 150 kDa dostają się do komórek mysich fibroblastów w obecności  $200\mu M$  ATP [49, 50]. Wielkość cząsteczek nie wpływa na szybkość ich przenikania przez błony, zależy ona od temperatury i aktywujących apirazę jonów wapnia [49, 50]. Komórki wysepek Langerhansa, które charakteryzują się odpornością na wnikanie do ich wnętrza dużych cząsteczek, zawierają duże ilości ektoapirazy. Pomimo tego znakowane izotiocjanianem przeciwciała dostają się do cytoplazmy tych komórek w obecności nie ulegającego hydrolizie analogu ATP (AMP-PNP) [50]. Przenikanie przez błony jest stymulowane przez inhibitory apirazy tj. 5'-p(flurosulfonylo)benzyladenozyna (FSBA), która blokuje miejsca wiązania ATP w cząsteczkach fosfohydrolaz i EDTA, który wiąże jony dwuwartościowe. W obu przypadkach aktywność apirazy ulega zahamowaniu, a pozakomórkowy poziom ATP nie ulega zmianie. Powyższe fakty skojarzone z obecnością dużych ilości apirazy na powierzchni komórek Langerhansa sugerują, że ATP indukuje tworzenie się porów w strukturze plazmalemy, a ektoapiraza hydrolizując ATP zapobiega tym zmianom. Również Raikhel [48] w pracy przeglądowej o transporcie białek do jądra komórkowego sugeruje, że apiraza związana z błoną jądrową uczestniczy w transporcie do jądra histonów, nukleoplazminy i polilizyny. Proces ten odbywający się z udziałem jednostek NLS (*nuclear localisation signal*) jest stymulowany przez GTP i GDP oraz  $ATP_{\gamma}S$ , podczas gdy GMP nie wpływa na szybkość wnikania tych białek do jąder [42, 46].

## X. Metaboliczna rola endoapirazy

Funkcja endoapirazy jest mniej poznana niż enzymów związanych z zewnętrzną powierzchnią błony komórkowej. Jedną z podstawowych i najczęściej powtarzających się hipotez jest sugestia, iż apirazy biorą udział w reakcjach syntezy skrobi, syntezie ścian komórkowych i glikoproteidów. W procesach tych oprócz podstawowego produktu powstają duże ilości difosfonukleotydów (reakcja 5). Apiraza degradując je (reakcja 6) umożliwia stałą szybkość syntezy wielo-

cukrów [52-54]:



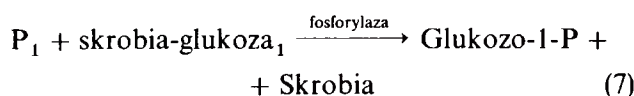
Dotychczas brakuje bezpośrednich danych wskazujących na udział apirazy w wymienionych procesach. Wiemy jednak, że synteza skrobi, ścian komórkowych i procesy glikozylacji białek zachodzą w aparacie Golgiego, i w retikulum endoplazmatycznym. Obecność apirazy w błonach obu tych struktur subkomórkowych stwierdzono np. w gruczołach mlecznych szczura i kielkach pszenicy [14, 17]. Centrum katalityczne enzymu z pszenicy znajduje się we wnętrzu pęcherzyków i kanalików tych struktur [17]. Taka lokalizacja endoapirazy sugeruje ich udział w procesach glikozylacji i syntezie ścian komórkowych.

### X-1. Udział apirazy w procesach syntezy skrobi

Fanta i w s p. [54] wykazali, że podczas 140 dni rozwoju bulw ziemniaka ilość skrobi i apirazy rośnie. Zgodnie z reakcją 4 wzrostowi ilości skrobi powinien towarzyszyć wzrost stężenia ADP jednak przeczą temu wyniki doświadczeń. Trzy fakty: śladowa aktywność kinazy adenylowej, obniżenie ilości ADP oraz wzrost aktywności apirazy sugerują, że podczas dojrzewania bulw apiraza może, podobnie jak ektoenzym z naczyń krwionośnych, regulować poziom ADP.

### X-2. Apirazy regulują poziom $\text{P}_i$ w komórkach

Degradacja i synteza cukrów są podobne jak wiele innych procesów metabolicznych komórek roślinnych kontrolowane przez ortofosforan [51, 52]. Nagły spadek temperatury otoczenia ( $-5$  —  $-9^\circ\text{C}$ ) powoduje wzrost stężenia cukrów prostych w komórkach bulw ziemniaka. Mechanizm obrony polega na uruchomieniu zgromadzonych w postaci skrobi zapasów monocukrów [52, 54]. Fosforoliza skrobi (reakcja 7) wymaga zwiększenia ilości ortofosforanu w komórkach bulw [54].



Ponieważ zawartość  $\text{P}_i$  w glebie nie wpływa bezpośrednio na stężenie tego jonu w komórkach, gwałtowny wzrost zapotrzebowania na ortofosforan, towarzyszący hydrolizie skrobi, musi być pokryty ze źródeł znajdujących się w komórce [57]. Apiraza może dostarczyć  $\text{P}_i$  do tego procesu hydrolizując ATP. Możliwość udziału apirazy w regulacji poziomu  $\text{P}_i$  potwierdzają wyniki naszych najnowszych badań. Badaliśmy wpływ stresu niskotemperaturowego na aktywność apirazy i na zmiany ilościowe niektórych metabolitów i jonów w bulwach ziemniaka [praca

przygotowana do druku]. Badania te wykazały, że w niskich temperaturach ( $7-9^\circ\text{C}$ ) aktywność apirazy w bulwach wzrasta 2.5 raza, podczas gdy aktywność fosfatazy glukozy-1-fosforanu nie zmienia się, a aktywność 5'-nukleotyduzy wyraźnie maleje. Towarzyszy temu wzrost ilości wolnego ortofosforanu i cukrów redukujących. Wprowadzenie, w tych samych warunkach, do bulw TFP-inhibitora apirazy [17, 27] spowodowała 25% obniżenie jej aktywności. Równocześnie malało stężenie cukrów i fosforu. Wyniki te potwierdzają wcześniejszą sugestję, że apirazy regulują poziom ortofosforanu w komórkach bulw ziemniaka.

## XI. Uwagi końcowe

Mimo wyraźnego postępu badań nie wyjaśniono dotąd jednoznacznie roli fizjologicznej endoapirazy. Przedstawione wyniki pozwalają jednak na sformułowanie następującej hipotezy: „Apirazy (ekto i endo) hydrolizując oba wiązania pirofosforanowe w nukleotydach uczestniczą w mechanizmach regulujących poziom nukleotydów i ortofosforanu w komórkach”. Szczególna rola apirazy polega na zmianie w komórce i przestrzeni okołokomórkowej równowagi opisanej następującym równaniem  $[\text{ATP} + \text{ADP}]/[\text{AMP} + (\text{adenozyna}) + \text{P}_i]$ . Przesunięcie równowagi w lewą lub prawą stronę reguluje aktywność różnych, często przeciwstawnych procesów fizjologicznych. Powyższą hipotezę potwierdzają następujące fakty. Przede wszystkim ATP i ADP stymulują receptory układu nerwowego oraz hamują aktywność 5'-nukleotyduzy, a ADP aktywuje agregację płytek [2-5, 40]. Przeciwnie AMP stymulując 5'-nukleotyduzę i pośrednio cyklazę adenylową powoduje wzrost cAMP, który jest silnym inhibitorem agregacji oraz obniża ciśnienie krwi [5, 44], a powstająca z udziałem 5'-nukleotyduzy adenylozyna jest silnym inhibitorem procesów pre- i postsynaptycznych [4]. Nukleotydy, z kolei, posiadające wiązania wysokoenergetyczne po związaniu z purynoreceptorem  $\text{P}_2$  mięśni gładkich naczyń krwionośnych wywołują wzrost ciśnienia krwi [30]. Oba nukleotydy aktywują tworzenie porów w błonach i transport białek do jądra komórkowego [48, 51], podczas gdy AMP nie zmienia przepuszczalności błon i nie wpływa na szybkość transportu białek do jądra [48].

Powyższą hipotezę potwierdza również obecność na powierzchni komórek receptorów dwóch typów, o zdecydowanie różnym powinowactwie do nukleotydów zawierających wiązania pirofosforanowe oraz AMP i adenylozyny [2-4]. Uwolnienie receptora wymaga przekształcenia ATP (i ADP) w AMP i taki jest mechanizm hydrolizy ATP z udziałem apirazy. Powstający AMP charakteryzuje się niskim poziomem energii swobodnej wiązań (brak wiązań pirofosforanowych) i znacznie mniejszym (ujemnym) ładunkiem. Ułatwia to dysocjację AMP z receptorów  $\text{P}_2$  i wiązanie z receptorami  $\text{P}_1$ . Sądzymy więc, że receptory  $\text{P}_2$  powinny charakteryzować się wyraźnym ładunkiem

dotatnim, podczas gdy P<sub>1</sub> wysoką hydrofobowością. W sytuacjach stresowych ATP i inne nukleotydy trójfosforanowe mogą z udziałem apirazy dostarczać ortofosforanu do tych miejsc, w których zapotrzebowanie na ten jon gwałtownie rośnie. Taki mechanizm jest bardzo ważny, ponieważ w fizjologicznych warunkach poziom ortofosforanu w komórce jest stały, a jego wahania powodują zmiany w aktywności niektórych enzymów [56, 58]. Rozstrzygnięcia wymaga rola analogów kalmoduliny w procesach regulacji apiraz. Niektóre apirazy roślinne są silnie hamowane przez triflupromazyne [17, 27] i związki o zbliżonej strukturze, które są silnymi neuroleptykami używanymi w leczeniu chorób układu nerwowego [59]. Związki te można by wykorzystać do blokowania receptorów ATP, w miejsce mniej specyficznej suraminy. Niezbędne wydają się badania nad zróżnicowaniem molekularnym apiraz. Dalsze badania nad lokalizacją powinny dać odpowiedź na pytanie: Czy istnieją roślinne ektoapirazy? oraz opisać immunologiczne i strukturalne powinowactwo błonowych i rozpuszczalnych form tych enzymów.

Artykuł otrzymano 23 marca 1994 r.  
Zaakceptowano do druku 16 maja 1994 r.

## Piśmiennictwo

- Meyerhof O (1945) *J Biol Chem* **157**: 105-119
- Burnstock G (1979) W: Baer HP, Drummound GI (red) Physiological and regulatory functions of adenosine and adenine nucleotides. Raven Press, New York, str 3-32
- El-Moatassim Ch, Dornand J, Mani J-C (1992) *Biochim Biophys Acta* **1134**: 31-45
- Edwards FA, Gibb AJ (1993) *FEBS Lett* **325**: 86-89
- Aaron J, Safier LB (1993) *FASEB J* **7**: 516-522
- Schimizu H (1979) W: Baer HP, Drummound GI (red) Physiological and regulatory functions of adenosine and adenine nucleotides. Raven Press, New York, str 243-248
- Pedersen PL, Carafoli E (1987) *Trends Biochem Sci* **12**: 146-150
- Komoszyński MA, Skalska E (1990) *Acta Biochim Polon* **37**: 405-416
- Valenzuela MA, Lopez J, Depix M, Mancilla AM, Kettlun L, Catalan L, Chiong M, Garrido J, Traverso-Cori A (1989) *Comp Biochem Physiol* **93 B**: 911-919
- Knowles AF, Isler RE, Reece JF (1983) *Biochim Biophys Acta* **731**: 88-96
- Moodie FDL, Baum H, Butterworth PJ, Peters TJ (1991) *Eur J Biochem* **202**: 1209-1215
- Yagi K, Shinbo M, Hashizume M, Shimba LS, Kurimura S, Miura Y (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **180**: 1200-1206
- Cote YP, Filep JG, Battistini B, Gauvreau J, Sirois P, Beaudoin AR (1992) *Biochim Biophys Acta* **1139**: 133-142
- Martinez F, Moncada R, Barcenás FJ, Espinosa-García T (1992) *Placenta* **13**: 463-473
- Vara F, Serrano R (1991) *Biochem J* **197**: 637-643
- Ribeiro JMC, Endris TM, Endris R (1991) *Comp Biochem Physiol* **100A**: 109-112
- Komoszyński M (1993) *Phytochemistry* **34**: 941-948
- Lin S-H (1990) *Ann NY Acad Sci* **603**: 394-400
- Hamlyn JM, Senior AE (1983) *Biochem J* **214**: 59-68
- Sarkis JFF, Guimarães JA, Ribeiro JMC (1986) *Biochem J* **233**: 885-891
- Guranowski A, Starzyńska E, Rataj-Guranowska M, Sillero MAG (1991) *Protein Expression Purification* **2**: 235-239
- Cheung PH, Dowd FJ, Porter JE, Li L-S (1992) *Cell Signal* **4**: 25-35
- LeBel D, Poirier GG, Phaneuf S, St-Jean P, Laliberte JF, Beaudoin AR (1980) *J Biol Chem* **255**: 1227-1233
- Tognoli L, Marre E (1981) *Biochim Biophys Acta* **642**: 1-14
- Picher M, Cote YP, Beliveau R, Potier M, Beaudoin AR (1993) *J Biol Chem* **268**: 4699-4703
- Komoszyński MA (1991) *Acta Biochim Polon* **38**: 157-163
- Mancilla M, Valenzuela MA, Anich M, Kettlun AM, Jara O, Traverso-Cori A (1987) *Phytochemistry* **26**: 2471-2474
- Herlihy JT (1979) W: Baer HP, Drummound GI (red) Physiological and regulatory functions of adenosine and adenine nucleotides. Raven Press, New York, str 95-105
- Ryan J, Ryan W (1984) *US Int Rev Exp Pathol* **26**: 1-43
- Cote YP, Picher M, St-Jean P, Beliveau R, Potier M, Beaudoin AR (1991) *Biochim Biophys Acta* **1078**: 187-191
- Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D (1992) *Nature (Lond)* **359**: 144-147
- Evans RJ, Derkach V, Suprenant A (1992) *Nature (Lond)* **357**: 503-505
- Manery JF, Dryden EE (1979) W: Baer HP, Drummound GI (red) Physiological and regulatory functions of adenosine and adenine nucleotides. Raven Press, New York, str 323-339
- Sarkis JFF, Salto C (1991) *Brain Res Bulletin* **26**: 871-876
- Strotmann H, Bickel-Sandkötter S (1984) *Ann Rev Plant Physiol* **35**: 97-120
- Barret J-M, Ernould A-P, Rouillon M-H, Ferry G, Genton A, Boutin JA (1993) *Chem — Biol Interactions* **86**: 17-27
- Lin SH, Guidotti G (1989) *J Biol Chem* **264**: 14408-14414
- Margolis RN, Schell MJ, Taylor SI, Hunnard AL (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **166**: 562-566
- Najjar SM, Accili D, Philippe N, Jernberg J, Margolis R, Taylor SI (1993) *J Biol Chem* **268**: 1201-1206
- Dornand J, Bonnafous J-C, Mani J-C (1978) *Eur J Biochem* **87**: 459-465
- Kukovetz WR, Wurm A, Holzmann S, Pösch G, Rinner I (1979) W: Baer HP, Drummound GI (red) Physiological and regulatory functions of adenosine and adenine nucleotides. Raven Press, New York, str 206-213
- Marcus AJ, Safier LB, Hajjar KA, Ullman HL, Islam N, Broekman MJ, Eiroa AM (1991) *J Clin Invest* **88**: 1690-1696
- Law JH, Ribeiro JMC, Wells MA (1992) *Annu Rev Biochem* **61**: 87-111
- Burnstock G (1981) Purinergic receptors. Receptors and regulation, t 12B. Chapman and Hall, London
- Rubio R, Belardinelli L, Thompson CI, Berne RM (1979) W: Baer HP, Drummound GI (red) Physiological and regulatory functions of adenosine and adenine nucleotides. Raven Press, New York, str 167-182
- Smolenski RT, Montero C, Duley JA, Simmonds HA (1991) *Biochem Pharmacol* **42**: 1767-1773
- Riedel N, Bachmann M, Prochinow D, Richter H-P, Fasold H (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 3540-3544
- Raikhel N (1992) *Plant Physiol* **100**: 1627-1632
- Saribas AS, Lustig KD, Zhang X, Weisman GA (1993) *Anal Biochem* **209**: 45-52
- Girolomoni G, Santantonio ML, Pastore S, Bergstromer PR, Giannetti A, Cruz Jr PD (1993) *J Invest Dermatol* **100**: 282-287
- Silver PA (1991) *Cell* **64**: 489-497
- Preiss J (1982) *Ann Rev Plant Physiol* **33**: 431-454
- Sadler E, Beyer TA, Oppenheimer CL, Paulson JC, Prieels J-P, Rearick JI, Hill RL (1982) *Methods Enzymol* **83**: 458-514
- Fanta N, Anich M, Mancilla M, Kettlun AM, Valenzuela MA, Traverso-Cori A (1988) *Arch Biol Med Exp* **21**: 129-133

# Ekdysteroidy owadzie — biosynteza, metabolizm i funkcja

## Ecdysteroids in insects: biosynthesis, metabolism and function

KRYSTYNA GRZELAK\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Ekdysteroidy aktywne pod względem biologicznym
- III. Biosynteza
  - III-1. Szlaki biosyntezy ekdysteroidów
  - III-2. Enzymy biosyntezy ekdysteroidów
  - III-3. Regulacje biosyntezy ekdysteroidów
    - III-3.1. PTTH
    - III-3.2. Regulacje poprzez sprzężenie zwrotne
    - III-3.3. Hormon juwenilny (JH)
    - III-3.4. Czynniki pochodzący z ciała tłuszczowego i uwalniane do hemolimfy
    - III-3.5. Rola kontroli nerwowej w regulacji funkcji PG
    - III-3.6. Zegar biologiczny
- IV. Metabolizm
  - IV-1. Główne szlaki metabolizmu ekdysteroidów
  - IV-2. Enzymy włączone w metabolizm ekdysteroidów
  - IV-3. Regulacje metabolizmu ekdysteroidów
- V. Miano ekdysteroidów w rozwoju owada
- VI. Transport
- VII. Rola ekdysteroidów w rozwoju osobniczym

### Contents:

- I. Introduction
- II. Biologically active ecdysteroid
- III. Biosynthesis
  - III-1. Pathways of ecdysteroid biosynthesis
  - III-2. Enzymes of ecdysteroid biosynthesis
  - III-3. Regulation of ecdysteroid biosynthesis
    - III-3.1. PTTH
    - III-3.2. Regulation by feedback mechanism
    - III-3.3. Juvenile hormone
    - III-3.4. Factor released from fat body to haemolymph
    - III-3.5. Role of neural control in regulation of PG function
    - III-3.6. Circadian clock
- IV. Metabolism
  - IV-1. Main pathways of ecdysteroid metabolism
  - IV-2. Enzymes of ecdysteroid metabolism
  - IV-3. Regulation of ecdysteroid metabolism
- V. Titer of ecdysteroids during the development of insect
- VI. Transport
- VII. Role of ecdysteroids in development

Wykaz stosowanych skrótów: 20-HE — 20-hydroksyekdyzon, JH — hormon juwenilny, PTTH — hormon protorakotropowy, CC — corpora cardiaca, CA — corpora allata, PG — gruczoły protorakalne, NADPH — forma zredukowana fosforanu dinukleotydu nikotynamido-adeninowego, NADH — forma zredukowana dinukleotydu nikotynamido-adeninowego, ATP — adenozylo-5'-trifosforan, m.c. — masa cząsteczkowa, kDa — kilodalton.

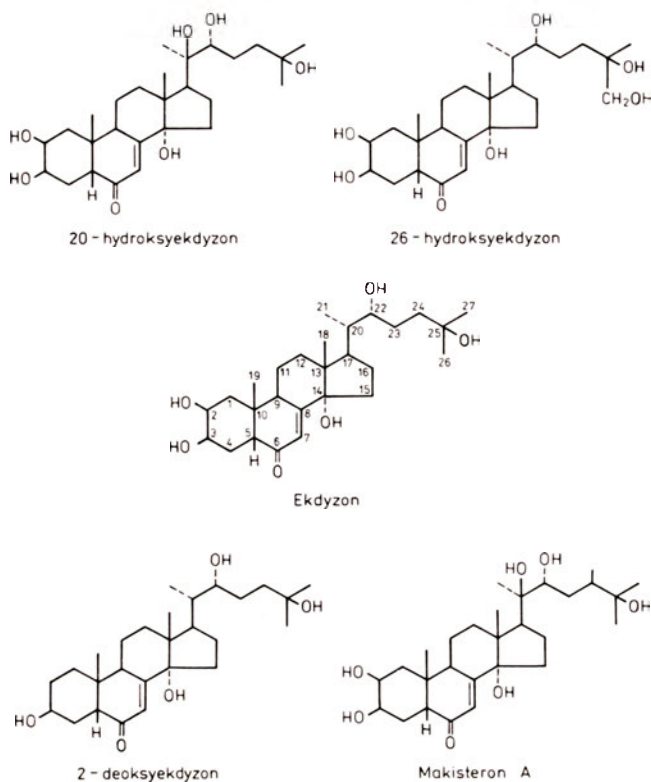
### I. Wstęp

W roku 1954 Adolf Butenandt i Peter Karlson [1] wyizolowali ekdyzon z poczwerek jedwabnika *Bombyx mori*. W połowie lat 60-tych została ustalona struktura tego hormonu. Okazało się, że jest to związek sterydowy o szkieletie węglowym cholesterolu. Od tego czasu wyizolowano wiele strukturalnych analo-

gów tego polihydroksysterydu dla których przyjęto ogólną nazwę „ekdysteroidy” [2]. Tylko kilka ekdysteroidów występujących u owadów wykazuje aktywność biologiczną (Ryc. 1), większość z nich to związki pośrednie biosyntezy ekdyzonu lub jego metabolity. Tak więc, termin ekdysteroidy jest chemicznym określeniem tych związków.

Ekdysteroidy są najpowszechniej występującymi hormonami sterydowymi. Ich obecność wykazano zarówno u owadów, jak i u innych stawonogów (*Arthropoda*), oraz u niższych zwierząt, takich jak pierścienice (*Annelida*), nicienie (*Nematoda*) czy mięczaki (*Mollusca*) [3]. Ekdysteroidy występują również w roślinach [4]. Porównując ekdyzon z hormonami sterydowymi kręgowców wykazano nie tylko ich strukturalne podobieństwo, lecz również homologię w biosyntezie, transporcie, metabolizmie i mechanizmie działania. Jednakże u kręgowców występuje kilka klas hormonów sterydowych regulujących różne procesy fizjologiczne, natomiast u owadów tylko jedna — ekdysteroidy. Określa się je jako „hormony linienia”.

\* Dr, Zakład Biochemii Porównawczej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa



Ryc. 1. Struktury chemiczne ekdysteroidów aktywnych pod względem biologicznym.

Jednak termin ten nie obejmuje wszystkich funkcji ekdysteroidów w rozwoju osobniczym. Kontrolują one nie tylko procesy związane z linieniem, lecz również morfogenezę i różnicowanie się tkanek oraz rozmnażanie się. Zdaniem K o o l m a n a [5] ekdysteroidy można uważać za wielofunkcyjny system hormonalny wytyczający kierunek rozwoju owada.

## II. Ekdysteroidy aktywne pod względem biologicznym

Struktury chemiczne tych ekdysteroidów ilustruje rycina 1. Najbardziej aktywną, funkcjonalną formą hormonu w większości gatunków owadów jest 20-hydroksyekdyzon (20-HE, ekdysteron) [6]. Jak dotąd, jest on jedynym ekdysteroidem, którego wiązanie się z receptorem zostało wykazane u owadów [5]. Ekdyzono, znacznie niższej aktywności biologicznej niż 20-HE, jest nie tylko prekursorem (prohormonem) 20-HE, ale również hormonem [7]. 2-deoksijekdyzon i 26-hydroksyekdyzon są prawdopodobnie aktywnymi formami hormonu podczas oogenezy i w stadium embrjonalnym niektórych gatunków owadów [6]. Natomiast makisteron A (24-metylo-20-hydroksyekdyzon) jest funkcjonalnym hormonem u owadów należących głównie do *Hemiptera* i *Hymenoptera* [6].

## III. Biosynteza

Głównym miejscem biosyntezy ekdysteroidów są gruczoły prorakalne (PG) [8]. Gruczoły te rozwijają się i stają się aktywne już pod koniec embriogenezy.

Funkcjonują w okresie larwalnym, a ich inwolucja, u większości owadów, rozpoczyna się po ostatniej linie larwalnej [5]. U dorosłych owadów funkcję PG przejmują gonady [9, 10]. Wykazano, że ekdysteroidy syntetyzowane są *de novo* zarówno w jajnikach dorosłych samic [9-12], jak i w gonadach męskich [13]. Wiele danych wskazuje, że ekdysteroidy syntetyzowane są również w innych tkankach owada, mianowicie w epidermie czy oenocytach [14].

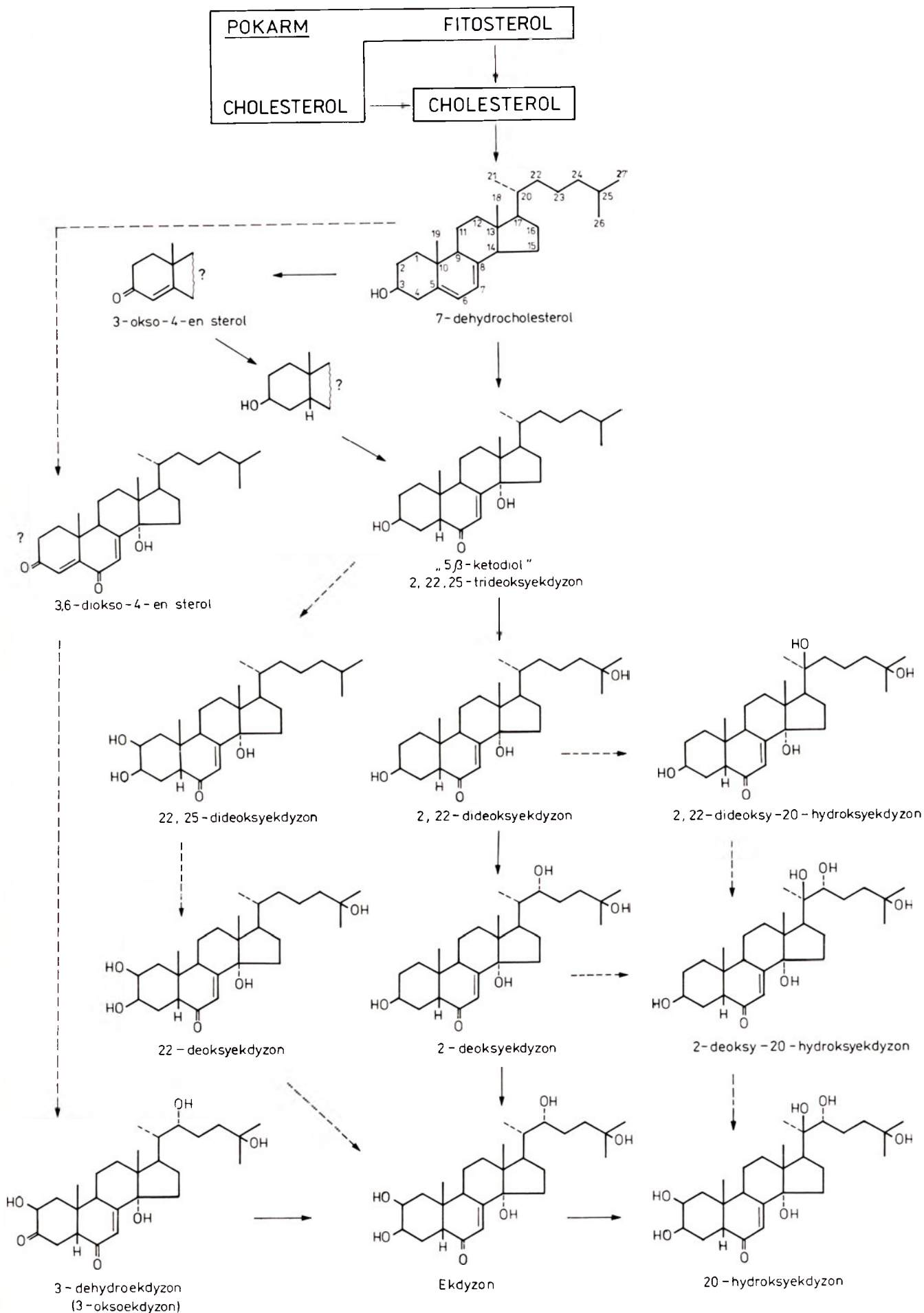
Badania nad biosyntezą ekdysteroidów prowadzi się w układach *in vitro* i *in vivo* w PG i jajnikach. Do badań używa się znakowanych substratów np. cholesterolu czy też przypuszczalnych związków pośrednich szlaku biosyntezy. Identyfikację powstających produktów reakcji prowadzi się takimi metodami jak: metody radioimmunologiczne (RIA), enzymoimmunologiczne (EIA), chromatografia cienkowarstwowa (TLC), spektroskopia masowa sprzężona z chromatografią gazową (GC-MS) czy też wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC) [15].

### III-1. Szlaki biosyntezy ekdysteroidów

Postulowane szlaki biosyntezy przedstawia rycina 2. Ekdysteroidy syntetyzowane są z cholesterolu [16] powszechnie występującego w świecie zwierzęcym. Owady, podobnie jak inne stawonogi (*Arthropoda*) nie są zdolne do syntezy cholesterolu *de novo* [17]; jest on dostarczany z pożywieniem. Nie stanowi to problemu dla owadów mięsożernych. Natomiast owady roślinożerne spożywają w pokarmie fitosterole, analogi cholesterolu. Typowe roślinne sterole: sitosterol, stigmasterol, kampesterol posiadają dodatkowe grupy metylowe i etylowe w łańcuchu bocznym cholesterolu w pozycji C-24. Większość owadów roślinożernych zdolna jest do przemiany fitosteroli w cholesterol poprzez ich dealkilację [12, 18, 19]. Jednak niektóre z nich, głównie *Hemiptera* i *Hymenoptera*, pozbawione są zdolności przekształcania fitosterolu w cholesterol [5, 12, 18]. U owadów tych zamiast ekdyzonu czy innego ekdysteroidu wykrywany jest makisteron A: 24-metylo-20-hydroksyekdyzon [6, 20] syntetyzowany bezpośrednio z fitosterolu. Przebieg biosyntezy makisteronu A nie został dotychczas wyjaśniony. Przypuszczalnym prekursorem jest kampesterol (Ryc. 2) [6, 12, 20].

Również przebieg biosyntezy ekdysteroidów z cholesterolu nie jest dokładnie poznany (Ryc. 2) [5, 12, 21]. Natomiast dobrze udokumentowana jest przemiana cholesterolu w 7-dehydrocholesterol [5, 22, 23, 24], jednak następne reakcje szlaku biosyntezy prowadzące do powstania 5 $\beta$ -ketodiolu (2,22,25 trideoksijekdyzon) nie są znane. Przypuszcza się, że 3-okso, 4-en sterole mogą być związkami pośrednimi w ciągu reakcji między 7-dehydrocholesterolem a 5 $\beta$ -ketodiolem [12, 19]. Natomiast według powszechnie panującej opinii 5 $\beta$ -ketodiol jest prekursorem ekdyzonu u wielu gatunków owadów [12, 25]. Podlega on najpierw hydroksy-





Ryc. 2. Szlaki biosyntezy ekdysteroidów wg 12, 25, zmodyfikowane.

lacji w pozycji C-25, a następnie C-22, co prowadzi do powstania 2-deoksyekdyzonu [12, 19, 26, 27]. Ten z kolei jest hydroksylowany w pozycji C-2, w wyniku czego powstaje ekdyzon [12, 27]. Zdaniem Reesa [12] jest to główna droga przemiany 5  $\beta$ -ketodiolu w ekdyzon u owadów. Przypuszcza się, że możliwa jest również odmienna kolejność, mianowicie 5  $\beta$ -ketodiol uległaby najpierw hydroksylacji w pozycji C-2 a następnie C-25 i C-22 [12, 25]. Przekształcenie ekdyzonu w bardziej aktywny biologicznie 20-HE zachodzi w tkankach peryferyjnych owada [28]. Z badań Ohnishi i wsp. [11] wynika, że w jajnikach dorosłych samic *Bombyx mori* 5  $\beta$ -ketodiol jest prekursorem 20-HE, a nie ekdyzonu. W wyniku hydroksylacji 2,22-dideoksyekdyzonu, najpierw w pozycji C-20, a następnie C-22 i C-2 powstaje 20-HE. Podobnie jak u *Bombyx mori*, w jajnikach *Schistocerca gregaria* [12] hydroksylacja 2-deoksyekdyzonu w pozycji C-20, a następnie C-2, prowadzi do powstania 20-HE. W jajnikach, w przeciwieństwie do gruczołów protorakalnych, wykazano aktywność 20-monooksygenazy ekdyzonowej, odpowiedzialnej za hydroksylację ekdyzonu do 20-HE [28, 29].

Z ostatnich badań zespołu Gilberta [23, 24, 30, 31] wynika, że głównym, jeśli nie jedynym, ekdysteroidem wydzielonym przez PG *Manduca sexta* i innych *Lepidoptera*, jest nie ekdyzon, lecz 3-dehydroekdyzon (3-oksoekdyzon), który dopiero w hemolimfie jest przekształcony w ekdyzon. Według przypuszczeń Grieneisena i wsp. [24] związkami pośrednimi między 7-dehydrocholesterolem, a 3-dehydroekdyzolem byłyby pochodne 3,6-dioksyo-4-en steroli (Ryc. 2). Wyniki badań zespołu Gilberta [23, 24, 30, 31] potwierdzają więc istnienie w gruczołach protorakalnych owadów więcej niż jednego szlaku biosyntezy ekdysteroidów.

### III-2. Enzymy biosyntezy ekdysteroidów

Badania nad enzymami włączonymi w cykl biosyntezy ekdysteroidów u owadów są mało zaawansowane. Dotyczą one wyłącznie enzymów związanych z ostatnimi etapami szlaku biosyntezy charakteryzującymi się reakcjami hydroksylacji.

C-22 i C-25 hydroksylazy katalizują procesy przekształcania 5  $\beta$ -ketodiolu (2,22,25 trideoksyekdyzonu) do 2-deoksyekdyzonu. Są one typowymi monooksygenazami zależnymi od cytochromu P-450, tlenu cząsteczkowego i NADPH [25, 32]. C-22 hydroksylaza 2,22-dideoksyekdyzonowa jest związana z mitochondriami, natomiast aktywność C-25 hydroksylazy 2,22,25 trideoksyekdyzonowej występuje zarówno we frakcji mitochondrialnej jak i mikrosomalnej [27]. W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że znakowany 5  $\beta$ -ketodiol może się przekształcać w ekdyzon nie tylko w gruczołach protorakalnych i jajnikach, lecz również w ciele tłuszczowym, epidermie, cewkach Malpighiego, jelicie środkowym [33, 34]. Może to

wskazywać na inną jeszcze, poza biosyntezą ekdysteroidów rolę tych enzymów u owadów [9].

C-2 hydroksylaza związana jest z ostatnim etapem biosyntezy ekdyzonu, a jej substratem jest 2-deoksyekdyzon. C-2 hydroksylaza 2-deoksyekdyzonowa wykrywana we frakcji mitochondrialnej została określona jako „nietyпова monooksygenaza” [25, 35, 36]. Współdziała ona z cytochromem P-450, jest jednak prawie niezależna od NADPH. Również w przeciwieństwie do typowych monooksygenaz enzym ten nie jest wrażliwy na działanie CO. Aktywność tego enzymu można wykryć również w innych niż PG i jajniki tkankach owada [35].

### III-3. Regulacje biosyntezy ekdysteroidów

Badania koncentrowały się na stadium larwalnym, a więc dotyczyły regulacji syntezy zachodzącej w PG. Powszechnie uważa się, że głównym jej regulatorem jest hormon protorakotropowy (PTTH) [7, 37, 38]. Syntezę ekdysteroidów może również regulować produkt według mechanizmu sprzężenia zwrotnego [5, 37, 39, 40]. Funkcję PG regulują ponadto hormon juvenilny, czynnik tropowy uwalniany z ciała tłuszczowego, czynniki neurogenne, a także tzw. zegar biologiczny [37, 41].

Synteza ekdysteroidów zachodząca poza PG w takich tkankach, jak gonady [9-13] przebiega pod kontrolą właściwego dla danej tkanki hormonu tropowego [5]. Neurohormony te określa się jako ekdyzotropiny. Np. synteza ekdysteroidów w nabłonku foliularnym jajników stymulowana jest przez hormon zwany FCSH (ang. *follicle cell stimulating hormone*) [5] natomiast synteza w gonadach męskich — TE (ang. *testis ecdysiotropin*) [42].

#### III-3.1. PPTH

Synteza hormonu protorakotropowego zachodzi w komórkach lateralnych mózgu owadów [43]. Hormon przejściowo gromadzi się w narządach neurohemalnych: *corpora cardiaca* (CC) czy *corpora allata* (CA) [44, 45], a następnie uwalniany jest do hemolimfy w ściśle określonych przedziałach czasowych stymulując gruczoły protorakalne do syntezy i wydzielania ekdysteroidów [8].

U *Lepidoptera* występują co najmniej dwie różniące się wielkością formy neurohormonu: tzw. duży PPTH o m.c. od 22 do 29 kD i mały od 4 do 7 kD [8, 37, 38].

Mechanizm działania PPTH na poziomie komórkowym nie został jeszcze dokładnie poznany. W przedstawionym przez Gilberta i wsp. modelu działania tego neuropeptydu na komórki PG *Manduca sexta* [7] duży PPTH, wiążąc się z receptorami zlokalizowanymi w błonach komórkowych, uruchamia łańcuch reakcji, w którym drugim przekąźnikiem jest cAMP. Zasadniczą rolę w tym procesie odgrywa  $Ca^{2+}$ . Działając poprzez kalmodulinę podwyższa on poziom

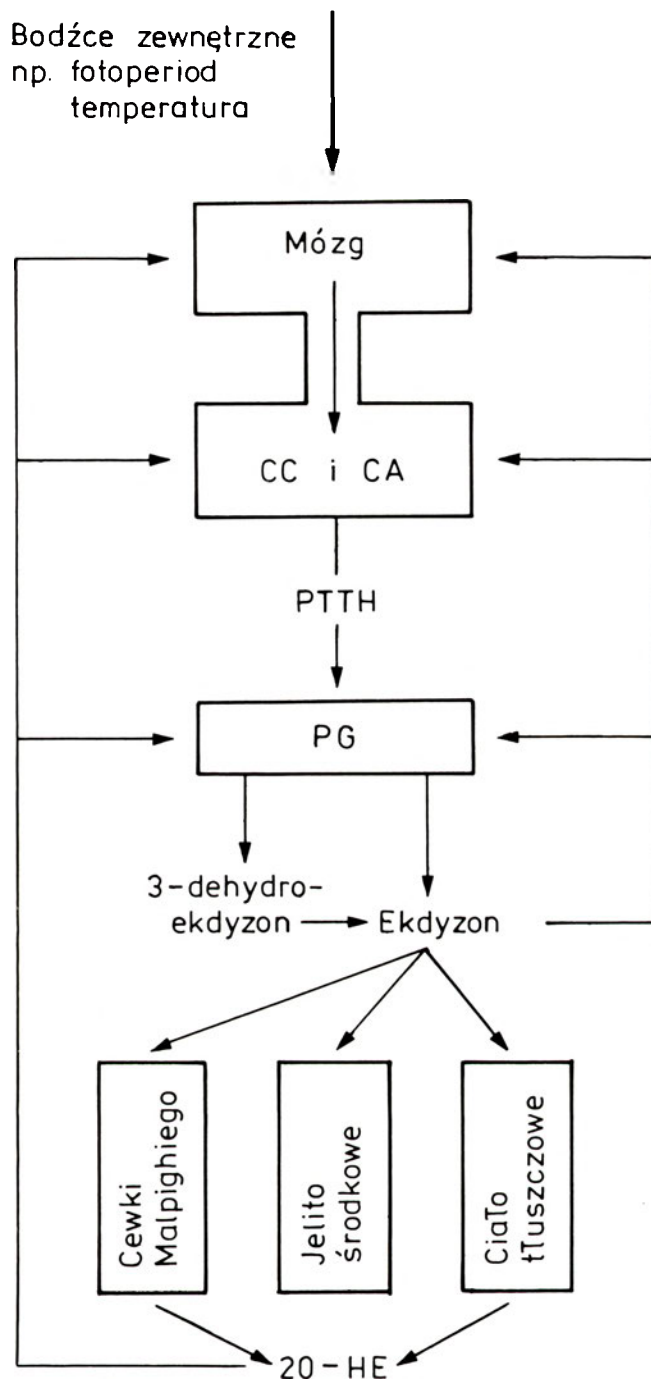
wewnątrzkomórkowego cAMP. Cykliczny nukleotyd aktywuje cAMP — zależną kinazę białkową, co prowadzi do fosforylacji białka o m.c. 34 kD. Fosforylacja tego białka, identyfikowanego jako białko S 6 podjednostki 40 S rybosomu, może być sygnałem do syntezy specyficznych białek limitujących szybkość cyklu przemian w szlaku biosyntezy ekdysteroidów.

### III-3.2. Regulacje poprzez sprzężenie zwrotne

Ekdysteroidy (ekdyzon i 20-HE) mogą regulować swą własną syntezę działając bezpośrednio na gruczoły prorakalne lub drogą pośrednią wpływając na syntezę i wydzielanie PTTH [37, 39, 40]. Z badań Sakurai'a i Williamsa [39] wynika, że ekdyzon czy 20-HE stymuluje bądź hamuje gruczoły (dodatnie lub ujemne sprzężenie zwrotne) w zależności od stężenia ekdysteroidów w hemolimfie i od aktywności wydzielniczej PG. W końcowym okresie ostatniego stadium larwalnego zachodzi jedynie sprzężenie dodatnie [39]. Tak jak przedstawiono na rycinie 3 regulacje te zachodziłyby na kilku poziomach: syntezy PTTH, jego uwalniania z CC lub CA, lub na poziomie PG, tzn. w miejscu syntezy i wydzielania ekdysteroidów [5, 40]. Ostatnio [40, 46] wykazano obecność jądrowych receptorów ekdysteroidowych zarówno w komórkach neurosekrecyjnych mózgu, jak i w CA, CC i PG — co potwierdziło wrażliwość tych tkanek na sygnał hormonalny. Wykazano również [46] obecność receptorów w ciele tłuszczowym, cewkach Malpighiego oraz w jelicie środkowym *Manduca sexta*, a więc w tkankach w których zachodzi hydroksylacja ekdyzonu do 20-HE. Bidmon i wsp. [46] sugerują, że 20-HE może regulować swoje miano zależne od stadium rozwoju, poprzez długą lub krótką pętlę sprzężenia zwrotnego. Długa pętla obejmuje miejsca syntezy i uwalniania PTTH, natomiast krótka — gruczoły prorakalne, ciało tłuszczowe, cewki Malpighiego oraz jelito (Ryc. 3).

### III-3.3. Hormon juwenilny (JH)

JH w zależności od stadium rozwoju hamuje bądź stymuluje biosyntezę ekdysteroidów [47-50]. Np. podanie hormonu larwom *Lepidoptera* w początkowym okresie ostatniego stadium larwalnego opóźnia lub całkowicie hamuje metamorfozę, wskutek hamowania syntezy ekdysteroidów. JH działa albo bezpośrednio na PG lub też za pośrednictwem mózgu hamuje wydzielanie PTTH [37, 49, 50]. Natomiast u larw pochodzących z końcowego okresu ostatniego stadium larwalnego JH stymuluje syntezę ekdysteroidów, jednak mechanizm tej stymulacji nie jest jeszcze wyjaśniony [37]. Zdaniem Gilberta [7] JH nie działa bezpośrednio na PG, lecz stymuluje uwalnianie z ciała tłuszczowego do hemolimfy czynnika tropowego, który pobudza gruczoły do wzmożonej syntezy ekdysteroidów.



Ryc. 3. Regulacja biosyntezy ekdysteroidów poprzez sprzężenie zwrotne wg 5, 46, zmodyfikowane.

### III-3.4. Czynniki pochodzący z ciała tłuszczowego i uwalniane do hemolimfy

Został on wyizolowany z hemolimfy larw *Manduca sexta* i wstępnie scharakteryzowany. Jest białkiem o m.c. około 30 kD wrażliwym na proteazy i termostabilnym [51]. W warunkach *in vitro* stymuluje syntezę ekdysteroidów około 5-krotnie [51]. Wykazano, że odgrywa on znaczącą rolę podczas metamorfozy owadów [37]. Postuluje się, że czynnik ten bierze udział w transporcie sterydów do PG co powoduje wzmożenie syntezy ekdysteroidów [51, 52].

### III-3.5. Rola kontroli nerwowej w regulacji funkcji PG

Gruczoły protorakalne owadów wielu gatunków są dobrze unerwione, jednak rola kontroli nerwowej w regulacji biosyntezy ekdysteroidów jest ciągle niejasna [37]. Z badań Richtera i Gersha [53] wynika, że u *Periplaneta americana* istnieje korelacja między aktywnością zwoju nerwowego gruczołu a mianem ekdysteroidów w hemolimfie. Wykazano również, że stymulacje elektroniczne nerwu dochodzącego do gruczołu mogą powodować wzrost wydzielania ekdyzonu [54]. Ostatnio Muszyńska-Pytel i wsp. [55] wykazali, że aktywność syntetyczna gruczołów protorakalnych u diapauzujących larw *Galleria mellonella* hamowana jest przez mózg na drodze nerwowej.

Zdaniem Watsona i wsp. [37], jeśli nawet gruczoły protorakalne owadów podlegają kontroli nerwowej, to jej rola w regulacji biosyntezy ekdysteroidów jest mniej istotna niż rola kontroli humoralnej.

### III-3.6. Zegar biologiczny

Jest to wewnętrzny mechanizm organizmu kierujący dobową rytmiką procesów fizjologicznych oraz zachowania się zwierząt [41]. Szczególne miejsce zajmują rytmy dobowe w rozwoju owadów. Wykazano, że uwalnianie PTH, czy też synteza i wydzielanie ekdysteroidów odbywa się w sposób rytmiczny w tzw. rytmie okołodobowym (ang. *circadian*). Z badań Mizoguchi i Ishizaki [56], wynika, że zegar biologiczny wraz z jego fotoreceptorami może być zlokalizowany nie tylko w mózgu owada (wydzielanie PTH), lecz również w gruczołach protorakalnych. Wykazali oni, że zegar biologiczny obecny w PG *Samia cynthia ricini* kontroluje syntezę i wydzielanie ekdysteroidów. Badania Cymborowskiego i wsp. [57, 58] potwierdzają istnienie zegara biologicznego w PG innego owada *Galleria mellonella* oraz wskazują, że może być on jednym z czynników regulujących syntezę i wydzielanie ekdysteroidów u owadów. Molekularny mechanizm działania tego zegara nie jest jeszcze znany.

## IV. Metabolizm

Ekdysteroidy metabolizowane są głównie w ciele tłuszczowym cewkach Malpighiego i jelicie środkowym [59]. Metabolity — aktywne biologicznie jak i nieaktywne produkty — są albo wydalane albo kumulowane w organizmie [60]. Wydalanie odbywa się przez jelito i cewki Malpighiego [61], natomiast zapasowe metabolity stanowią źródło aktywnego ekdysteroidu [14, 61].

Do badań metabolizmu ekdysteroidów (*in vitro* i *in vivo*) powszechnie używa się znakowanego ekdyzonu [60]. Do oznaczania aktywności metabolitów służą

testy biologiczne [62], natomiast chemiczną ich identyfikację prowadzi się głównie metodą spektroskopii masowej (MS) i jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) [15, 63].

### IV-1. Główne szlaki metabolizmu ekdysteroidów

Ekdysteroidy, podobnie jak sterydy kręgowców, metabolizowane są wewnątrz komórki [5]. Jedynym wyjątkiem jest przemiana 3-dehydroekdyzonu w ekdyzon zachodząca w hemolimfie owadów należących do *Lepidoptera* [7, 64].

Opisano wiele szlaków metabolizmu ekdysteroidów, wykazując znaczne różnice w ich przebiegu w zależności od gatunku owada, stadium rozwoju i tkanki [60]. Reakcje, którym podlega cząsteczka ekdyzonu, przedstawia rycina 4.

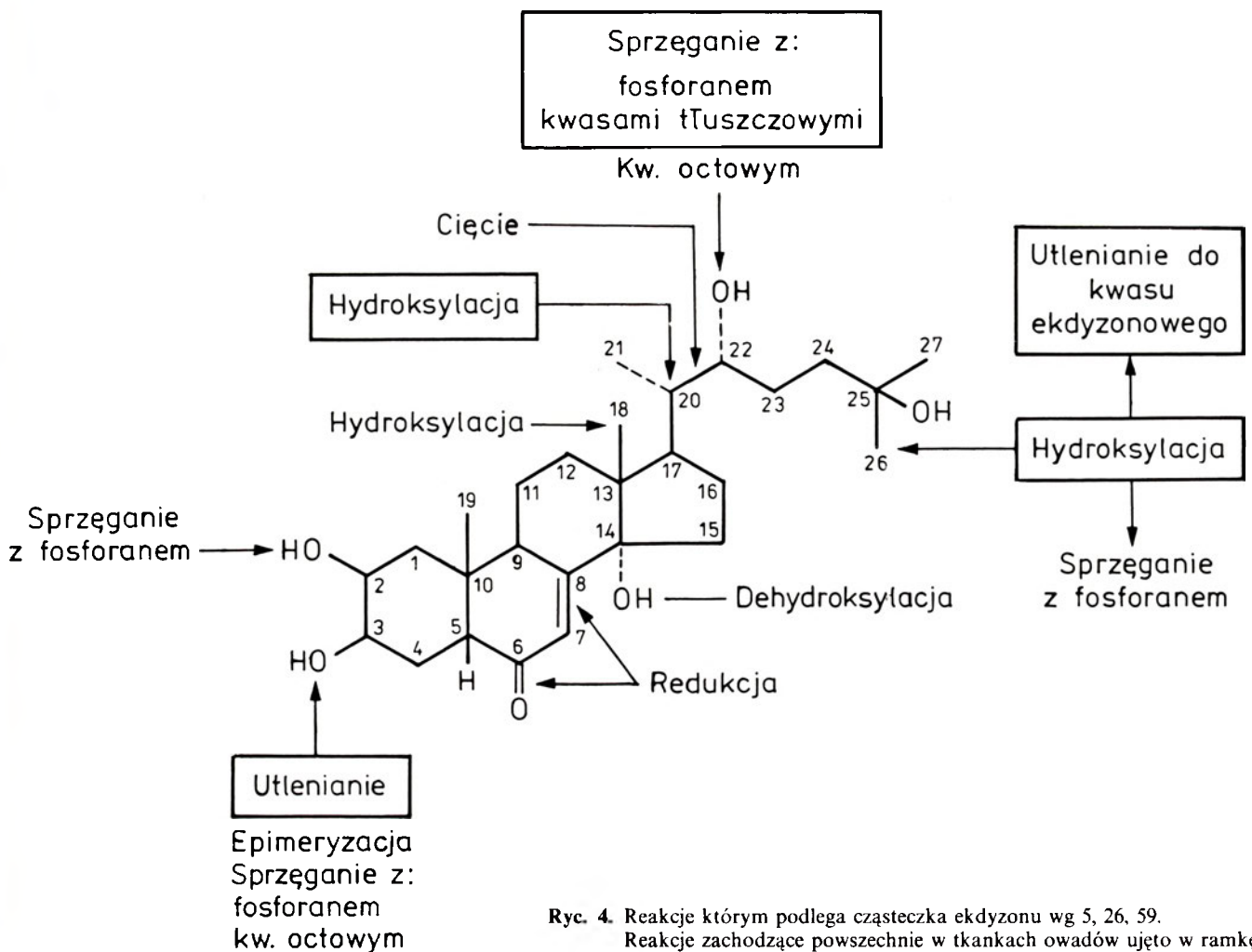
Hydroksylacja w pozycji C-20 aktywuje cząsteczkę ekdyzonu. 20-HE jest aktywną formą hormonu co najmniej w stadium larwalnym [5, 60]. Natomiast w wyniku hydroksylacji ekdyzonu w pozycji C-26 powstaje 26-hydroksyekdyzon, który następnie albo utleniany jest do kwasu ekdyzonowego albo też ulega sprzężeniu z fosforanem. C-20 i C-26 hydroksylacje, jak również powstawanie kwasu ekdyzonowego zachodzą powszechnie w tkankach owadów [60, 65].

Utlenianie dotyczy grupy hydroksylowej znajdującej się w pozycji C-3 ekdyzonu lub innego ekdysteroidu. Ekdyzon utlenia się do 3-dehydroekdyzonu który z kolei może się albo redukować z powrotem do ekdyzonu albo też do jego 3  $\alpha$ -epimeru [29, 60]. Odwracalne powstawanie 3-dehydroekdysteroidów zachodzi w tkankach różnych grup owadów, natomiast 3-epimeryzację wykazano jedynie w jelicie nielicznych ich gatunków [60, 66, 67].

Sprężone ekdysteroidy powstają w wyniku reakcji estryfikacji, zachodzącej najczęściej w pozycji C-22 a znacznie rzadziej w pozycjach C-2, C-3 i C-26 cząsteczki ekdysteroidu [5, 60]. C-22 i C-26 estry ekdysteroidów najczęściej z wyższymi kwasami tłuszczowymi czy fosforanem (donorem fosforanu jest najprawdopodobniej ATP) mogą się kumulować w organizmie owada stanowiąc tzw. zapasowe metabolity [5, 61, 65, 68]. Ich obecność wykazano w jajnikach i jajach niektórych gatunków owadów [61]. Podczas embriogenezy estry te ulegają hydrolizie i uwalniają się aktywne ekdysteroidy [60, 61, 65, 69]. C-2 i C-3 sprzężone ekdysteroidy wykazano zarówno w okresie późnej embriogenezy, jak i w rozwoju postembrionalnym owadów [65]. Należą one prawdopodobnie do tej grupy metabolitów, które jako nieaktywne produkty katabolizmu są wydalane z organizmu owada [5, 65].

### IV-2. Enzymy włączone w metabolizm ekdysteroidów

20-monooksygenaza ekdyzonowa (oksydoreduktaza; ekdyzon, zredukowany NADP: tlen, 20- $\beta$ -hydro-

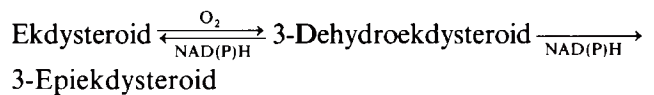


Ryc. 4. Reakcje którym podlega cząsteczka ekdyzonu wg 5, 26, 59. Reakcje zachodzące powszechnie w tkankach owadów ujęto w ramkę.

ksylująca, EC 1.14.99.22). Enzym katalizuje przemianę ekdyzonu w 20-hydroksyekdyzon. Reakcja zależy od cytochromu P-450 i wymaga NADPH jako koenzymu [27-29]. Aktywność tego enzymu związana jest zarówno z frakcją mikrosomalną jak i mitochondrialną [29]. 20-monooksygenaza ekdyzonowa nie wykazuje specyficzności substratowej. Wiele danych wskazuje, że ten sam enzym katalizuje C-20 hydroksylację również innych ekdysteroidów, np. 2-deoksyekdyzonu czy 26-hydroksyekdyzonu [7, 65]. Aktywność 20-monooksygenazy wykazano w różnych tkankach owadów, jak ciało tłuszczowe, cewki Malpighiego, jelito środkowe, epiderma, jajniki [28, 29].

Enzymami biorącymi udział w 3-epimeryzacji ekdysteroidów są: oksydaza ekdyzonowa i 3  $\alpha$ -reduktaza 3-oksoekdysteroidowa. Oksydaza ekdyzonowa (3-okso-reduktaza; ekdyzon: tlen, EC 1.1.3.16) jest enzymem katalizującym przemianę ekdyzonu i innych ekdysteroidów do 3-dehydroekdysteroidów [29, 59, 65]. Enzym ten, obecny w wielu różnych tkankach owadów [65], jest białkiem rozpuszczalnym o m.c. 240 kD [59]. U owadów wykazano obecność dwóch typów 3-reduktaz: 3  $\alpha$ -reduktazy odpowiedzialnej za przemianę 3-dehydroekdysteroidów (3-oksoekdysteroidów) do odpowiednich 3-epiekdysteroidów oraz 3  $\beta$ -reduktazy katalizującej przemianę 3-dehydroekdysteroidów z powrotem do początkowego ekdy-

teroidu [29]. Te rozpuszczalne enzymy działają w obecności zarówno NADH, jak i NADPH [29, 59, 65]. Aktywność 3  $\beta$ -reduktazy 3-oksoekdysteroidowej wykazano w wielu tkankach owadów co tłumaczyłoby, dlaczego 3-dehydroekdysteroidy nie kumulują się *in vivo*, nawet w obecności aktywnej oksydazy ekdyzonowej [65]. Natomiast 3  $\alpha$ -reduktaza 3-oksoekdysteroidowa występuje jedynie w jelicie środkowym nielicznych gatunków owadów [29, 66, 67]. Z badań Weiricha i wsp. [70] wynika, że 3-epimeryzacja ekdysteroidów zależy od połączonego działania oksydazy ekdyzonowej i 3  $\alpha$ -reduktazy. Reakcje te zachodzą wg schematu:



Dane dotyczące enzymów włączonych w proces powstawania i hydrolizy sprzężonych ekdysteroidów są szczątkowe. Obecność fosfotransferaz wykazano u kilku gatunków owadów [65]. Prawdopodobnie enzymem włączonym w powstawanie sprzężonych z fosforanem ekdysteroidów jest: fosfotransferaza ATP: ekdysteroidowa [29]. Isaac i wsp. [71] otrzymali preparat enzymatyczny z embrionów *Schistocerca gregaria* hydrolizujący C-22 fosfoestry ekdysteroidów. Ta embrionalna fosfohydrolaza działa w pH poniżej 5 i jest związana z frakcją mitochondrialno-

lizosomalną.

Badania Sakurai'a i wsp. [31] wskazują, że enzymem katalizującym przemianę 3-dehydroekdyzonu do ekdyzonu w hemolimfie *Manduca sexta* jest reduktaza 3-ketoekdysteroidowa działająca w obecności NADPH. Ostatnio w hemolimfie *Ostrinia nubilalis* wykazano wysoki poziom ketoreduktazy odpowiedzialnej za przemianę 3-dehydroekdyzonu w ekdyzon [72]. Zapewne enzym z hemolimfy *Manduca sexta* i *Ostrinia nubilalis* jest 3  $\beta$ -reduktazą 3-oksoekdysteroidową, której aktywność wykazano również w jeliści środkowym *Manduca sexta* [25, 70].

### IV-3. Regulacje metabolizmu ekdysteroidów

Stężenie krążącego w organizmie hormonu, tzn. jego miano, zależy nie tylko od procesów związanych z jego biosyntezą i wydzielaniem, ale również od metabolizmu i wydalania. Już w 1969 r. Karlson i Bode [73] twierdzili, że inaktywacja hormonu może mieć znaczący wpływ na regulację jego miana. Potwierdziły to dalsze badania. U owadów należących do *Diptera* i *Lepidoptera* wykazano, że w czasie gdy miano endogenego hormonu szybko wzrasta następuje znaczne obniżenie szybkości katabolizmu 20-HE, jak i przemiany ekdyzonu w 20-HE [74]. Przy czym spadek szybkości katabolizmu 20-HE (o około 90% u *Caliphora vicina*) jest znacznie większy niż spadek C-20 hydroksylacji [75]. Trudno jest odpowiedzieć na pytanie, w jakim stopniu obniżony metabolizm wpływa na wzrost miana 20-HE. Szacuje się, że gdyby nie było tak drastycznego obniżenia katabolizmu, miano endogenego hormonu byłoby zredukowane o połowę [76]. Dane te nie mogą jednak odnosić się do wszystkich grup owadów. U *Orthoptera* zaobserwowano nie obniżenie lecz wzrost C-20 hydroksylacji zgodny ze wzrostem miana 20-HE [77, 78]. Jednak i u tych owadów wykazano znaczne obniżenie szybkości wydalania produktów katabolizmu w czasie, gdy miano hormonu było najwyższe [79].

Lehman i Koelman [80] wysunęli hipotezę, że neuropeptydy biorą udział w regulacji metabolizmu ekdyzonu. Neuropeptydy za pomocą kinazy białkowej zależnej od cAMP regulowałyby fosforylację enzymów katalizujących przemianę ekdyzonu w 20-HE, a następnie w 20,26 dihydroksyekdyzon [7, 80]. Badania Hoggarda i Reesa [81] potwierdzają tę hipotezę. Wyniki ich badań wskazują, że 20-monooksygenaza ekdyzonowa może występować w dwóch formach: aktywnej ufosforylowanej i nieaktywnej nieufosforylowanej. Jednak w dalszym ciągu brak jest danych pozwalających w pełni wyjaśnić mechanizmy związane z regulacją metabolizmu ekdysteroidów.

### V. Zmiany stężenia ekdysteroidów w rozwoju owada

Ekdysteroidy aktywne pod względem hormonal-

nym występują u owadów w stężeniach od  $10^{-8}$  do  $10^{-5}$  M [5], a ich miano w hemolimfie zmienia się cyklicznie w rozwoju [82]. Pod koniec każdego stadium larwalnego występuje szczyt ekdysteroidów, a następnie stężenie bardzo szybko spada i tuż przed linką i w okresach międzylinkowych jest niskie. U wielu owadów holometabolicznych, które charakteryzuje cykl rozwojowy z przeobrażaniem zupełnym, pojawia się dodatkowy mały szczyt ekdysteroidów w środkowym okresie ostatniego stadium larwalnego. Inicjuje on zmiany w zachowaniu larwy oraz wywołuje przełączenie programu przemian z larwalnego na poczwarkowy [83, 84]. W trakcie rozwoju osobniczego obserwuje się zarówno zmiany bezwzględne stężenia ekdysteroidów, jak i zmiany w ilości różnych ekdysteroidów względem siebie. W stadium poczwarki występuje bardzo rozległy szczyt ekdysteroidów niezbędny do prawidłowego zakończenia metamorfozy owada. U *Manduca sexta* składa się on z kilku zachodzących na siebie szczytów. Najpierw wzrasta miano ekdyzonu, następnie zaś 20-HE i na końcu pojawia się najmniejszy szczyt 20,26-dihydroksyekdyzonu [7]. Tak więc zarówno ekdyzon, jak i 20-HE, a możliwe, że również 20,26-dihydroksyekdyzon, odgrywają swoistą rolę w rozwoju owada [7]. Natomiast pojawienie się ekdysteroidów u dorosłej postaci owada jest związane z reprodukcją [82].

### VI. Transport

Ekdysteroidy krążące w hemolimfie występują w dwóch formach: nie związanej i związanej białkami [5, 85]. Nie związane stanowią aktywną formę hormonu, natomiast związane z białkiem (białkami) są nieaktywne biologicznie. Ich funkcja może się sprowadzić do utrzymania „rezerwy hormonalnej” w ciele owada [5]. W hemolimfie wykazano obecność zarówno specyficznych [86], jak i niespecyficznych białek wiążących ekdysteroidy [87] różnych strukturalnie od wewnątrzkomórkowych białkowych receptorów ekdysteroidowych [88, 89].

Przenikanie wolnych ekdysteroidów z hemolimfy do wnętrza komórki odbywa się za pomocą dwóch różnych mechanizmów: transportu aktywnego z udziałem przenośników lub też drogą dyfuzji [5, 90]. Transport aktywny dotyczy niskich stężeń ekdysteroidów i może być hamowany przez czynniki blokujące grupy tiolowe [90].

### VII. Rola ekdysteroidów w rozwoju osobniczym

Ekdysteroidy kontrolują takie procesy, jak linienie, wzrost czy gametogenezę. Najlepiej poznanym zjawiskiem kontrolowanym przez ekdysteroidy jest linienie (zrzucanie starej kutikuli i produkcja nowej) zachodzące zarówno w stadium embrionalnym jak i w rozwoju postembrionalnym [10, 91]. Kontrola ta przejawia się w stymulacji takich procesów, jak: apoliza, podziały

komórek epidermy, odkładanie nowych warstw kutikuli i hamowaniu tych, które związane są z końcowymi etapami linienia — trawieniem starej kutikuli czy melanizacją nowej [84, 91]. Ekdysteroidy kontrolują procesy linienia przy współdziałaniu hormonu juvenilnego [91]. W obecności JH ekdysteroidy indukują odkładanie kutikuli larwalnej, podczas gdy nieobecność tego hormonu prowadzi do wytworzenia kutikuli poczwarkowej [92].

Ekdysteroidy regulują morfogenezę i różnicowanie się dysków imaginalnych, tzn. grup komórek pochodzenia embrionalnego niezróżnicowanych, stanowiących załączki struktur dorosłego owada, które w stadium larwalnym ulegają jedynie podziałom komórkowym. Dyski te w czasie metamorfozy rozwijają się w struktury dorosłego owada [7, 93].

Wykazano również, że ekdysteroidy stymulują gametogenezę, podczas metamorfozy [91, 94].

Mechanizm działania ekdysteroidów na poziomie komórkowym jest przedmiotem oddzielnego artykułu<sup>1</sup>.

Artykuł otrzymano 24 lutego 1994 r.  
Zaakceptowano do druku 26 maja 1994 r.

## Piśmiennictwo

- Butenandt A, Karlson P (1954) *Z Naturforsch* **9b**: 389-391
- Goodwin TW, Horn DHS, Karlson P, Koolman J, Nakanishi K, Robbins WE, Siddall JB, Takemoto T (1978) *Nature* **272**: 122
- Koolman J (1982) *Insect Biochem* **12**: 225-250
- Lafont R, Horn DHS (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone Georg Thieme Verlag, Stuttgart* str 39-64
- Koolman J (1990) *Zool Science* **7**: 563-580
- Feldlaufer MF (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone Georg Thieme Verlag, Stuttgart* str 308-312
- Gilbert LI (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, str 448-471
- Bollenbacher WE, Granger NA (1985) W: Kerkut GA, Gilbert LI (red) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* t 7 Pergamon Press, Oxford, 109-151
- Redfern CPF (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, str 182-187
- Lanot R, Dorn A, Gunster B, Thiebold J, Lagucieux M, Hoffmann JA (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone Georg Thieme Verlag, Stuttgart* str 262-270
- Ohnishi E, Mizuno T, Ikekawa N, Ikeda T (1981) *Insect Biochem* **11**: 155-159
- Rees HH (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, str 152-160
- Loeb MJ, Woods CW, Brandt EP, Borkovec AB (1982) *Experientia* **218**: 896-898
- Delbecq J-P, Weidner K, Hoffmann KH (1990) *Invert Reprod Devel* **18**: 29-42
- Morgan ED, Marco MP (1990) *Invert Reprod Devel* **18**: 55-66
- Karlson P, Hoffmeister H (1963) *Z Physiol Chem* **331**: 298-300
- Clayton RB (1964) *J Lipid Res* **5**: 3-19
- Svoboda JA, Thompson MJ (1985) W: Kerkut GA, Gilbert LI (red) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* t 10 Pergamon Press, Oxford, str 137-175
- Rees HH (1985) W: Kerkut GA, Gilbert LI (red) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* t 7 Pergamon Press, Oxford, str 249-293
- Feldlaufer MF, Svoboda JA (1986) *Insect Biochem* **16**: 45-48
- Ikekawa N (1983) *Experientia* **39**: 466-472
- Milner NP, Nali M, Gibson JM, Rees HH (1986) *Insect Biochem* **16**: 17-23
- Warren JT, Sakurai S, Rountree DB, Gilbert LI (1988a) *J Insect Physiol* **34**: 571-576
- Grieneisen ML, Warren JT, Sakurai S, Gilbert LI (1991) *Insect Biochem* **21**: 41-51
- Warren JT, Hetru C (1990) *Invert Reprod Devel* **18**: 91-99
- Hoffmann JA (1986) *Insect Biochem* **16**: 1-9
- Kappler C, Hetru C, Durst F, Hoffmann J (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, str 161-166
- Smith SL, Mitchel MJ (1986) *Insect Biochem* **16**: 49-55
- Weirich GF (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, str 174-180
- Warren JT, Sakurai S, Rountree DB, Gilbert LI, Lee SS, Nakanishi K (1988b) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 958-962
- Sakurai S, Warren JT, Gilbert LI (1989) *Arch Insect Biochem Physiol* **10**: 179-197
- Kappler C, Kabbouh M, Hetru C, Durst F, Hoffmann JA (1988) *J Steroid Biochem* **31**: 891-898
- Meister MF, Brandtner HM, Koolman J, Hoffmann JA (1987) *Int J Invertebr Reprod Dev* **12**: 13-28
- Delbecq J P, Meister MF, Quennedey A (1986) *Insect Biochem* **16**: 57-63
- Kappler C, Kabbouh M, Durst F, Hoffmann JA (1986) *Insect Biochem* **16**: 25-32
- Kabbouh M, Kappler C, Hetru C, Durst F (1987) *Insect Biochem* **17**: 1155-1161
- Watson RD, Spaziani E, Bollenbacher WE (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, str 188-203
- Ihizaki H (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, str 204-210
- Sakurai S, Williams CM (1989) *Gen comp Endocr* **75**: 204-216
- Bidmon HJ, Koolman J (1989) *Experientia* **45**: 106-109
- Cymborowski B (1984) W: Burg I (red) *Zegary biologiczne, PWN, Warszawa*
- Loeb MJ, Brandt EP, Woods CW, Borkovec AB (1987) *J exp Zool* **243**: 275-282
- Agui N, Granger NA, Gilbert LI, Bollenbacher WE (1979) *Proc Nat Acad Sci USA* **76**: 5694-5698
- Agui N, Bollenbacher WE, Granger NA, Gilbert LI (1980) *Nature (Lond)* **285**: 669-670
- Raabe M (1983) *Adv Insect Physiol* **17**: 205-303
- Bidmon HJ, Stumpf WE, Granger NA (1992) *Experientia* **48**: 42-47
- Cymborowski B, Stolarz G *J Insect Physiol* **25**: 939-942
- Safranek L, Cymborowski B, Williams CM (1980) *Biol Bull* **158**: 248-256
- Cymborowski B, Zimowska G (1984) *J Insect Physiol* **30**: 911-918
- Rountree DB, Bollenbacher WE (1986) *J Exp Biol* **120**: 41-58
- Watson RD, Ciancio MJ, Gunnar WP, Gilbert LI, Bollenbacher WE (1985) *J Insect Physiol* **31**: 487-494
- Gruetzmacher MC, Gilbert LI, Bollenbacher WE (1984) *J Insect Physiol* **30**: 771-778
- Richter K, Gersch M (1983) *Experientia* **39**: 917-918
- Richter K (1990) W: IX<sup>th</sup> *Ecdysone Workshop, Paris Invert Reprod Devel* **18**: 1-2 str 125
- Muszyńska-Pytel M, Trzcńska R, Aubry M, Pszczółkowski MA, Cymborowski B (1993) *Insect Biochem Molec Biol* **23**: 33-41
- Mizoguchi A, Ishizaki H (1982) *Proc Nat Acad Sci USA* **79**: 2726-2730

<sup>1</sup> Artykuł „Receptor ekdysteroidowy *Drosophila melanogaster* — jeden z czynników transkrypcji kontrolujących metamorfozę” autorstwa A. Ożyha ra ukaże się w następnym zeszycie *Post. Biochem.*

57. Cymborowski B, Śmietanko A, Delbecque JP (1989) *Comp Biochem Physiol* **94a**: 431-438
58. Cymborowski B, Śmietanko A, Delbeque JP (1990) W: IX<sup>th</sup> Ecdysone Workshop Paris, *Invert Reprod Devel* **18**: 1-2 str 109
59. Koolman J, Karlson P (1985) W: Kerkut GA, Gilbert LI (red) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* t 10 Pergamon Press, Oxford 343-361
60. Lafont R, Connat JL (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, str 167-173
61. Isaac RE, Slinger AJ (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, str 250-253
62. Cymborowski B (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone* Georg Thieme Verlag, Stuttgart str 144-149
63. Thomson MJ, Lusdy WR (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, str 65-74
64. Kiriishi S, Rountree DB, Sakurai S, Gilbert LI (1990) *Experientia* **46**: 716-721
65. Lafont R, Koolman J (1984) W: Hoffmann J, Porchet M (red) *Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones* Springer-Verlag Berlin Heidelberg str 196-226
66. Blais C, Lafont R (1984) *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* **365**: 809-818
67. Milner NP, Rees HH (1985) *Biochem J* **231**: 369-374
68. Whiting P, Dinan L (1989) *Insect Biochem* **19**: 759-767
69. Whiting P, Sparks S, Dinan L (1993) *Insect Biochem Molec Biol* **23**: 319-329
70. Weirich GF, Thompson MJ, Svoboda JA (1990) *Invert Reprod Devel* **18**: 132
71. Isaac RE, Sweeney FP, Rees HH (1983) *Biochem Soc Trans* **11**: 379-380
72. Gelman DB, Thyagaraja BS, Kelly TJ, Masler EP, Bell RA, Borkovec AB (1990) *Invert Reprod Devel* **18**: 114
73. Karlson P, Bode C (1969) *J Insect Physiol* **15**: 111-118
74. Koolman J (1981) W: Sehnal F, Menn JJ, Cymborowski B (red) *Regulation of Insect Development and Behaviour*, Wrocław, Technical University str 93-106
75. Koolman J (1980) W: Hoffmann JA (red) *Progress in Ecdysone Research*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam str 187-209
76. Young NL, Young PR (1976) *Insect Biochem* **6**: 169-177
77. Johnson P, Rees HH (1977) *Biochem J* **168**: 513-520
78. Feyereisen R, Durst F (1980) *Molec Cell Endocrinol* **20**: 157-169
79. Hoffmann JA, Koolman J, Karlson P, Joly P (1974) *Gen Comp Endocrinol* **22**: 90-97
80. Lehman M, Koolman J (1986) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **367**: 387-393
81. Hoggard N, Rees HH (1988) *J Insect Physiol* **34**: 647-653
82. Steel CGH, Vafopoulou X (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone* Georg Thieme Verlag, Stuttgart str 221-231
83. Riddiford LM (1981) *Amer Zool* **21**: 751-762
84. Truman JW (1988) W: Evans PD, Wigglesworth VB (red) *Advances in Insect Physiology*, Academic Press, London t 21 str 1-34
85. Whitehead DL (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone* Georg Thieme Verlag, Stuttgart str 232-249
86. Feyereisen R (1985) W: Law JH, Rilling HC (red) *Methods in Enzymology* t 111, Academic Press, NY str 442-453
87. Koolman J (1985) W: Law JH, Rilling HC (red) *Methods in Enzymology* t 111, Academic Press, NY str 429-437
88. Cherbas L, Yonge CD, Cherbas P, Williams CM (1980) *Roux's Arch Dev Biol* **189**: 1-15
89. Lehmann M, Koolman J (1988) *Mol Cell Endocrinol* **57**: 239-249
90. Splindler KD, Splindler-Barth M (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone* Georg Thieme Verlag, Stuttgart str 245-249
91. Sehnal F (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone* Georg Thieme Verlag, Stuttgart str 271-278
92. Michalik J (1991) *Post Biochem* **37**: 172-178
93. Yund MA (1989) W: Koolman J (red) *Ecdysone* Georg Thieme Verlag, Stuttgart str 384-392
94. Raabe M (1986) *Adv Insect Physiol* **19**: 29-154

**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**





## Do członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

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

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

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

**Prenumerata krajowa dla instytucji:**  
580 000 zł.

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

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

# Komunikat Zarządu Głównego

20.06.1994 roztrzygnięty został konkurs na najlepszy wykład akademicki. Przyznano dwie równorzędne nagrody:

- Panu dr Januszowi Siedleckiemu z Centrum Onkologii w Warszawie za wykład p.t. „Molekularne podstawy chorób nowotworowych”
- Panu dr Adamowi Szewczykowi z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN w Warszawie za wykład p.t. „ATP — wewnątrzkomórkowy przekaznik informacji”

Przyznano także dwie równorzędne drugie nagrody:

- Pani mgr Mirosławie Siatockiej z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu za wykład p.t. „Struktura i właściwości syntetaz aminoacylo-tRNA”
- Pani mgr Elizie Wyszko z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu za wykład p.t. „Struktura i właściwości czynnika transkrypcyjnego IIIA (TF IIIA) *Xenopus levis*”

## Pokwitowanie dla wpłacającego

zł.....  
słownie.....  
wpłacający.....  
.....  
.....  
imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę

zł.....

.....  
podpis przyjmującego

## Odcinek dla posiadacza rachunku

zł.....  
słownie.....  
wpłacający.....  
.....  
.....  
imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę

zł.....

.....  
podpis przyjmującego

## Odcinek dla poczty lub banku

zł.....  
słownie.....  
wpłacający.....  
.....  
.....  
imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę

zł.....

.....  
podpis przyjmującego

# 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 „Postęпах 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, deklarując 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 „Postęпах 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 ródnać 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 redakcja. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: tabele i ryciny noszą cyfry arabskie, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołówkiem preferowane miejsce umieszczenia tabeli, ryciny, czy wzoru. Tabele odpowiednio porubrykowane, winny być opatrzone jednoznacznym tytułem i ewentualnie także niezbędnymi objaśnieniami. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Ilustracje należy podpisać nazwiskiem pierwszego z autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „górną-dół” (ołówkiem na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

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

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

