

# POSTĘPY BIOCHEMII

## Advances in Biochemistry

TOM 39, NR 2, 1993

<b>Tadeusz Baranowski</b>	
— Wspomnienia . . . . .	82
Zmodyfikowane nukleozydy w tRNA	84
Utlenianie puryn źródłem mutacji	91
Organizacja genetyczna HBV . . . .	99
Białka jedwabiu — biosynteza, ekspresja genów . . . . .	105
Sekcja heterologicznych białek drożdży . . . . .	111
Transglutaminazy a modyfikacja białek przez poliaminy . . . . .	118
Białka wiążące wapń w układzie nerwowym . . . . .	126
Roła AVT i melatoniny u ryb . . . .	134
Fenolowe sygnały roślin . . . . .	139

**Duża wydajność  
brak wiązania balastu  
BAKERBOND Wide-Pore**



Odzysk w % z zastosowaniem BAKERBOND Wide-Pore 40  $\mu$  PRESCALE

Białka	PEI	QUAT	CBX	CARB. SULF.	MAb	ABx
Albumina surowicy wołowej	97	95	96	95	98	100
Owalbumina	99	97	98	97	97	99
Transferyna	97	99	100	99	98	98
Hemoglobina	97	95	95	96	-	-
Mioglobina	97	98	99	98	-	-
Cytochrom C	99	95	98	97	-	-
Lizozym	96	98	97	95	-	-
Anhydraza węglanowa	96	92	98	97	-	-
$\beta$ -laktoglobulina (A+B)	98	100	100	98	-	-
Ig surowicy krwi ludzkiej	97	95	96	96	98	97
Ig surowicy krwi mysiej	-	-	-	-	97	97
Ig surowicy krwi króliczej	-	-	-	-	98	99



**Wysoki odzysk białek**

Używając BAKERBOND Wide-Pore kolumn do HPLC (5  $\mu$  i 15  $\mu$ ) lub faz (40  $\mu$  PRESCALE), od razu można uzyskać przynajmniej 97% białka i oznaczyć jego aktywność. Rozdział następuje jednoetapowo, przy umiarkowanym ciśnieniu i niskim stężeniu soli. Niespecyficzne substancje nie są w ogóle wiązane.

Na temat BAKERBOND Wide-Pore istnieje bezpłatna broszura: EUROCOLOR Chemikalia Laboratoryjne, POBox 46, 90-980 Łódź-7, tel. 813140, 844614

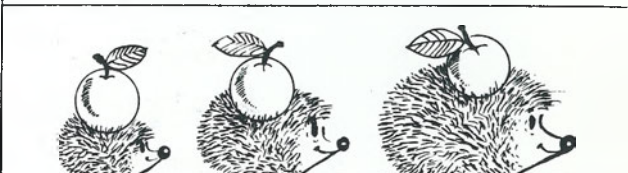
**Zawsze wysoka  
pojemność złóż  
BAKERBOND Wide-Pore**



Zdolność wiązania w mg białka/g BAKERBOND Wide-Pore 40  $\mu$

Białka	C <sub>4</sub>	HIC	PEI	CBX	ABx
Albumina surowicy krwi wołowej	140	180	200	190	150
Owalbumina				170	
Hemoglobina		200	180	190	
Cytochrom C				200	
Lizozym				200	
Ig surowicy krwi ludzkiej			150		150
Ig surowicy krwi mysiej			150		150
Ig surowicy krwi króliczej			150		150

Są to najniższe wartości zdolności wiązania



**Wysoka zdolność wiązania białek**

Fazy BAKERBOND Wide-Pore o rozmiarach 5, 15 i 40  $\mu$  nadają się szczególnie do rozdziału biopolimerów. Zdolność wiązania wymiennicy jonowych, sorbentu Hi-Propyl i faz odwróconych jest >150 mg białka w przeliczeniu na g suchego wypełnienia. Wysoką specyficzną i selektywność rozdziału uzyskuje się dzięki trwałemu i jednolitemu pokryciu silikonowego nośnika. Odpowiedni nośnik krzemionkowy gwarantuje stabilność wypełnienia kolumny i niskie ciśnienie na wlocie kolumny. Odzysk białka wyrażony ilością i aktywnością jest większy niż 97%.

EUROCOLOR Chemikalia Laboratoryjne, POBox 46, 90-980 Łódź-7, tel. 813140, 844614

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

## WYDAWCA

Editor  
POLSKIE TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
Polish Biochemical Society  
16 Freta Street  
00-227 Warszawa  
Poland

Drukarnia Naukowo-Techniczna  
Mińska 65  
03-828 Warszawa

## REDAKCJA

Editorial Board  
REDAKTOR NACZELNY  
Editor in chief  
ZOFIA ZIELIŃSKA  
tel. 31-24-03  
REDAKTORZY  
Editors  
GRAŻYNA PALAMARCZYK  
tel. 658-47-02  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
tel. 200-381 w. 488  
ANNA SZAKIEL  
tel. 23-20-46  
JOLANTA GRZYBOWSKA  
tel. 10-50-71 w. 155

## RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue  
ANDRZEJ GARDAS  
(Warszawa)  
BARBARA GRZELAKOWSKA-  
-SZTABERT  
(Warszawa)  
ANNA JAKUBIEC-PUKA  
(Warszawa)  
WITOLD JACHYMCZYK  
(Warszawa)  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
(Warszawa)  
LESZEK KACZMAREK  
(Warszawa)  
STANISŁAW KARPIAK  
(Warszawa)  
JACEK KUŹNICKI  
(Warszawa)  
STANISŁAW LEWAK  
(Warszawa)  
ADAM NOWOŚLAWSKI  
(Warszawa)  
PRZEMYSŁAW SZAFRAŃSKI  
(Warszawa)  
EWA ŚLEDZIEWSKA-GÓJSKA  
(Warszawa)  
JÓZEF ZBOROWSKI  
(Warszawa)

## ADRES REDAKCJI

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

## SPIS TREŚCI CONTENTS

- Profesor Tadeusz Baranowski — Wspomnienia**  
Professor Tadeusz Baranowski — Obituary  
JANINA KWIATKOWSKA . . . . . 82
- Biologiczne funkcje zmodyfikowanych nukleozydów w transferowych RNA**  
Biological functions of modified nucleosides in transfer RNAs  
ZOFIA SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA . . . . . 84
- Utlenianie puryn — źródło mutacji spontanicznych**  
Oxidation of purines — the origin of spontaneous mutations  
BARBARA TUDEK . . . . . 91
- Organizacja genetyczna wirusa zapalenia wątroby typu B**  
Genetic organization of hepatitis B virus  
MAŁGORZATA SIDORKIEWICZ, ANDRZEJ PŁUCIENNICZAK . . . . . 99
- Białka jedwabiu *B.mori* — charakterystyka, biosynteza i regulacja ekspresji genów**  
Silk proteins of *B.mori* — description, biosynthesis and regulation of gene expression  
BARBARA KLUDKIEWICZ, KRYSZYNA GRZELAK . . . . . 105
- Sekrecja heterologicznych białek z *S. cerevisiae***  
Secretion of heterologous proteins by *S. cerevisiae*  
BOŻENA REMPOŁA . . . . . 111
- Nowy aspekt metabolizmu poliamin — posttranslacyjne, zależne od transglutaminaz, modyfikacje białek przez poliaminy**  
New aspect of polyamine metabolism — post-translational, transglutaminase-dependent, protein modifications mediated by polyamines  
MAŁGORZATA MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA . . . . . 118
- Białka wiążące wapń występujące w układzie nerwowym**  
Calcium binding protein in nervous system  
ANNA FILIPEK . . . . . 126
- Rola wazotocyny argininowej i melatoniny w fizjologicznych mechanizmach adaptacji ryb kostnoszkieletowych do zmian zasolenia środowiska**  
Role of arginine vasotocine and melatonin in physiological adaptation mechanisms to salinity changes in *Teleostei*  
EWA KULCZYKOWSKA . . . . . 134
- Fenolowe metabolity wtórne jako sygnały roślin w oddziaływaniach międzygatunkowych**  
Phenolic secondary metabolites as plant signals in interspecies interactions  
PRZEMYSŁAW WOJTASZEK . . . . . 139





Profesor Tadeusz Baranowski  
1910-1993

24 marca 1993 roku zmarł profesor Tadeusz Baranowski. Odszedł od nas wielki uczyony o międzynarodowej sławie, nauczyciel i wychowawca kilku pokoleń biochemików i lekarzy. Przeniósł tradycję szkoły naukowej Jakuba Karola Parnasa z Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jana Kazimierza we Lwowie do Wrocławia. Stworzył tu Zakład Chemii Fizjologicznej na Wydziale Lekarskim, jedyną wówczas placówkę biochemiczną w mieście. Uczniowie Profesora zasilili następnie wszystkie instytucje naukowe miasta, tworząc nowe ośrodki biochemiczne. Liczni biochemicy, odbywający staże i szkolenia naukowe pod kierownictwem Profesora Baranowskiego przenieśli Jego nauki do wielu placówek w kraju i za granicą.

Tadeusz Baranowski urodził się 13 września 1910 roku we Lwowie. Uzyskawszy Dyplom lekarza w 1933 roku na Wydziale Lekarskim UJK, podjął pracę w Zakładzie Chemii Lekarskiej pod kierunkiem J. K. Parnasa. Tu powstały pierwsze prace Baranowskiego na temat amoniogenezy. Od 1935 roku pracował przez dwa lata nad sacharozurią w Zakładzie Chemii Lekarskiej Uniwersytetu Stefana Batorego w Wilnie, kierowanym przez Włodzimierza Mozołowskiego, gdzie uzyskał stopień naukowy doktora medycyny.

Powróciwszy do Lwowa włączył się w prace zespołu badającego przenoszenie grup fosforanowych. Z tego okresu datują się ważne prace w dziedzinie transfosforyzacji nukleotydów, tworzenia ATP i fosforylacji glikogenu w mięśniu. Po raz pierwszy zastosowano wtedy znakowany fosfor do badań nad glikolizą. W 1938 roku doktor Baranowski habilitował się. Wtedy też zajął się krystalizacją białek. Uzyskał w formie krystalicznej albuminę surowiczą oraz miogen mięśniowy o aktywności aldolazy. Te pionierskie badania dały początek serii prac nad enzymami mięśniowymi, prowadzonymi później przez Profesora i jego uczniów we Wrocławiu. W czasie wojny włączył on do swej tematyki badania nad budową i funkcją witaminy K. Zaowocowały one ważnymi odkryciami.

W czasie okupacji niemieckiej profesor Baranowski opuścił Lwów. Krótko pracował jako lekarz w Szczawnicy. W 1945 roku początkowo wykładał chemię fizjologiczną na Uniwersytecie Jagiellońskim. Natychmiast jednak kiedy stało się to możliwe, bo już 9 maja 1945 roku, udał się wraz z ekipą kierowaną przez prof. Stanisława Kulczyńskiego do Wrocławia, by tworzyć tam Uniwersytet. Współtworzył i organizował Wydział Lekarski, dosłownie własnymi rękoma: odgruzowywał budynki, stał na czele strzegących ich grup samoobrony, odnajdywał i przywoził ukrytą przez ustępujące wojska aparaturę i księgozbiory. Jednocześnie organizował Zakład Chemii Fizjologicznej. Mianowany profesorem nadzwyczajnym objął kierownictwo Zakładu. Od samego początku mimo ciężkich warunków prowadził dydaktykę na wysokim poziomie i rozpoczął intensywną pracę naukową, poświęcając nadal swój czas i wysiłek organizacji Wydziału Lekarskiego, przekształconego później w Akademię Medyczną. Zorganizował Wydział Farmacji i był jego pierwszym dyrektorem. W latach 1948—1949 pełnił funkcje dziekana Wydziału Lekarskiego, a 1965—1968 — Rektora Akademii Medycznej. Od 1970 roku był dyrektorem Instytutu Biochemii i Biofizyki, potem — Biochemii i Fizjologii A.M. Od 1955 roku (już jako profesor zwyczajny) kierował także Zakładem Biochemii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej. Pod jego kierunkiem rozpoczęto tam kontynuowane do dziś badania nad antygenami krwinek czerwonych. Od 1954 roku był członkiem — korespondentem, a od 1969 — członkiem rzeczywistym PAN. Był członkiem prezydium PAN, sekretarzem Oddziału Wrocławskiego, a przez dwie kadencje przewodniczył Komitetowi Biochemii i Biofizyki. Pełnił też ważne funkcje w Radzie Naukowej przy Ministrze Zdrowia i w Komitecie Nagród Państwowych.

Te rozliczne i pracochłonne funkcje nigdy nie odrywały jednak Profesora od działalności naukowej. Prowadząc osobiście doświadczenia i kierując pracą uczniów stworzył silny ośrodek enzymologiczny. Głównym zainteresowaniem Profesora były enzymy glikolityczne. Aż 10 spośród nich uzyskano w homogennej, a większość w krystalicznej postaci, także z mięśni

ludzkich. Dehydrogenaza alfa-fosfoglicerolowa uzyskała nazwę enzymu Baranowskiego. Prace nad strukturą, kinetyką i regulacją enzymów glikolitycznych są nadal kontynuowane w Zakładzie Biochemii, m.in. we współpracy z ośrodkami amerykańskimi. Profesor Baranowski prowadził też uwieńczone sukcesem badania hormonów peptydowych, jak ACTH, bradykininy i somaotropiny. W 1952 roku otrzymał Państwową Nagrodę Naukową I stopnia za wprowadzenie ACTH do leczenia. Dbał o to, aby teoretyczne prace prowadzone przez kierowane przez Niego zespoły miały związek z medycyną praktyczną. GGTP, enzym odkryty z Jego udziałem wszedł na stałe do badań diagnostycznych. Prace nad nim zostały nagrodzone w 1964 roku Państwową Nagrodą Naukową II stopnia. Badania nad genetycznymi i posttranslacyjnymi zmianami enzymów glikolitycznych w patologii stały się jednym z tradycyjnych tematów Zakładu Biochemii.

Po swym odejściu na emeryturę Profesor nadal prowadził prace doświadczalne i publikował ich wyniki. Odkrył nową, uboczną reakcję katalizowaną przez kinazę pirogronianową i regulacyjny wpływ RNA na ten enzym.

Ogółem ogłosił 164 prace naukowe. Ten niestrudzo-

ny badacz przykładał też wielką wagę do dydaktyki. Stale unowocześniał wykłady, wprowadzając do nich najnowsze odkrycia. Czuwał nad całym procesem dydaktycznym Zakładu Biochemii. Jego podręczniki „Chemia Fizjologiczna” i „Podręcznik Biochemii” były wielokrotnie wznawiane i do dziś służą studentom.

Profesor Tadeusz Baranowski był członkiem — założycielem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i jego Członkiem Honorowym. Był członkiem Biochemical Society w Londynie, a także członkiem towarzystw integrujących lokalne środowiska naukowe: Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego i Poznańskiego Towarzystwa Przyjaciół Nauk.

Odszedł od nas Profesor Tadeusz Baranowski, strudzony swym wypełnionym pracą życiem. Zostało po nim bardzo wiele: trwałe miejsce w biochemii, uznanie świata nauki, szereg odkryć naukowych. A nade wszystko pozostawił swą szkołę biochemiczną: rzesze wykształconych studentów i blisko 20 wychowanków, którzy kierują własnymi zespołami badawczymi i znacząco zaistnieli w świecie nauki.

*Janina Kwiatkowska*

**The Oxford Glycobiology Institute, Oxford GlycoSystems and Department of Pharmaceutical Biochemistry of Białystok University Medical School, will organize a practical and lecture course on Glycobiology, including advanced approaches to the release and analysis of oligosaccharides from glycoproteins, for 15-20 participants on 22-28 August, 1993.**

**For information please write to:**

**Prof. Krzysztof Zwierz,  
Department of Pharmaceutical Biochemistry,  
Białystok University Medical School,  
ul. Adama Mickiewicza 2,  
15-230 Białystok, Poland,  
Fax: 48 85 24 907.**

**Deadline: 1 Marz, 1993.**



# Biologiczne funkcje zmodyfikowanych nukleozydów w transferowych RNA

## Biological functions of modified nucleosides in transfer RNAs

ZOFIA SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Rzadkie nukleozydy jako istotny element funkcjonalny transferowych RNA
  - II-1. Fosforybozyloadenozyna (Arp) lub fosforybozyloguanozyna (Grp) w pozycji 64 inicjatorowych tRNA<sup>Met</sup> grzybów i roślin
  - II-2. Lizydyna w pozycji 34 tRNA<sup>Lic</sup> *E.coli*
  - II-3. 1-metyloguanozyna (m<sup>1</sup>G<sub>37</sub>) w tRNA<sup>Asp</sup> drożdży
  - II-4. Modyfikacja adenozyny w pozycji 37 (A<sub>37</sub>) w tRNA rozpoznających kodony rozpoczynające się urydyną (UNN)
  - II-5. Modyfikacje nukleozydów w pozycji 34 tRNA czytających kodony typu Na<sub>G</sub><sup>A</sup>
  - II-6. Pseudourydyna (Ψ) w pozycjach 38,39 w tRNA<sup>His</sup> *S.typhimurium*
- III. Podsumowanie
- IV. Piśmiennictwo

### Contents:

- I. Introduction
- II. Rare nucleosides as the important functional element of transfer RNAs
  - II-1. Phosphoribosyladenosine (Arp) or phosphoribosylguanosine (Grp) at position 64 in initiator tRNAs<sup>Met</sup> of fungi and plants
  - II-2. Lisidine at position 34 in tRNA<sup>Lic</sup> of *E.coli*
  - II-3. 1-methylguanosine (m<sup>1</sup>G<sub>37</sub>) in tRNA<sup>Asp</sup> of yeast
  - II-4. Adenosine modification at position 37 (A<sub>37</sub>) in tRNAs recognizing codons beginning with uridine (UNN)
  - II-5. Nucleosides modifications at position 34 in tRNAs reading codons Na<sub>G</sub><sup>A</sup>
  - II-6. Pseudouridine (Ψ) at positions 38 and 39 of *S.typhimurium* tRNA<sup>His</sup>
- III. Concluding remarks
- IV. References

**Wykaz stosowanych skrótów:** m<sup>1</sup>A—1-metyloadenozyna; m<sup>2</sup>-A—2-metyloadenozyna; m<sup>6</sup>A—N6-metyloadenozyna; i<sup>6</sup>A—N6-izopentenyloadenozyna; ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A—2-metylotio-N6-izopentenyloadenozyna; ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A—2-metylotio-N6-hydroksyizopentenyloadenozyna; t<sup>6</sup>A—N-((9-β-D-rybofuranozylopuryna-6-YL)-karbamoilo)treonina; mt<sup>6</sup>A—N-((9-β-D-rybofuranozylopuryna-6-YL)N-metylokarbamoilo)treonina; s<sup>2</sup>C—2-tiocytydyna; C<sub>m</sub>—2'-O-metylocytydyna; ac<sup>4</sup>C—N4-acetylocytydyna; m<sup>3</sup>C—3-metylocytydyna; m<sup>5</sup>C—5-metylocytydyna; m<sup>1</sup>G—1-metyloguanozyna; m<sup>2</sup>G—N2-metyloguanozyna; G<sub>m</sub>—2'-0-metyloguanozyna; m<sup>2</sup>G—N2,N2-dimetyloguanozyna; m<sup>7</sup>G—7-metyloguanozyna; I—inozyna, m<sup>1</sup>I—1-metyloinozyna, Q—kuoizyna—7-[4,5-cis, dihydroksy-1-cyklopenteno-3-aminometylo]-7-deazaguanozyna; manQ—β-D-mannozylokuoizyna, Grp—0-β-rybozylo-(1''-2')guanozyno-5'' fosforan; I<sup>4</sup>—-Arp—0-β-rybozylo-(1''-2')adenozyno-5'' fosforan; YW—wybutozyna; O<sup>2</sup>YW—wybutoksyozyna; T—m<sup>5</sup>U—5-metylourydyna—rybotymidyna; Tm—2'-O-metylourydyna; s<sup>2</sup>T—5-metylo-2-tiourydyna; s<sup>2</sup>U—2-tiourydyna; s<sup>4</sup>U—4-tiourydyna; Um—2'-0-metylourydyna; cm<sup>5</sup>U—5-karbamoilometylourydyna; mcm<sup>5</sup>U—5-metoksykarbamoilo-metylourydyna; mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U—5-metoksykarbamoilometylo-2-tiourydyna; mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U—5-metyloaminometylo-2-tiourydyna; cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U—5-karboksymetyloaminometylo-2-tiourydyna; cmnm<sup>5</sup>U—karboksymetyloaminometylourydyna; mnm<sup>5</sup>Se<sup>2</sup>U—5-metyloaminometylo-2-selenourydyna; o<sup>5</sup>U—kwas(urydino5)oksyoctowy; mo<sup>5</sup>U—5-metoksyurydyna; X—acp<sup>3</sup>U—3(3-amino-3-karboksypropylo)urydyna; D—dihydrourydyna; Ψ—pseudourydyna; m<sup>1</sup>Ψ—1-metylopseudourydyna.

### I. Wstęp

Jedną z najbardziej charakterystycznych cech transferowych RNA (tRNA) jest obecność w nich znacznej liczby (ponad 50 rodzajów) zmodyfikowanych nukleozydów [1]. Niektóre modyfikacje są bardzo proste, takie jak metylacja, redukcja, tiolacja, inne znowu

\* dr hab., Zakład Biochemii Biopolimerów, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, Fredry 10, 61-701 Poznań

powstają w wyniku skomplikowanych reakcji biochemicznych prowadzących do hiperzmodyfikowanych nukleozydów (np. kuiny — ang. *queuine*, wybutozyny — ang. *wybutosine*, izopentyloadenozyny). Wszystkie modyfikacje nukleozydów w transferowych RNA zachodzą posttranskrypcyjnie w czasie dojrzewania cząsteczki pre-tRNA. Kolejność „wprowadzania” poszczególnych zmodyfikowanych nukleozydów zależy od struktury cząsteczki pre-tRNA w określonym etapie dojrzewania (np. obecność intronu) jak i od przestrzennego rozmieszczenia w komórce enzymów modyfikujących. U *Eukaryota* większość enzymów modyfikujących tRNA występuje w jądrze, ale niektóre — modyfikujące głównie nukleozydy w pętli antykodonowej — obecne są w cytoplazmie [2].

Eukariotyczne transferowe RNA są na ogół znacznie silniej zmodyfikowane tak pod względem zakresu, jak i liczby rzadkich nukleozydów występujących w cząsteczce, niż tRNA prokariotyczne. Na przykład transferowy RNA<sub>1<sup>Ser</sup></sub> z *Escherichia coli* zawiera dziewięć zmodyfikowanych nukleozydów, podczas gdy jego odpowiednik u *Eukaryota*, tRNA<sub>1<sup>Ser</sup></sub> (izolowany z wątroby szczura) ma ich 14 [3].

Niektóre rodzaje zmodyfikowanych nukleozydów tRNA występują w organizmach wszystkich trzech królestw: *Archaeobacteria*, *Eubacteria* i *Eukaryota* (np.  $\Psi_{13}$ , Cm<sub>32</sub>, m<sup>1</sup>G<sub>37</sub>, t<sup>6</sup>A<sub>37</sub>,  $\Psi_{38}$ ,  $\Psi_{39}$ ,  $\Psi_{40}$ ,  $\Psi_{55}$ , m<sup>1</sup>A<sub>48</sub>) [3]. Może świadczyć to, że powstały one w zamierchłej przeszłości u wspólnego przodka organizmów wszystkich trzech królestw. Nie można jednak wykluczyć — chociaż jest to mało prawdopodobne — że te rzadkie nukleozydy powstały niezależnie i obecnie obserwowane podobieństwa są wynikiem konwergencji. Inne zmodyfikowane nukleozydy występują wyłącznie w organizmach reprezentujących poszczególne królestwa: np. mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U (5-metyloaminometylo-2-tiourydyna) w pozycji 34 tRNA, występuje tylko u *Eubacteria*, a cm<sup>5</sup>U (5-karboksymetylourydyna) tylko u *Eukaryota* [3]. Dla *Archaeobacteria* charakterystyczna jest obecność m<sup>1</sup> $\Psi$  (1-metylopseudourydyna) w pozycji 54 transferowych RNA, podczas gdy u pozostałych organizmów w tej pozycji występuje m<sup>5</sup>U (rybotymidyna) [3]. Rycina 1 przedstawia drugorzędową strukturę tRNA, w której naniesiono spotykane w poszczególnych jego pozycjach rzadkie nukleozydy. Niniejszy artykuł będzie poświęcony omówieniu roli niektórych zmodyfikowanych nukleozydów w precyzyjnej regulacji procesów życiowych komórki.

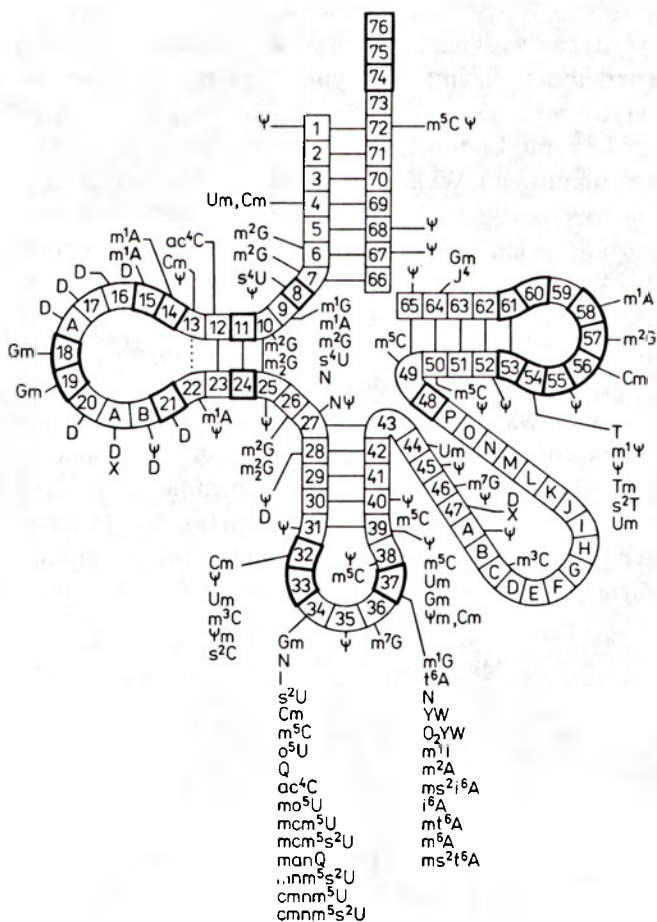
## II. Rzadkie nukleozydy jako istotny element funkcjonalny transferowych RNA

### II-1. Fosforybozyloadenozyna (Arp) lub fosforybozyloguanozyna (Grp) w pozycji 64 inicjatorowych tRNA<sup>Met</sup> grzybów i roślin

Pomimo, że w przypadku większości aminokwasów kod genetyczny jest zdegenerowany, metioninę koduje

tylko kodon AUG. Aby translacja w cytoplazmie została prawidłowo zainicjowana tripletem AUG rozpoczynającym syntezę peptydu, aparat translacyjny komórki musi być zdolny do odróżnienia inicjującego kodonu AUG od kodonów metioninowych znajdujących się wewnątrz mRNA.

W komórkach pro- i eukariotycznych obecne są dwa różne metioninowe tRNA — jeden zwany inicjatorowym — tRNA<sub>i<sup>Met</sup></sub> (lub u *Prokaryota* tRNA<sub>i<sup>Met</sup></sub>), który współdziała w inicjacji translacji i drugi — zwany elongacyjnym tRNA<sub>m<sup>Met</sup></sub>, który współdziała w wydłużaniu rosnącego łańcucha peptydowego. Intensywne badania struktury tRNA<sub>i<sup>Met</sup></sub> i tRNA<sub>m<sup>Met</sup></sub> wykazały między innymi obecność hiperzmodyfikowanego nukleozydu w pozycji 64 tRNA<sub>i<sup>Met</sup></sub> grzybów i roślin. W trzeciorzędowej strukturze cząsteczki tRNA, para zasad 50-64 ramienia rybotymidynowego znajduje się w rejonie rozpoznawanym przez kilka enzymów oddziałujących z tRNA (syntetaza aminoacylo-tRNA alaninowa-Ala RS z *E. coli* [4], RNaza P [5], bakteryjny czynnik elongacyjny Tu [6]). Wykazano, że wspomniany hiperzmodyfikowany nukleozyd to fosforybozylowana w pozycji 2'OH adenozyna lub guanozyna



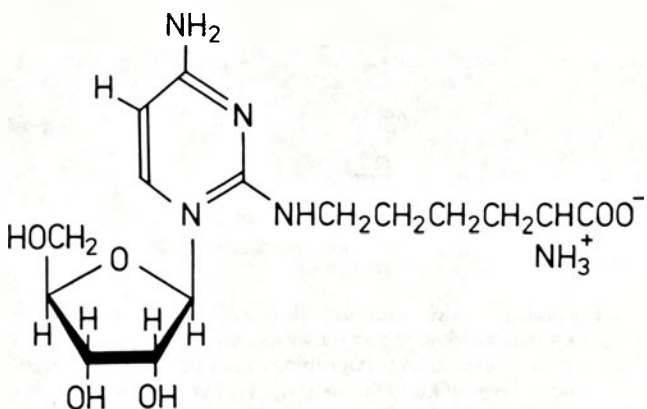
Ryc. 1. Ogólny model struktury drugorzędowej transferowych kwasów rybonukleinowych z zaznaczeniem pozycji ulegających modyfikacjom. Pogrubionymi kwadratami zaznaczono pozycje, w których występują konserwatywne lub semi-konserwatywne nukleotydy. W pozycjach 17, 20 i 47 może znajdować się zmienna liczba nukleotydów w zależności od rodzaju tRNA. Objaśnienia skrótów poszczególnych rzadkich nukleozydów znajdują się w wykazie skrótów.



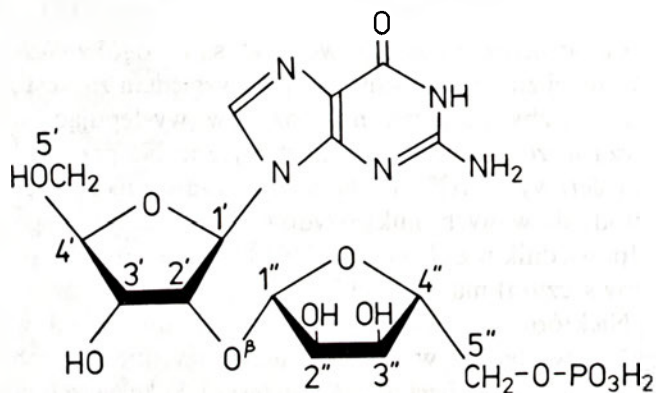
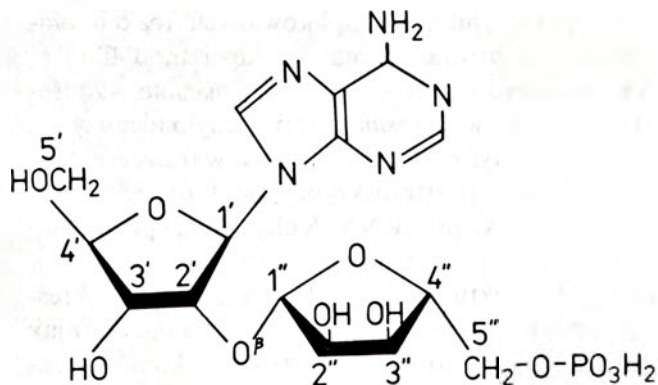
[8], w skrócie oznaczana odpowiednio Arp lub Grp (Wzory I, II) [7]. Transferowy RNA<sub>1</sub><sup>Met</sup> z *Saccharomyces cerevisiae* i zarodków pszenicy, któremu „usunięto” ten rzadki nukleozyd (poprzez utlenienie nadjodanem — tRNA<sub>ox</sub><sup>Met</sup>) odczytuje zarówno wewnętrzne kodony metioninowe jak i kodony inicjujące [9]. Mało tego, niezmodyfikowany w pozycji 64 tRNA<sub>ox</sub><sup>Met</sup> łączy się z czynnikiem elongacyjnym EFTu. GTP z *E. coli* (czynnik ten jest funkcjonalnym analogiem eukariotycznego czynnika EF-1 α.GTP). Podobnego oddziaływania nie zaobserwowano nigdy w przypadku tRNA<sub>1</sub><sup>Met</sup> z Arp lub Grp w pozycji 64. Wydaje się więc, że ta hydrofilowa modyfikacja inicjatorowego tRNA<sub>1</sub><sup>Met</sup> uniemożliwia jego wiązanie z czynnikiem elongacyjnym EF-1α.GTP, tym samym wykluczając go z procesu elongacji i czyniąc cząsteczką, która rozpoznaje tylko kodony AUG inicjujące translację [9]. U zwierząt w pozycji 64 tRNA<sub>1</sub><sup>Met</sup> występuje zawsze pirymidyna, co jak się wydaje wystarcza by wykluczyć tRNA<sub>1</sub><sup>Met</sup> z procesu elongacji [1, 9].

## II-2. Lizydyna w pozycji 34 tRNA<sub>2</sub><sup>Ile</sup> z *E. coli*

W pozycji 34 (pierwsza pozycja antykodonu) transferowego RNA<sub>2</sub><sup>Ile</sup> z *E. coli* występuje zmodyfikowana cytydyna-lizydyna. Nukleozyd ten powstaje w wyniku kondensacji lizyny z pirymidynowym pierścieniem cytydyny (Wzór III) [10]. Wyizolowany gen tRNA<sub>2</sub><sup>Ile</sup> zawiera antykodon CAT — tak samo jak gen tRNA metioninowego. Wykazano jednak, że dojrzały tRNA<sub>2</sub><sup>Ile</sup> nie rozpoznaje kodonów metioniny, natomiast rozpoznaje jeden z trzech kodonów izoleucyny: kodon AUA. Opierając się na tych wynikach można było przypuszczać, że prosta modyfikacja posttranskrypcyjna tRNA<sub>2</sub><sup>Ile</sup> eliminuje możliwość błędnych podstawień w łańcuchu peptydowym izoleucyny w miejscach zarezerwowanych dla metioniny (kodon AUG)\* oraz że niezmodyfikowany tRNA<sub>2</sub><sup>Ile</sup> będzie w rosnącym łańcuchu peptydowym włączał błędnie izoleucynę w pozycjach przeznaczonych dla metioniny. Muramatsu i w.s.p. poddali badaniom proces aminocylacji sztucznie skonstruowanego tRNA<sub>2</sub><sup>Ile</sup> nie zawierającego lizydyny [11]. Okazało się, że był on aminoacylowany izoleucyną z wydajnością ponad 10 razy niższą niż tRNA<sub>2</sub><sup>Ile</sup> zawierający lizydynę, co jak się wydaje eliminuje błędne włączenie izoleucyny w miejsca metioniny. Okazało się też, że tRNA<sub>2</sub><sup>Ile</sup> nie zawierający lizydyny był aminoacylowany metioniną z wydajnością stanowiącą ponad 30% aminocylacji tRNA<sub>m</sub><sup>Met</sup> metioniną. W związku z tym można przypuszczać, że tRNA<sub>2</sub><sup>Ile</sup> z antykodonom CAU będzie najprawdopodobniej w trakcie translacji włączać metioninę w pozycjach dla niej zaprogramowanych. Doświadczenia te rzucają światło na sprawę tzw „determinant tRNA”, elementów rozpoznawanych przez poszczególne syntetazy aminoacylo-tRNA. Wiadomo, że dla aminoacylosyntetazy metioninowej (Met RS) z *E. coli* krytyczne są nukleotydy antykodonu CAU, a zwłaszcza nukleotydy w pozycji 34 [12, 13], w której u tRNA<sub>m</sub><sup>Met</sup> *E. coli* występuje cytydyna lub N4-acetylocytydyna (ac<sup>4</sup>C) [1]. Nukleotyd ten jest tzw. pozytywną determinantą dla Met RS.



Wzór III Wzór chemiczny lizydyny — zmodyfikowanego nukleozydu w pozycji 34 jednego z izoakceptorowych tRNA<sub>2</sub><sup>Ile</sup> (tRNA<sub>2</sub><sup>Ile</sup>) *E. coli*.



Wzór I i II Wzory chemiczne O-β-rybozyl(1'-2')-adenosyno-5'-fosforanu (Arp) i O-β-rybozyl(1'-2')-guanosyno-5'-fosforanu (Grp) — zmodyfikowanych nukleozydów występujących w pozycji 64 tRNA<sub>1</sub><sup>Met</sup> grzybów i roślin.

Wzór I i II Wzory chemiczne O-β-rybozyl(1'-2')-adenosyno-5'-fosforanu (Arp) i O-β-rybozyl(1'-2')-guanosyno-5'-fosforanu (Grp) — zmodyfikowanych nukleozydów występujących w pozycji 64 tRNA<sub>1</sub><sup>Met</sup> grzybów i roślin.

Transferowy tRNA<sub>2</sub><sup>Ile</sup> nie zawierający lizydyny ma identyczny antykodon jak tRNA<sub>m</sub><sup>Met</sup>, a poza tym wyka-

\* W mitochondriach niektórych organizmów (np. ssaków i drożdży piekarskich) kodon AUA koduje metioninę. W organizmach tych brak równoległe tRNA<sub>2</sub><sup>Ile</sup> zawierającego lizydynę [11].



zuje 70% homologii (włączając w to zmodyfikowane nukleozydy) z tRNA<sup>Met</sup>. Jasne jest więc, że tRNA<sub>2</sub><sup>le</sup> bez lizydyny jest aminoacylowany przez Met RS. „Dziki” typ tRNA<sub>2</sub><sup>le</sup> (zawierający lizydynę) nie jest aminoacylowany przez Met RS, a więc ta prosta modyfikacja eliminuje błąd mogący powstać w wyniku fałszywej aminoacylacji tRNA<sub>2</sub><sup>le</sup> przez Met RS. A zatem jeden zmodyfikowany nukleozyd w tRNA zmienia specyficzność rozpoznawania kodonu przez tRNA, jak i specyficzność rozpoznawania tRNA przez odpowiednią syntetazę aminoacylo-tRNA [11].

### II-3. 1-metyloguanozyna w pozycji 37 (m<sup>1</sup>G<sub>37</sub>) w tRNA<sup>Asp</sup> drożdży

Nukleotydy (lub pary nukleotydów) tRNA, które odpowiadają za rozpoznawanie tego ostatniego przez specyficzną syntetazę aminoacylo-tRNA (ARS), nazywano „determinantami”. Niedawne badania drożdżowego tRNA<sup>Asp</sup> wykazały, że również zmodyfikowane nukleozydy mogą pełnić krytyczną rolę w prawidłowym rozpoznawaniu tRNA:ARS. W tRNA<sup>Asp</sup> z drożdży występuje osiem zmodyfikowanych posttranskrypcyjnie nukleozydów, w tym dwa zawierające alkilowane zasady: 1-metyloguanozyna (m<sup>1</sup>G<sub>37</sub>) i 5-metylocytydina (m<sup>5</sup>C<sub>49</sub>) [1]. Pierwotny transkrypt tRNA<sup>Asp</sup> (powstający w układzie *in vitro* zawierającym polimerazę RNA faga T7), nie posiadający żadnych zmodyfikowanych nukleozydów, jest aminoacylowany przez syntetazę asparaginianową aminoacylo-tRNA (Asp RS) z tą samą wydajnością co „dziki” typ tRNA<sup>Asp</sup>, zawierający wszystkie rzadkie nukleozydy. Transkrypt tRNA<sup>Asp</sup> pozbawiony zmodyfikowanych nukleozydów ulega także „arginylacji” w reakcji z syntetazą argininową aminoacylo-tRNA (Arg RS) [15]. Zmodyfikowany tRNA<sup>Asp</sup> nie jest dobrym substratem dla Arg RS. Porównanie niezmodyfikowanego „tRNA<sup>Asp</sup>” i zmodyfikowanego tRNA<sup>Asp</sup> pod względem specyficzności w stosunku do Arg RS wskazuje, że specyficzność tego pierwszego jest 300-500 razy wyższa. Jaki element struktury tRNA<sup>Asp</sup> zapewnia tak wysokie powinowactwo do Asp RS eliminując możliwość błędnej aminoacylacji przez Arg RS? Można go nazwać „antydeteminantą”, gdyż nie odgrywa on roli w rozpoznawaniu tRNA<sup>Asp</sup> przez specyficzną Asp RS, a jedynie uniemożliwia fałszywą aminoacylację w reakcji z Arg RS. Z doświadczeń wynika, że są nim zmodyfikowane nukleozydy tRNA<sup>Asp</sup>, które chronią tę cząsteczkę przed błędną aminoacylacją [14]. Dane z laboratorium R. G i e g e sugerują pośrednio, że rolę antydeteminanty w reakcji arginylacji prowadzonej przez Arg RS pełni 1-metyloguanozyna w pozycji 37 dojrzałego tRNA<sup>Asp</sup> [15].

Niedawno opublikowana została praca, w której wykazano, że aminoacylacja tRNA ani translacja nie są zależne od modyfikacji cząsteczki tRNA [16]. Praca ta dotyczy szczególnego przypadku — tRNA<sup>Gly</sup> z *Mycoplasma mycoides*. Należy tu zaznaczyć, że tRNA

z tego organizmu charakteryzują się szczególnie małą zawartością zmodyfikowanych nukleozydów [1].

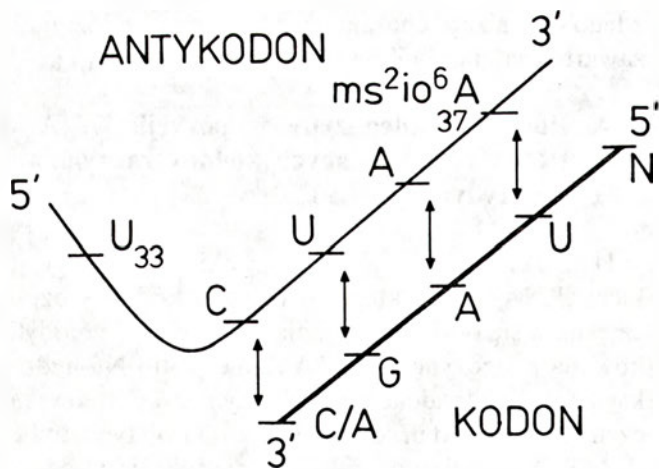
### II-4. Pochodne adenozyne w pozycji 37 (A<sub>37</sub>) tRNA rozpoznających kodony zaczynające się urydyną (UNN).

U *Salmonella typhimurium* wszystkie tRNA (z wyjątkiem tRNA<sub>i</sub><sup>Ser</sup>) [1], które rozpoznają kodony rozpoczynające się od urydyny mają w pozycji 37 zmodyfikowaną adenozyne: ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A (2-metylotio-N6-hydroksyizopentenyloadenozyne). Jednym z kodonów zaczynającym się od urydyny jest kodon stop typu amber (UAG). Każdy kodon mRNA znajduje się w określonym otoczeniu (ang. *codon-context*) nukleotydów. Wiadomo, że w supresjach typu nonsense, zmiana sensu i przesunięcie ramki odczytu, otoczenie kodonu wpływa na wydajność supresji. Szczególnie istotny jest nukleotyd znajdujący się po 3’ stronie kodonu ulegającego supresji [17]. Wpływ nukleozydu ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A na „wrażliwość” supresorowych tRNA na sąsiedztwo kodonów ulegających supresji wykazano w pracowni G. B j o r k a [18]. I tak podczas gdy w komórkach *S. typhimurium* mia A<sup>+</sup> supresorowe tRNA<sup>Tyr</sup> i tRNA<sup>Ser</sup> były całkowicie zmodyfikowane w pozycji 37 (ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A), w komórkach mia A<sup>-</sup> zawierały w tej pozycji niezmodyfikowaną adenozyne. W obu typach komórek wydajność translacji w obecności supresorowych tRNA wzrastała, gdy po 3’ stronie kodonu znajdowała się adenozyne zamiast cytozyny. Jednak, podczas gdy w szczepie mia A<sup>-</sup> (A<sub>37</sub>, niezmodyfikowana) wydajność rozpoznawania kodonu amber po zmianie C→A była sześciokrotnie wyższa, to w szczepie mia A<sup>+</sup> — tylko półtorakrotnie. Można więc sądzić, że tRNA nie zawierające ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A są znacznie bardziej wrażliwe na wpływ nukleotydów sąsiadujących z 3’ strony kodonu ulegającego supresji niż tRNA mające w pozycji 37 ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A. Wyjaśniają to wyniki uzyskane wcześniej przez H. G r o s j e a n’ a [19], który wykazał, że puryna w pozycji 37 tRNA oddziałuje z pierwszym nukleotydem kodonu, zaś pierwsza zasada antykodonu z nukleotydem po 3’ stronie kodonu (Ryc. 2). Tak więc kodon UAG-A zapewnia znacznie większą stabilność oddziaływań z antykodonom CUA-A niż kodon UAG-C. Kompleks kodon-antykodon jest najmniej trwały, gdy w pozycji 37 tRNA występuje niezmodyfikowana adenina, a po stronie 3’ kodonu — cytozyna. Przy braku modyfikacji w pozycji 37, tylko oddziały-

<sub>5</sub>NUAGA<sub>3</sub> (kodon)

<sub>3</sub>AAUC<sub>5</sub> (antykodon)

umożliwia uzyskanie większej stabilności kompleksu kodon-antykodon. Obecność rzadkiego nukleozydu ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A podwyższa stabilność kompleksu niezależnie od sąsiedztwa po stronie 3’ kodonu, co tłumaczy niewrażliwość supresorowych tRNA zawierających ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A na otoczenie kodonu. Może to mieć duży



Ryc. 2. Model oddziaływań kodon-antykodon kodonu amber (UAG) z antykodonom supresorowego tRNA, uwzględniający zaangażowanie nukleotydów po 3' stronie kodonu ((C/A)3'). W modelu tym C<sub>34</sub> oddziałuje z nukleotydem po 3' stronie kodonu (zaznaczono na rysunku strzałką), U<sub>35</sub> i A<sub>36</sub> oddziałują odpowiednio z G i A kodonu, a ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A z pierwszym nukleotydem kodonu (U) [18].

wpływ na sprawność odczytywania kodonów rozpoczynających się urydyną przez tRNA posiadające w pozycji 37 zmodyfikowaną adenozyne (ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A). W pracowni G. Bjorka, gdzie wyizolowano szereg szczepów z defektami w poszczególnych stadiach powstania tego rzadkiego nukleozydu: A<sub>37</sub> → i<sup>6</sup>A<sub>37</sub> → ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A<sub>37</sub> → ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A<sub>37</sub> wykazano, że obecność niezmodyfikowanej adenozyne w pozycji 37 lub obecność tylko izopentenyloowanej adenozyne (i<sup>6</sup>A) powoduje obniżenie wydajności translacji odpowiednio dziesięcio- i dwukrotnie w porównaniu z wydajnością translacji w szczepie dzikim [20].

Innym przykładem modyfikacji w pozycji 37 tRNA jest 1-metyloguanozyna (m<sup>1</sup>G). Nukleozyd ten występuje u *Salmonella typhimurium* w tRNA, które „czytają” kodony typu C(U/C/G)N (gdzie N = A, C, G, U) [1]. Wykazano, że brak tej metylacji powoduje obniżenie tempa wzrostu komórek, jak również indukuje zdolność supresji mutacji typu „przesunięcie ramki odczytu”. Zmiana kodonu CCN na „CCCN” jest „czytana” przez tRNA<sup>Pro</sup> jako kodon włączający prolinę, wówczas gdy brak w tym tRNA metylacji w pozycji G<sub>37</sub>. Tym samym 1-metyloguanozyna w pozycji 37 tRNA<sup>Pro</sup> wydaje się chronić komórkę przed mutacjami typu przesunięcie ramki odczytu w przypadku, gdy w mRNA pojawi się ciąg nukleotydów cytydynowych. Autorzy tłumaczą to zjawisko zakładając, że niezmodyfikowana guanozyna w pozycji 37 (pierwsza pozycja za antykodonom) tworzy wiązanie typu Watson-Crick z pierwszą zasadą kodonu(C), umożliwiając tym samym prolinowemu tRNA odczytanie kodonu czterozasadowego [21]. Ponieważ m<sup>1</sup>G w pozycji 37 występuje w tRNA czytających kodony typu C(U/C/G)N u *Eubacteria*, *Eukaryota* i *Archaeobacteria* wydaje się, że rola tego nukleozydu jest we wszystkich trzech królestwach taka sama.

## II-5. Zmodyfikowane nukleozydy w pozycji 34 tRNA „czytających” kodony typu NA<sub>G</sub><sup>A</sup>.

W eubakteryjnych i eukariotycznych tRNA dla lizyny, kwasu glutaminowego i glutaminy w pozycji 34 znajduje się zmodyfikowana urydyna. Jest to 2-tiourydyna (s<sup>2</sup>U), która może zawierać dodatkowo kilka różnych podstawników np.: 5-metyloaminometylo-2-tiourydyna (mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U), 5-karboksymetyloaminometylo-2-tiourydyna (cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U) lub 5-metoksykarbonylometylo-2-tiourydyna (mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U). W pozycji 34 tRNA<sup>Gln</sup> można również znaleźć 2'-0-metylourydynę (U<sub>m</sub>) [1]. Wymienione tRNA „czytają” kodony typu NA<sub>G</sub><sup>A</sup>, gdzie N = A, C, G, U. W pracowni G. Bjorka wyizolowano mutanty *E. coli* niezdolne do syntezy mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U [22] i zbadano wpływ braku tego rzadkiego nukleozydu na wydajność translacji. Użyto w tym celu supresorowego tRNA<sup>Liz</sup><sub>UAA</sub> (zdolnego do czytania nonsensownych kodonów ochre-UAA i amber UAG) i połączonych genów lacI-lacZ z wprowadzonymi w obrębie lacI kilkoma kodonami ochre i amber. W przypadku kodonów amber (UAG), niezmodyfikowany tRNA<sup>Liz</sup><sub>UAA</sub> zachowywał się jak supresor z wydajnością stanowiącą 30-70% wydajności supresorowej tRNA<sup>Liz</sup><sub>UAA</sub> zawierającego zmodyfikowany nukleozyd. Wynika stąd, że tRNA<sup>Liz</sup><sub>UAA</sub> nie tylko działa słabo jako supresor kodonów amber, gdy pozbawiony jest mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U, lecz jest również wrażliwy na „sąsiedztwo” kodonu ulegającego supresji (różnice procentowe w spadku wydajności translacji). Supresja kodonów ochre była również obniżona, ale nie tak, jak w przypadku kodonów amber. Również i tu obserwowano wrażliwość supresorowego, niezmodyfikowanego tRNA „na sąsiedztwo” kodonu ulegającego supresji [22]. W opisanym przypadku brak zmodyfikowanego nukleozydu w pozycji 34 tRNA miał podobne konsekwencje jak brak ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A w pozycji 37 tRNA — to jest uwrażliwienie tRNA na otoczenie kodonów „czytanych” przez te RNA oraz redukcję wydajności translacji. Defekty te mogą zatem zakłócić całość procesów życiowych zachodzących w komórce.

W transferowych RNA<sup>Glu</sup> i tRNA<sup>Liz</sup> niektórych mikroorganizmów (jak i komórek rakowych) stwierdzono w pozycji 34 tRNA obecność 5-metyloaminometylo-2-selenourydyny (mnm<sup>5</sup>Se<sup>2</sup>U) [23-25]. Forma ta powstaje z analogu zmodyfikowanego nukleozydu (mnm<sup>5</sup>S<sup>2</sup>U) poprzez eliminację siarki i zastąpienie jej selenem [26]. Obecność selenu w tRNA<sup>Glu</sup>, <sup>Liz</sup> wydaje się powodować preferencyjne „czytanie” kodonów, które w trzeciej pozycji tripletu zawierają guanozynę. Z kolei „siarkowa” odmiana tej modyfikacji preferuje kodony zawierające w trzeciej pozycji tripletu adenozyne [27]. Istnieje ścisła, odwrotna korelacja pomiędzy poziomem selenowych nukleozydów w tRNA, a tolerancją mikroorganizmu na tlen. *Methanococcus vannielii* — mikroorganizm wymagający do życia warunków anaerobowych, jest szczególnie bogaty w zmodyfikowane selenem tRNA. Z kolei *E. coli*, która toleruje



zarówno warunki tlenowe jak i beztlenowe, zawiera ich znacznie mniej. Sugeruje to, że seleno-tRNA mogą pełnić szczególną rolę w syntezie białek ulegających ekspresji w warunkach beztlenowych.

Innym przykładem modyfikacji pozycji 34 jest tRNA<sup>Met</sup> *E. coli* zawierający ac<sup>4</sup>C (acetylocytydynę) [1]. Inicjatorowy tRNA<sup>Met</sup> *E. coli* zawiera w tej pozycji niezmodyfikowaną cytydynę [1]. Po chemicznym „usunięciu” modyfikacji z tRNA<sup>Met</sup> wiązał się on dwa razy lepiej do rybosomu w kompleksie z mRNA zawierającym kodony AUG, niż cząsteczka zmodyfikowana. Obecność ac<sup>4</sup>C powodowała jednak obniżenie poziomu mylnego odczytywania *in vitro* kodonów AUA izoleucyny (patrz rozdz 2). Wyniki te wskazują, że funkcją nukleozydu ac<sup>4</sup>C jest przede wszystkim redukcja mylnych podstawień w trakcie translacji [28].

U większości organizmów prokariotycznych i eukariotycznych transferowe RNA specyficzne dla kwasu asparaginowego, asparaginy, histydyny i tyrozyny mają w pozycji 34 hiperzmodyfikowany nukleozyd — kuozyne (ang. *-queuosine*) (7-[4,5-cis, dihydroksy-1-cyklopenteno-3-amino-metylo]-7-deazaguanozynę) [29,30]. Ta bardzo charakterystyczna modyfikacja zachodzi poprzez wycięcie guaniny w pozycji 34 i wprowadzenie w to samo miejsce kuiny lub jej prekursora [31]. Reakcję tę przeprowadza enzym zwany transglikozylazą tRNA-guaninową lub po prostu Q insertazą [32]. Synteza kuiny zachodzi w bakteriach, lecz nie zaobserwowano jej u *Eukaryota* [33,34]. Wykazano natomiast, że ssaki uzyskują ją z pożywienia lub z flory bakteryjnej jelit [35].

Transferowe RNA zawierające Q<sub>34</sub> czytają kodony NAU i NAC, gdzie N = A, U, G, C.

W pracowni E. K u b l i do oocytów *Xenopus laevis* wstrzyknięto tRNA<sup>Tyr</sup> zawierający antykodon QΨA, lub GΨA, oraz RNA wirusa mozaiki tytoniu. Wykazano, że tRNA<sup>Tyr</sup> bez kuiny mylnie rozpoznawał kodony stop typu amber (zachowywał się jak tRNA supresorowy), podczas gdy tRNA<sup>Tyr</sup> zawierający kuinę nie oddziaływał z tym kodonem powodując terminację translacji [36]. Stosując podobny układ E. K u b l i wykazał, że tRNA<sup>His</sup>, zawierający antykodon GUG, preferował zdecydowanie jeden z kodonów histydyny: CAC, natomiast tRNA<sup>His</sup>, zawierający antykodon QUG, wykazywał tylko niewielką preferencję w stosunku do tego kodonu, czytał natomiast wydajnie kodony CAU [37]. Kuina wydaje się więc pełnić funkcję zbliżoną do wcześniej omówionych funkcji zmodyfikowanych nukleozydów w pozycjach 34 i 37 — warunkuje precyzyjne odczytywanie kodu genetycznego.

Zmiany w poziomie modyfikacji Q zaobserwowano w różnych stadiach rozwojowych organizmów. 85% tRNA<sup>Tyr</sup> z zarodków pszenicy zawiera antykodon QΨA, a tylko 15% GΨA. Natomiast tRNA<sup>Tyr</sup> izolowany z liści pszenicy zawierał tylko hipozmodyfikowany antykodon GΨA. Stwierdzono, że także tRNA<sup>Tyr</sup> izolowany z roślin tytoniu zawiera antykodon GΨA

[38]. U zwierząt, tRNA zawierające kuinę są charakterystyczne dla dojrzałych tkanek. Retikulocyty i wątroba płodu owcy zawierają znaczne ilości tRNA z G zamiast Q w pierwszej pozycji antykodonu, podczas gdy wątroba dojrzałych zwierząt zawiera głównie tRNA z kuiną [39].

W wielu rodzajach tkanek rakowych obserwuje się całkowity brak kuiny [40]. Po podaniu kuiny do hodowli komórek rakowych chomika (CHT) (w których kuina nie występuje) obserwowano włączanie tego związku do hipozmodyfikowanych tRNA. Co najważniejsze, nadmiar kuiny hamował wzrost tych komórek [41]. Podobne wyniki uzyskano w przypadku guzów mysich [42, 43]. Autorzy tych badań sugerują, że brak kuiny może być odpowiedzialny za zmiany w ekspresji genetycznej, które prowadzą do rozwoju guzów. Przyczyny braku kuiny w badanych komórkach rakowych (jak i w nieodróżnionych młodych komórkach zwierzęcych) nie są znane. Wiadomo, że brak nukleozydu Q w odpowiednich tRNA nie jest spowodowany nieobecnością transglikozylazy tRNA guaninowej, ponieważ zawartość tego enzymu w komórkach rakowych i zdrowych jest zbliżona [40].

## II-6. Pseudourydyna (Ψ) w pozycjach 38 i 39 tRNA<sup>His</sup> *S. typhimurium*

U *Salmonella typhimurium* operon histydynowy składa się z dziesięciu genów [44]. Jego ekspresja jest regulowana przez poziom histydyny w środowisku. Region kontrolny operonu zawiera sekwencje, które po przepisaniu w mRNA, tworzą helikalną strukturę typu szpilki do włosów. Za bogatym w pary G-C ramieniem występuje ciąg dziewięciu urydyn. Struktury tego typu są sygnałami terminacji transkrypcji [44] pełniąc równocześnie rolę atenuatora operonu. Region kontrolny koduje peptyd składający się z 16-aminokwasów, w skład którego wchodzi ciąg aż siedmiu histydyn. Regulacja ekspresji operonu polega na powstawaniu alternatywnych form mRNA, które tworzą lub nie charakterystyczną strukturę atenuatora. Rodzaj powstającego mRNA zależy od odległości między rybosomem a polimerazą RNA syntetyzującą mRNN. Jeśli rybosom „podąża” w ślad za polimerazą RNA (tym samym bardzo szybko „przebiega się” przez ciąg siedmiu kodonów histydyny w mRNA), tworzy się struktura atenuatorowa powodująca przerwanie transkrypcji. Spowolnienie translacji w stosunku do transkrypcji (z powodu braku histydylo-tRNA<sup>His</sup>) powoduje powstanie alternatywnej do atenuatora struktury mRNA i umożliwia derepresję operonu histydynowego [45]. W pracowni J. R. Roth'a [45] do badań nad modelem regulacji histydynowego operonu wykorzystano mutant his T [46], który wykazywał konstytutywną ekspresję operonu i charakteryzował się brakiem pseudourydyn (Ψ) w pozycji 38 i 39 w tRNA<sup>His</sup> [47]. tRNA<sup>His</sup> nie posiadający Ψ<sub>38,39</sub> nie był w stanie, pomimo normalnej aminoacylacji, dekode-

wać z odpowiednią szybkością siedmiu tripletów histydynowych powodując tym samym stałą derepresję operonu. Wyniki te wskazują, że brak pseudourydyn w pozycjach 38 i 39 (pętla i ramię antykodonowe) wpływa negatywnie na oddziaływanie kodon-antykodon. Mechanizm osłabienia tych oddziaływań jest nieznany. Warto jednak wspomnieć, że supresorowy tRNA<sup>Gln</sup><sub>UAG</sub>, który z powodu mutacji his T nie zawiera również  $\Psi_{38}$  i  $\Psi_{39}$ , nie jest wydajnym supresorem w porównaniu z tRNA<sup>Gln</sup><sub>UAG</sub> posiadającym w pozycjach 38 i 39 pseudourydyny. Ponieważ syntaza pseudourydynowa modyfikująca pozycje 38, 39, 40 działa na różne rodzaje tRNA, wszystkie one będą prawdopodobnie hipomodyfikowane w przypadku braku aktywnego enzymu. Ogólny efekt tych hipomodyfikacji nie jest jednak drastyczny, skoro mutanty his T *S. typhimurium* wykazują w stosunku do szczepu dzikiego jedynie nieznacznie spowolniony wzrost.

### III. Podsumowanie

Przegląd funkcji zmodyfikowanych nukleozydów w procesach, w których bierze udział transferowy RNA pokazuje, jak ważną spełniają one rolę w precyzyjnym funkcjonowaniu całego aparatu syntezy białka. Nie został jednak dotąd wykryty żaden zmodyfikowany nukleozyd w tRNA, którego brak byłby dla komórki letalny lub poważnie uszkadzał jej funkcjonowanie.

U *Eukaryota* istnieje tendencja do „tracenia intronów” w genach tRNA. Im wyżej stoi organizm „na drabinie ewolucyjnej”, tym mniej posiada genów tRNA z intronami. U *Saccharomyces cerevisiae* występuje dziewięć rodzin genów tRNA z sekwencjami intronowymi, podczas gdy u człowieka stwierdzono jak dotąd, obecność tylko dwóch takich rodzin. Są to rodziny kodujące cytoplazmatyczne tRNA<sup>Tyr</sup> (antykodon G $\Psi$ A) tRNA<sup>Leu</sup> (antykodon m<sup>5</sup>CAA). U wszystkich dotąd poznanych organizmów eukariotycznych geny tych dwóch rodzin tRNA posiadają introny. Wykazano, że introny w pre-tRNA<sup>Tyr</sup> i pre-tRNA<sup>Leu</sup> są niezbędne dla powstania pewnych zmodyfikowanych nukleozydów [48, 49]. Doświadczenia przeprowadzone ze zmutowanymi tRNA<sup>Tyr</sup> i tRNA<sup>Leu</sup> (których pre-tRNA nie zawierały intronów, a tym samym odpowiednich rzadkich nukleozydów) wykazały w obu przypadkach niską wydajność odczytywania odpowiednich kodonów. Obecność intronów jest tu niezbędna dla powstania rzadkich nukleozydów, co tłumaczy nacisk selekcyjny na ich utrzymanie w genach. Oprócz roli w procesie biosyntezy białka, tRNA pełnią również inne funkcje w komórce. Biorą one udział między innymi w syntezie chlorofilu [50], inicjowaniu reakcji odwrotnej transkrypcji [51], w procesie degradacji białka [52] a także, jak wykazano ostatnio, w syntezie endotoksyn [53]. Niezwykle interesujące byłoby sprawdzenie czy i w tych procesach rzadkie nukleozydy są istotne dla funkcjonowania transferowych RNA.

Panu Profesorowi Jackowi Augustyniakowi wyrażam gorące podziękowania za wnikliwe przeczytanie tekstu i pomoc.

Pani Danucie Derze-Komin pragnę bardzo podziękować za pomoc przy redagowaniu manuskryptu.

Artykuł otrzymano 9 października 1992 r.

Zaakceptowano do druku 3 marca 1993 r.

### Piśmiennictwo

1. Sprinzl M, Dank N, Nock S, Schon A (1990) *Nucl Acids Res* **19**: 2127-2171
2. Nishikura K, De Robertis EM (1981) *J Mol Biol* **145**: 405-420
3. Bjork GR, Ericson JU, Gustafsson CED, Hagerwall TG, Jonsson YH, Wikstrom PM (1987) *Ann Rev Biochem* **56**: 263-287
4. Franklyn C, Schimmel P (1989) *Nature (Lond.)* **337**: 478-481
5. Mc Clain WH, Guerrier-Takada C, Altman S (1987) *Science* **238**: 527-530
6. Joshi R, Faulhammer HG, Chapeville P, Haenni A (1984) *Nucl Acid Res* **12**: 7467-7478
7. Desgres J, Keith G, Kuo KC, Gehrke CW (1989) *Nucl Acids Res* **18**: 4677-4682
8. Glasser AL, Desgres J, Heitzler J, Gehrke CW, Keith G (1991) *Nucl Acids Res* **19**: 5199-5203
9. Kieswetter S, Otto G, Sprinzl M (1990) *Nucl Acids Res* **18**: 4677-4682
10. Muramatsu T, Yokoyama S, Horie N, Matsuda A, Ueda T, Yanaizumi Z, Kuchino Y, Nishimura S, Miyazawa T (1988) *J Biol Chem* **263**: 9261-9267
11. Muramatsu T, Nishikawa K, Nemoto F, Kuchino Y, Nishimura S, Miyazawa T, Yokoyama S (1988) *Nature (Lond.)* **336**: 179-181
12. Schulman LH, Pelka H (1988) *Science* **242**: 765-768
13. Ghos G, Pelka H, Schulman LH (1990) *Biochemistry* **29**: 2220-2225
14. Peret V, Garcia A, Grosjean H, Ebel JP, Giege R (1990) *Nature (Lond.)* **344**: 787-789
15. Giege R, Garcia A, Perret V, Puglisi J, Putz J, Rudinger J, Theobald A, Ebel JP, Florentz C (1991) w: 14th International tRNA Workshop. Rydzyna, Poland, str. 59
16. Samuelson T, Baren T, Johansen TJ, Lustig F (1988) *J Biol Chem* **263**: 13692-13699
17. Smith D WE, Hatfield DL (1986) *J Mol Biol* **189**: 663-671
18. Ericson JU, Bjork GR (1991) *J Mol Biol* **218**: 509-516
19. Grosjean H, Chantrenne H (1980) *Mol Biol Biochem Biophys* **32**: 347-367
20. Bjork GR, Esberg B, Hagerwall T, Ji-nong L, Atkins J (1991) w: 14th International tRNA Workshop. Rydzyna, Poland, str. 24
21. Bjork GR, Wikstrom PM, Bystrom AS (1989) *Science* **244**: 986-989.
22. Hagerwall TG, Bjork GR (1984) *Mol Gen Genet* **196**: 194-200.
23. Ching WM, Stadtman TC (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 374-377
24. Wittwer AJ (1983) *J Biol Chem* **258**: 8637-8641
25. Ching WM (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 3010-30139.
26. Wittwer AJ, Stadtman TC (1986) *Arch Biochem Biophys* **248**: 540-550
27. Ching WM, Tsai L, Wittwer AJ (1985) *Curr Top Cell Regul* **27**: 497-507
28. Stern L, Schulman LH (1978) *J Biol Chem* **253**: 6132-6139
29. Kasai H, Nakanishi K, Mac Farlane RD, Torngensen DF, Ohashi Z, Mc Closkey JA, Gross HJ, Nishimura S (1976) *J Amer Chem Soc* **98**: 5044-5046



30. Kasai H, Ohashi Z, Harada F, Nishimura S, Oppenheimer NJ, Crain PF, Leih JG, von Minden DL, McCloskey JA (1975) *Biochem* **14**: 4198-4206
31. Okada N, Noguchi S, Kasai H, Shindo-Okada N, Ohgi T, Goto T, Nishimura S (1979) *J Biol Chem* **254**: 3067-3073
32. Katze JR, Gunduz U, Smith DL, Cheng CS, McCloskey JA. (1984) *Biochemistry* **23**: 1171-1176
33. Kasai H, Kuchino Y, Nihei K, Nishimura S (1975) *Nucl Acids Res* **2**: 1931-1938
34. Katze JR, Mosteller RD (1976) *J Bacteriol* **125**: 205-210
35. Farkas WR (1980) *J Biol Chem* **255**: 6832-6835
36. Bienz M, Kubli E (1981) *Nature (Lond)* **294**: 188-190
37. Meier F, Suter B, Grosjean H, Keith G, Kubli E (1985) *EMBO J* **4**: 823-827
38. Beier H, Barciszewska M, Sickinger HD (1984) *EMBO J* **3**: 1091-1096
39. Landin RM, Beisnard M, Petrissant G (1979) *Nucl Acids Res* **7**: 1635-1648
40. Nishimura S (1983) *Progr in Nucl Acids Res and Mol Biol* **28**: 49-73
41. Muralidhar G, Ochieng J, Trewyn RW (1989) *Cancer Research* **49**: 7110-7114
42. Katze JR, Beck WT (1980) *Biochem Biophys Res Com* **96**: 313-319
43. Elliot MS, Katze JR, Trewyn RW (1984) *Cancer Res* **44**: 3215-3219
44. Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Luc. 218-220
45. Johnston WM, Barnes FG, Chumley L, Bossi, Roth JR (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 508-512
46. Lewis JA, Ames BN (1972) *J Mol Biol* **66**: 131-142
47. Singer CE, Smith GR, Cortese R, Ames BN (1972) *Nature (Lond)* **238**: 72-74
48. Johnston PF, Abelson J (1983) *Nature (Lond)* **303**: 681-687
49. Strobel MC, Abelson J (1986) *Mol Cell Biol* **6**: 2663-2673
50. Schon A, Krupp G, Gough S, Berry-Lowe S, Gamini-Kannangara C, Soll D, (1986) *Nature (Lond)* **322**: 281-284
51. Temin HM (1986) *Cell Biophys* **9**: 9-16
52. Farber S, Ciechanover A (1986) *J Biol Chem* **261**: 3128-3134
53. Gamian A, Krzyżaniak A, Barciszewska M, Gawrońska I, Barciszewski J (1991) *Nucl Acids Res* **19**: 6021-6025

## Utlenianie puryn — źródło mutacji spontanicznych

## Oxydation of purines — the origin of spontaneous mutations

BARBARA TUDEK\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Oksydacyjne modyfikacje puryn
  - II-1. Utlenianie wolnych nukleozydów
  - II-2. Utlenianie puryn w wyizolowanym DNA
  - II-3. Utlenianie puryn w DNA komórkowym
- III. Kodujące właściwości utlenionych puryn
  - III-1. 8-oxo-7,8-dihydroguanina
  - III-2. 8-oxo-7,8-dihydroadenina
  - III-3. Fapy-7-metyloguanina
- IV. Naprawa DNA zawierającego utlenione formy puryn
  - IV-1. Białko MutT
  - IV-2. Białko FPG(= MutM)
  - IV-3. Białko MutY
- V. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Oxidative modifications of purines
  - II-1. Oxidation of free nucleosides
  - II-2. Oxidation of purines in isolated DNA
  - II-3. Oxidation of purines in cell DNA
- III. Coding properties of oxidized purines
  - III-1. 8-oxo-7,8-dihydroguanine
  - III-2. 8-oxo-7,8-dihydroadenine
  - III-3. Fapy-7-methylguanine
- IV. Repair of DNA containing oxidized purines
  - IV-1. MutT protein
  - IV-2. FPG(MutM) protein
  - IV-3. MutY protein
- V. Conclusions

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

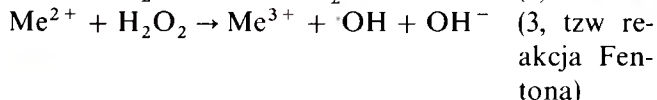
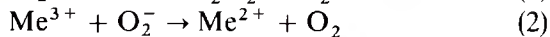
Wykaz stosowanych skrótów: 8-oxodA — 8-oxo-7,8-dihydro-2'-dezoksyadenozyna; 8-oxodG — 8-oxo-7,8-dihydro-2'-dezoksyguanozyna; Fapy-Ade — 4,6-diamino-5-formami-

dopirymidyna; Fapy-Gua — 2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyna; Fapy-7-MeG — 2,6-diamino-4-hydroksy-5N-metylo-formamidopirymidyna; N-7-MeG — N-7-metyloguanina; DMS — siarczan dwumetylu; MMS — sulfonian metanometylowy; MNNG — N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidyna; miejsca AP — miejsca apurynowe/apirymidynowe; AZT — azydotymidyna; dA — dezoksyadenozyna; dG — dezoksyguanozyna; dC — dezoksytydyna; dT — dezoksytymidyna.

## I. Wstęp

Aktywne formy tlenu są mediatorami wielu procesów fizjopatologicznych takich jak zapalenie [1], niedokrwienie [2, 3], dystrofia mięśniowa, procesy starzenia i nowotworowe [4, 5], a także niektórych chorób dziedzicznych jak mukowiscydoza [6]. Aktywacja tlenu zachodzi w wyniku oddziaływania na organizmy czynników fizycznych (promieniowanie jonizujące, ultrafioletowe), chemicznych oraz w toku przemian metabolicznych. W trakcie procesów oddechowych w mitochondriach, a także w peroksyzomach w wyniku aktywności oksydaz powstaje nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ). W mitochondriach tworzony jest również anion nadtlenkowy ( $O_2^-$ ). Powstaje on także w błonach leukocytów podczas fagocytozy [7] oraz w trakcie utleniania substancji endogennych i egzogennych przez mikrosomalny układ reduktaza NADPH-cyt P-450 i cytochrom P-450. Niektóre antybiotyki o strukturze chinonowej (adriamycyna, mitomycyna C) ulegają przemianie do bardzo reaktywnych semichinonów przez reduktazę NADPH-cyt P-450 [8].

Innym źródłem tworzenia aktywnych form tlenu są reakcje fotosensybilizacji. Zarówno składniki komórek (flawiny, porfiryny) jak i wiele barwników (akrydyny, błękit metylenowy, czerwień obojętna) oraz biologicznie czynnych leków (fenotiazyny, tetracykliny, tiazidy) są zdolne do absorpcji światła widzialnego lub ultrafioletowego ulegając wzbudzeniu. Wzbudzona cząsteczka fotosensybilizatora, bądź bezpośrednio reaguje z DNA tworząc rodniki kationów zasad lub addukty (reakcje typu I), bądź aktywuje tlen cząsteczkowy do tlenu atomowego lub anionu nadtlenkowego (reakcje typu II) [9]. Tlen atomowy jest zdolny do bezpośredniego utleniania zasad DNA. Anion nadtlenkowy nie modyfikuje DNA, ale w obecności katalitycznej ilości metali przejściowych (np.  $Fe^{+3}$ ) daje początek tworzeniu rodników hydroksylowych ( $\cdot OH$ ) w tzw. reakcji Haber-Weissa:



Reaktywność rodników hydroksylowych jest o kilka rzędów większa niż tlenu atomowego. Aktywne formy tlenu uszkadzają kwasy nukleinowe, lipidy i białka mogą przyczyniać się do inicjacji procesów patologicznych. Niniejszy artykuł ogranicza się do omówienia

utleniania puryn, właściwości mutagennych oraz naprawy oksydacyjnych uszkodzeń puryn w komórkach *Escherichia coli*.

## II. Oksydacyjne modyfikacje puryn

Czynniki utleniające wprowadzają do DNA różnego typu uszkodzenia w różnych proporcjach w zależności od stosowanego czynnika. Ponadto produkty utleniania puryn *in vitro* są różne dla wolnych nukleozydów i zasad zawartych w DNA.

### II-1. Utlenianie wolnych nukleozydów

Pod wpływem fotosensybilizatorów i światła z 2'-dezoksyadenozyny powstają 2'-dezoksyinozyna oraz 8-oxo-7,8-dihydro-2'-dezoksyadenozyna (8-oxodA) [10,11]. Głównym produktem utleniania dA po naświetleniu promieniowaniem jonizującym jest 8-oxodA [12].

Z 2'-dezoksyguanozyny, po naświetleniu promieniowaniem jonizującym [10] oraz pod wpływem fotosensybilizatorów działających według reakcji typu I (np. ryboflawiny) i tworzących kationy rodnika guanozyny powstają 2,2-diamino-4-[(2-dezoksy-β-D-erytropentafuranozyl)-amino]-5-(2H)-oxazolony i jego prekursor 2-amino-5-[(2-dezoksy-β-D-erytropentafuranozyl)-amino]-4-imidazolony (Rys. 1) [13]. Pod wpływem promieniowania jonizującego zachodzi również hydroksylacja węgla C-8 pierścienia imidazolowego [14], jednak w przypadku wolnych nukleozydów jest to proces marginalny, zaś ilość wytworzonej 8-oxo-7,8-dihydro-2'-dezoksyguanozyny (8-oxodG) nie jest proporcjonalna do dawki promieniowania gamma, pozostając praktycznie na stałym poziomie.

### II-2. Utlenianie puryn w wyizolowanym DNA

Promieniowanie jonizujące [15], nadtlenek wodoru [16], odczynniki Fentona [17] oraz kompleks jonu miedziowego z 1,10-fenantroliną [18] powodują w DNA *in vitro* (Rys. 1): (i) hydroksylację zasad w pozycji C8, co prowadzi do tworzenia 8-oxodA i 8-oxodG, (ii) otwieranie pierścieni imidazolowych dające 4,6-diamino-5-formamidopirymidyny (Fapy-Ade) i 2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyny (Fapy-Gua) oraz (iii) powstawanie 8-5'-cyklicznych pochodnych 2'-dezoksyguanozyny i 2'-dezoksyadenozyny. Interakcja jonów metali z aktywnym tlenem wydaje się mieć istotny wpływ na spektrum powstających uszkodzeń. Inkubacja DNA z nadtlenkiem wodoru w warunkach nierodnikowych, tzn. pozbawionych śladowych ilości metali prowadzi do niemal selektywnego powstawania N-1 tlenku adeniny (Ryc. 1) [19].

### II-3. Utlenianie puryn w DNA komórkowym

W komórkach ssaków traktowanych nadtlenkiem



wodoru zaobserwowano występowanie 8-oxodA i 8-oxodG [20, 21]. 8-oxodG znajdowano również w komórkach ssaków poddanych promieniowaniu jonizującemu [22] i innym czynnikom utleniającym [23, 24]. W nowotworach wątroby szczurów ekspozycjach na działanie kancerogenów chemicznych obserwowano tworzenie Fapy-Gua [25]. W DNA izolowanym z ludzkich guzów piersi stwierdzono występowanie 8-oxodG, Fapy-Gua, 8-oxodA [26]. W DNA *Proteus mirabilis* traktowanego nadtlenkiem wodoru zaobserwowano tworzenie N-1-tlenku adeniny [11].

### III. Kodujące właściwości utlenionych puryn

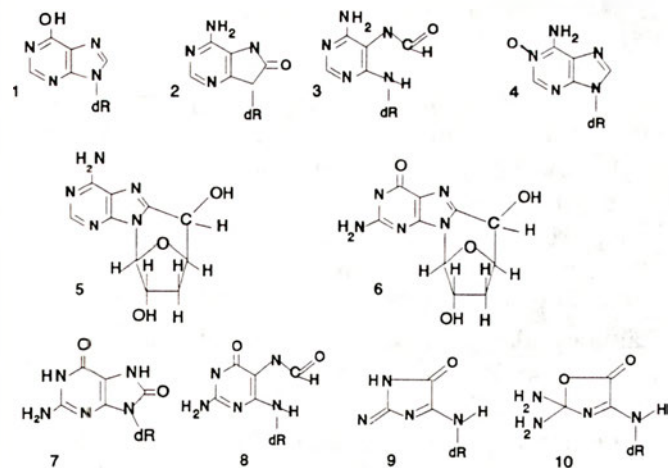
Badania nad właściwościami kodowania utlenionych puryn dotyczyły jedynie 8-oxodG i 8-oxodA. Konsekwencje obecności w DNA innych oksydacyjnych uszkodzeń puryn nie są znane. Dostępne są jedynie dane o właściwościach kodowania Fapy-7-metyloguaniny, modyfikacji zbliżonej strukturalnie do Fapy-Gua, lecz powstającej na skutek metylacji guaniny w pozycji N-7, a następnie otwarcia pierścienia imidazolowego pomiędzy C8 i N9.

#### III-1. 8-oxo-7,8-dihydroguanina

Właściwości kodujące 8-oxodG były badane po raz pierwszy przez Kuchino i wsp. [27]. Replikacja syntetycznych oligonukleotydów z pojedynczą resztą 8-oxodG przez polimerazę DNA I z *E. coli* wykazała, że obecność tej zmodyfikowanej zasady nie blokuje replikacji, ale naprzeciw 8-oxodG są włączane wszyst-

kie 4 nukleotydy z jednakową częstością. W badaniach Kuchino i wsp. [27] nieoczekiwanie zaobserwowano również błędy w kodowaniu pirymidyn sąsiadujących z 8-oxodG. Dalsze badania nie potwierdziły jednak tych obserwacji. Shibutani i wsp. [28] w podobnych eksperymentach wykazali, że naprzeciw 8-oxodG były włączane specyficzne dCMP i dAMP. Stosunek włączania dC:dA naprzeciw 8-oxodG był różny w zależności od użytej polimerazy DNA i wynosił: 7:1 dla polimerazy DNA I z *E. coli*, 4:1 dla polimerazy  $\beta$  z komórek HeLa, 1:200 dla polimerazy  $\alpha$  z komórek HeLa i 1:5 dla polimerazy  $\sigma$  z grasicy cielęcej. Stałe Michaelisa ( $K_m$ ) dla włączania dC lub dA naprzeciw 8-oxodG były 3-35 razy wyższe niż przy włączaniu dC naprzeciw dG; również przy inkorporacji następnego nukleotydu do nowosyntetyzowanej nici,  $K_m$  dla tego nukleotydu było 2-100 razy wyższe dla par 8-oxodG:dC i 8-oxodG:dA niż dla pary dG:dC. Chociaż więc obecność 8-oxodG w matrycy nie blokuje replikacji DNA, to zmniejsza szybkość syntezy. Dla wszystkich badanych polimeraz DNA wydłużanie pary 8-oxodG:dA zachodziło przy niższej stałej Michaelisa i z większą szybkością maksymalną niż wydłużanie pary 8-oxodG:dC [28]. Błędnie włączona dA naprzeciw matrycowej dG była rozpoznawana i wycinana przez 3'  $\rightarrow$  5' egzonukleolityczną aktywność polimerazy DNA I z *E. coli*, jednakże ani dA, ani dC nie była wycinana z syntetyzowanego łańcucha po sparowaniu z 8-oxodG [28].

Mutageną specyficzną 8-oxodG ustalono na podstawie badań mutagenyzy kierowanej. Obecność pojedynczej reszty 8-oxodG w jednoniciowym wektorze fagowym indukowała transwersje G  $\rightarrow$  T w komórkach *E. coli* z częstotliwością 0,5-1% [29]. Użycie dwuniciowego plazmidu z wydeletowanym fragmentem jednej nici, gdzie jedna reszta 8-oxodG występowała na nici pojedynczej, pozwoliło stwierdzić, że 8-oxodG nie hamuje wydajności transformacji plazmidu do komórek *E. coli*. W miejscu uszkodzenia 99% transformantów posiadało pary G:C, jednakże 1% zawierał transwersje G  $\rightarrow$  T. Nie stwierdzono również mutacji zasad sąsiadujących z 8-oxodG [30]. Indukcja systemu SOS w komórkach *E. coli* (układu naprawczego, który kosztem obniżenia wierności replikacji i podwyższenia częstości mutacji zwiększa przeżycie po uszkodzeniu DNA [31]) nie zmieniała ani częstotliwości ani specyficznego mutacji powstających na matrycy zawierającej 8-oxodG [30]. W kolejnych badaniach [32], w których dwuniciowe DNA fagowe nie zawierało 8-oxodG naprzeciw luki w drugiej nici, a luka ta była uzupełniana przez polimerazę z faga T7 w obecności mieszaniny nukleotydów zawierającej 8-oxodGTP zamiast dGTP, częstotliwość mutacji wynosiła 16%, a 76 z 78 zaobserwowanych substytucji zasad były transwersjami A  $\rightarrow$  C, zaś 2 pozostałe G  $\rightarrow$  T. Wyniki te wskazują, że 8-oxodGTP może być włączana do DNA podczas replikacji. Błędne sparowanie 8-oxodG z dA prowadzi do powstawania trans-



Rys. 1. Produkty utleniania nukleozydów purynowych *in vitro*: 1. 2'-deoksyinozyna; 2. 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoksyadenozyna; 3. dezoksynukleozyd 4,6-diamino-5-formamidopirymidyny; 4. N-1-tlenek 2'-deoksyadenozyny; 5. 8,5'-cyklo-2'-deoksyadenozyna; 6. 8,5'-cyklo-2'-deoksyguanozyna; 7. 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozyna; 8. dezoksynukleozyd 2,6-diamino-4-hydrokso-5-formamidopirymidyny; 9. 2-amino-5-[(2-deokso- $\beta$ -D-erytropentafuranozyl)-amino]-4-imidazol; 10. 2,2-diamino-4-[(2-deokso- $\beta$ -D-erytropentafuranozyl)-amino]-5(2H)-oxazolone

wersji G : C → T : A, jeśli 8-oxodG występuje w matrycy lub transwersji A : T → C : G, jeśli jest ona włączana do nowosyntetyzowanego łańcucha z puli nukleotydów komórkowych.

### III-2. 8-oxo-7,8-dihydroadenina

Właściwości kodujące 8-oxodA były badane przy użyciu syntetycznych oligonukleotydów, zawierających pojedynczą resztę 8-oxodA. Obecność 8-oxodA nie hamowała replikacji tych matryc przez fragment Klenowa polimerazy DNA I z *E. coli* ani przez polimerazę z *Thermus aquaticus*. Zasadą wbudowywaną do DNA naprzeciw 8-oxodA była tymina [33]. Można by więc sugerować, że 8-oxodA, chociaż jest jednym z głównych produktów modyfikacji DNA indukowanych promieniowaniem jonizującym [34], nie odgrywa roli w mutageniezie i kancerogenezie.

### III-3. Fapy-7-metyloguanina

Fapy-7-MeG była wprowadzona do DNA faga M13 przez metylację DNA siarczanem dwumetylu i otwarcie pierścieni imidazolowych jej prekursora — N-7-MeG w środowisku zasadowym [35]. Replikacja DNA *in vitro*, przez polimerazę DNA I z *E. coli* w obecności Fapy-7-MeG była zatrzymywana na wysokości jednej zasady przed resztą guaniny [36]. Po transfekcji DNA faga M13mp18 zmodyfikowanego działaniem DMS i zasady do komórek *E. coli* zaobserwowano znaczne obniżenie żywotności faga zawierającego Fapy-7-MeG w stosunku do faga zawierającego w DNA 7-MeG. Analiza mutacji w genie *lacZ* fagów zawierających Fapy-7-MeG, a namnażających się w komórkach *E. coli* z zaindukowanym systemem SOS wykazała jedynie nieznaczny, 2-3-krotny wzrost częstotliwości transwersji G → C i G → T [37]. Wydaje się więc, że głównym następstwem obecności w DNA Fapy-7-MeG jest blokowanie replikacji i w konsekwencji efekt letalny.

## IV. Naprawa DNA zawierającego utlenione formy puryn

W komórkach *E. coli* poznano trzy enzymy eliminujące 8-oxodG z puli nukleotydów lub z DNA: produkt genu *mutT*, formamidopirymidyno-DNA-glikozylazę (białko Fpg) będące produktem genu *fpg* (= *mutM*), oraz produkt genu *mutY*. Niedobór każdego z tych białek w komórkach *E. coli* prowadzi do wzrostu częstotliwości mutacji spontanicznych typu transwersji.

### IV-1. Białko MutT

Spośród genów mutatorowych u *E. coli*, *mutT* był znaleziony jako pierwszy [38]. Mutacja w tym genie specyficznym zwiększa 100-10000 razy częstotliwość

transwersji A : T → C : G [39] i nie podnosi częstotliwości tranzykcji ani mutacji typu zmiany fazy odczytu [40]. Mutacja *mutT* jest recesywna w stosunku do dzikiego allelu *mutT*<sup>+</sup> [41]. Efekt mutatorowy genu objawia się zarówno w stosunku do dwuniciowego DNA *E. coli* oraz bakteriofaga lambda [42] jak i jednoniciowego faga M13 [43]. Wyniki doświadczeń nad replikacją *in vitro* jednoniciowego faga M13z użyciem ekstraktów ze szczepu dzikiego oraz *mutT* sugerowały, że produkt genu *mutT* zapobiega błędnemu parowaniu adeniny z guaniną [43].

Gen *mutT* jest zlokalizowany na 2,5 min mapy genetycznej *E. coli* [41]. W latach 1987-88 w dwóch niezależnych pracowniach sklonowano gen *mutT*, a białko MutT zostało oczyszczone do homogenności [44-46]. Gen *mutT* złożony jest z 387 par zasad. Masa cząsteczkowa białka wynosi 15000 [44]. Najbardziej oczyszczone preparaty białka MutT zawierały polipeptyd o masie 15000 jako główny składnik oraz niewielką domieszkę większego białka. Sekwencja pierwszych 20 aminokwasów od końca aminowego obu tych białek była taka sama [45], być może więc obecność większego polipeptydu jest związana z posttranslacyjną modyfikacją białka MutT.

Akiyama i wsp. [45] stwierdzili, że białko MutT posiada aktywność dGTP-azy, do której wymaga obecności jonów Mg<sup>2+</sup>. Maki i Sekiguchi [47] zaobserwowali następnie, że białko MutT hydrolyzuje nie tylko dGTP do dGMP, ale także 8-oxodGTP do 8-oxodGMP, przy czym stała Michaelisa dla hydrolizy 8-oxodGTP jest 2000 razy niższa niż dla dGTP. Prawdopodobnie więc w warunkach fizjologicznych enzym preferencyjnie rozkłada 8-oxodGTP. *In vitro* białko MutT hydrolyzuje również inne trifosforany nukleotydów do monofosforanów, ale z bardzo niską szybkością maksymalną i bardzo wysokimi wartościami Km [47].

W badaniach nad przyporządkowaniem aktywności enzymatycznej białka MutT jego funkcji zapobiegania błędnemu parowaniu guaniny z adeniną zauważono, że podczas replikacji poli(dA) *in vitro* przez podjednostkę α polimerazy DNA III z *E. coli*, w nieobecności białka MutT do nowosyntetyzowanego łańcucha są włączane niewielkie ilości dGMP (poniżej 1 zasady na 10000 nukleotydów). Obecność białka MutT w mieszaninie reakcyjnej zawierającej wszystkie cztery trifosforany nukleotydów obniżała błędne włączanie dGMP, a obniżenie to korelowało z aktywnością dGTP-azową enzymu [45]. dGMP włączane błędnie do matryc poli(dA:dT) przez polimerazę DNA III migrowało wolniej niż autentyczne dGMP w chromatografii cienkowarstwowej, a szybkość jego migracji była charakterystyczna dla 8-oxodGMP [47]. Błędne włączanie dG naprzeciw dA w badaniach Akiyama i wsp. [45] było prawdopodobnie spowodowane zanieczyszczeniem preparatów dGTP przez 8-oxodGTP. Stosując wysokooczyszczone preparaty dGTP nie zaobserwowano błędnej inkorporacji



dG naprzeciw dA [47]. 8-oxodGTP może być włączane do DNA przez podjednostkę  $\alpha$  polimerazy DNA III naprzeciw dA i dC, ale nie naprzeciw dG i dT. Reakcja ta zachodzi łatwiej niż włączanie niezmodyfikowanych źle sparowanych nukleotydów [47]. Fizjologiczna rola białka MutT polegałaby więc na usuwaniu z puli nukleotydów komórkowych 8-oxodGTP, nukleotydu który może być włączany do DNA podczas replikacji i parując błędnie z dA indukować powstawanie transwersji A:T  $\rightarrow$  C:G.

#### IV-2. Białko FPG(= MutM)

Białko FPG zostało początkowo odkryte jako enzym usuwający z DNA pochodną guaniny z otwartym pierścieniem imidazolowym — 2,6-diamino-4-hydroksy-5N-metylo-formamidopirymidynę (Fapy-7-MeG) [48]. Uszkodzenia takie powstają *in vitro* w środowisku zasadowym z 7-metyloguaniny [35] będącej ilościowo przeważającym uszkodzeniem indukowanym czynnikami alkilującymi. Podstawione Fapy-Gua powstają również pod wpływem niektórych leków przeciwnowotworowych jak N,N'-bis (2-chloroetylo)-N-nitrozomocznik czy metabolity cyklofosfamidu [49, 50] oraz mutagenów środowiskowych — aflatoksyny B1 i N-hydroksyacetylofluorenu [51, 52]. Reakcje prowadzące do powstawania Fapy-7-MeG zachodzą również *in vivo*. Uszkodzenie to było znajdowane w DNA wątroby szczura po intoksykacji zwierząt N,N-dimetylonitrozoaminą lub 1,2-dimetylohydrazyną oraz w DNA nabłonka pęcherza moczowego szczura traktowanego N-metylonitrozomocznikiem [53, 54].

Obecność w komórkach *E. coli* białka FPG początkowo wiązana była z usuwaniem z DNA wtórnych uszkodzeń powstałych z alkilowanych zasad. Badania nad enzymem były jednak ograniczone ze względu na niski poziom ekspresji w dzikich szczepach *E. coli*. Dopiero w 1987 r. gen *fpg* z *E. coli* został sklonowany początkowo na plazmidzie pBR322, następnie dwukrotnie przeklonowany, co pozwoliło na uzyskanie 800-krotnej nadprodukcji enzymu w stosunku do szczepu dzikiego [55, 56]. Gen *fpg* jest złożony z 807 par zasad i koduje białko o długości 269 aminokwasów [55] i masie cząsteczkowej 30,2 kD. Eksperymentalnie wyznaczony punkt izoelektryczny białka wynosi 8,5 [56].

Białko FPG jest N-glikozylazą o szerokim spektrum specyficzności substratowej. Wycina ono reszty adeniny z otwartym pierścieniem imidazolowym, guaninę z otwartym pierścieniem imidazolowym zarówno niepodstawioną jak i podstawioną w pozycji N-7 czynnikami metylującymi, chloroetylującymi, aflatoksyną B1 i metabolitami cyklofosfamidu [57]. Wszystkie te pochodne formamidopirymidynowe mają pierścień imidazolowy otwarty pomiędzy C8 i N9 reszty guaniny. Ponadto białko FPG rozpoznaje i usuwa resztę guaniny z otwartym pierścieniem imidazolowym pomiędzy N7 i C8 N-(dezoksyguanozyno-8-yl)-2-aminofluorenu [57].

Enzym rozpoznaje również i usuwa z DNA 8-oxodG [15, 58]. 8-oxodG jest wycinane przez białko FPG z syntetycznych dwuniciowych dezoksyoligonukleotydów, jeśli występuje naprzeciw dC, dG, czy dT. Natomiast jeśli występuje naprzeciw dA nie jest rozpoznawane przez ten enzym. 8-oxodG nie jest substratem dla białka FPG w jednoniciowych dezoksyoligonukleotydach [58]. 8-oxodA nie jest substratem dla białka FPG ani w jedno- ani w dwuniciowych syntetycznych oligonukleotydach niezależnie od parowania z każdą z czterech zasad [58].

Białko FPG posiada również dwie inne aktywności enzymatyczne. W miejscach apurynowych przecina ono wiązania estrowe zarówno od końca 3' jak i 5' miejsca AP uwalniając zredukowaną resztę cukrową oraz fragmenty DNA z resztami fosforanowymi na końcach 3' i 5' [59]. Zredukowane miejsca AP nie są substratem dla białka FPG [60, 61], co sugeruje, że mechanizm tej reakcji polega na  $\beta$ -eliminacji, po której następuje delta-eliminacja. Enzym ten usuwa również terminalną 5'-fosfodezoksyrybozę pozostającą po nacięciu DNA, w miejscach apurynowych, przez endonukleazy [62]. Potencjalnie więc, może on uczestniczyć w procesie reperacji przez wycinanie, zainicjowanym przez inne enzymy. Aktywność glikozylazowa i AP-endonukleazowa współzawodniczą ze sobą wzajemnie. Zarówno jedno- jak i dwuniciowe dezoksyoligonukleotydy zawierające zredukowane miejsca apurynowe są silnymi inhibitorami aktywności N-glikozylazowej białka FPG [60]. Stosunek białko:DNA przy 100% hamowaniu aktywności glikozylazowej wynosi 1:1, sugerując że tworzenie kompleksu białko-DNA jest osiągnięte przez wiązanie jednej cząsteczki DNA z jedną cząsteczką białka. Jednoniciowe i dwuniciowe oligonukleotydy zawierające pojedyncze niezredukowane miejsca apurynowe (które są substratami dla białka FPG) również hamują aktywność N-glikozylazową enzymu, prawdopodobnie przez kompetycję z substratem Fapy [60]. Białko FPG zawiera 1 atom cynku na cząsteczkę związany z czterema resztami cysteiny zlokalizowanymi w pobliżu C-końca polipeptydu w pozycjach 244, 247, 264, 267 i zorganizowanymi w charakterystyczny dla palców cynkowych motyw sekwencyjny CysX<sub>2</sub>CysX<sub>16</sub>CysX<sub>2</sub>Cys. Ponadto enzym posiada 2 dodatkowe reszty cysteiny w pozycjach 147 i 195. Badając mechanizm działania białka FPG skonstruowano mutanty Cys  $\rightarrow$  Gly w każdej z poszczególnych pozycji reszt cysteiny i stwierdzono, że cztery terminalne reszty cysteiny są zaangażowane zarówno w wiązaniu cynku i DNA do enzymu jak i we wszystkich trzech aktywnościach enzymatycznych białka FPG [63].

Sklonowanie genu *fpg* na plazmidzie pFPG50 umożliwiło wstawienie do genu 1,5 kb fragmentu DNA niesącego oporność na kanamycynę i uzyskanie mutantu *fpg-1::Kn<sup>r</sup>* [64]. Gen *fpg* zmapowano w 81.7 min chromosomu *E. coli*. Poprzez integrację genu *lacZ* do promotora *fpg* ustalono, że aktywność genu nie jest

indukowana ani przez czynniki indukujące system SOS ani przez induktory systemu odpowiedzi adaptacyjnej na czynniki alkilujące [64]. Długo nie można było ustalić fenotypu mutacji w locus *fpg*. Mutant *fpg-1* był niewrażliwy na czynniki, które potencjalnie mogłyby indukować Fapy w DNA, tj. na promieniowanie jonizujące, UV, MMS i MNNG [64]. W 1991 r. Michaels i wsp. [65] sklonowali i oczyszczili produkt genu *mutM* z *E. coli*. Locus *mutM* mapuje się w 81 min mapy genetycznej *E. coli*, a mutacja w tym genie prowadzi do specyficznego 10-krotnego wzrostu transwersji G:C → T:A [66]. W wyniku analizy sekwencji nukleotydów genu stwierdzono, że jest on identyczny z genem *fpg*. Fenotypem mutacji w locus *fpg* jest więc wzrost częstotliwości transwersji G:C → T:A. Okazało się również, że specyficzność białka FPG jest identyczna ze specyficznością oczyszczonej niezależnie przez grupę Nishimury glikozylazy z *E. coli* usuwającej 8-oxodG z DNA [67, 58].

Aktywność białka FPG może być komplementowana przez inne systemy reperacyjne *E. coli*. Plazmid pBR322 modyfikowano *in vitro* fotosensybilizatorem, błękitem metylenowym i światłem widzialnym (MB-światło), który uszkadzając DNA tworzy zarówno addukty z resztą guaniny jak i 8-oxodG. Po transdukcji plazmidu do komórek *E. coli* zaobserwowano synergistyczne zmniejszenie wydajności transdukcji u podwójnego mutantu *fpg-1, uvrA* w stosunku do szczepu dzikiego. Wydajność transdukcji u mutantów pojedynczych *fpg-1* bądź *uvrA* była taka sama jak w szczepie dzikim [68]. Synergistycznego efektu tych dwóch mutacji nie stwierdzono, gdy plazmid modyfikowany był promieniowaniem jonizującym, UV (254nm) lub MMS. Liczba nacięć plazmidu poddanego działaniu MB-światła, dokonywana *in vitro* przez oczyszczone enzymy FPG i UvrABC endonukleazę, była jednakowa. Reperacja uszkodzeń indukowanych przez MB-światło jest więc podejmowana zarówno przez białko FPG jak i UvrABC endonukleazę, które mogą się nawzajem zastępować.

Szerokie spektrum specyficzności substratowej oraz trzy różne aktywności enzymatyczne białka FPG sugerują, że niezależnie od funkcji polegającej na usuwaniu z DNA 8-oxodG i zapobieganiu powstawania transwersji G:C → T:A, bierze ono również udział w usuwaniu innych uszkodzeń i uzupełnia aktywność innych systemów naprawy DNA.

### IV-3. Białko MutY

Nghiem i wsp. [69] odkryli istnienie w komórkach *E. coli* nowego genu mutatorowego specyficznie podnoszącego częstotliwość transwersji G:C → T:A. Gen ten został nazwany *mutY* i zmapowany w około 64 min mapy genetycznej *E. coli*. Defekt genu *mutY* powoduje bardzo duży wzrost częstotliwości spontanicznych mutacji, tego samego rzędu co brak białka MutT.

Białko MutY z komórek *E. coli* zostało oczyszczone do homogenności i stwierdzono, że jest to monomer o masie cząsteczkowej 36 000 [70]. Gen *mutY* został następnie sklonowany na plazmidzie pBR329 [71]. Gen ten zawiera 1050 nukleotydów kodujących białko złożone z 350 aminokwasów o masie cząsteczkowej 39 123. Sekwencja nukleotydów genu *mutY* wykazuje dużą homologię z sekwencją genu *nth*, mapującego się na 36 min mapy genetycznej *E. coli*, kodującego endonukleazę III. Enzym ten wycina z DNA uszkodzone reszty tyminy i cytozyny [72]. W 181 aminokwasowych odcinkach pokrywających się w obydwu białkach zaobserwowano 23,8% fragmentów identycznych oraz 66,3% fragmentów podobnych. Oba enzymy posiadają charakterystyczną grupę prostetyczną [4Fe-4S]<sup>2+</sup> z resztami cysteiny zlokalizowanymi w pobliżu C-końca cząsteczki białkowej [71].

Oczyszczony preparat białka MutY inkubowany z heterodupleksami zawierającymi błędną parę G-A wytwarzał miejsca wrażliwe na działanie 5'AP-endonukleazy z komórek HeLa, tzn. miejsca apurynowe. Nicią, w której powstawały miejsca apurynowe była nicią zawierającą resztę adeniny [70]. Białko MutY jest więc glikozylazą usuwającą adeninę z błędnie sparowanego hybrydu G-A. Okazało się następnie, że białko MutY jest identyczne z opisaną niezależnie przez Radice i wsp. [73] glikozylazą usuwającą adeninę z błędnych par G-A lub C-A, a kodowaną przez gen *micA* [74].

Przy użyciu oczyszczonej glikozylazy MutY i syntetycznych oligonukleotydów zawierających błędne pary A:G bądź A:8-oxodG stwierdzono, że enzym usuwa adeninę nie tylko z pary A:G, ale również z pary A:8-oxodG i to z jednakową szybkością, tj. 26 nmoles/godz/mg białka [75]. Enzym jest specyficzny wobec adeniny sparowanej z guaniną bądź 8-oxodG, gdyż nie usuwa cytozyny, guaniny ani tyminy sparowanej z 8-oxodG, ani też nie eliminuje 8-oxodG z żadnej z wymienionych hybryd [75].

Mutanty *mutY* i *mutM* (= *fpg*) charakteryzują się identycznym spektrum mutacji, tj. specyficznie zwiększają częstotliwość transwersji G:C → T:A [66, 70]. Produkty obydwu genów mogłyby się uzupełniać w naprawie 8-oxodG. Białko MutM (FPG) usuwałoby 8-oxodG z DNA, zaś glikozylaza MutY eliminowałaby reszty adeniny błędnie włączone do DNA naprzeciw 8-oxodG nie usuniętej przez MutM przed replikacją. Hipotezę tę potwierdza test komplementacji. Wprowadzenie do szczepu *mutY* plazmidu nadproducenta białka MutM (FPG) zmniejsza częstotliwość mutacji szczepu *mutY* do poziomu szczepu dzikiego [73]. Ponadto w ekstraktach szczepu *Sup17*, chromosomalnego supresora mutacji *mutY* stwierdzono 15-krotną nadprodukcję białka MutM. Podwójny mutant *mutYmutM* charakteryzował się 20-krotnie wyższą częstotliwością transwersji G:C → T:A niż wynikałoby to z sumy efektu mutacji pojedynczych *mutY* i *mutM* [75].

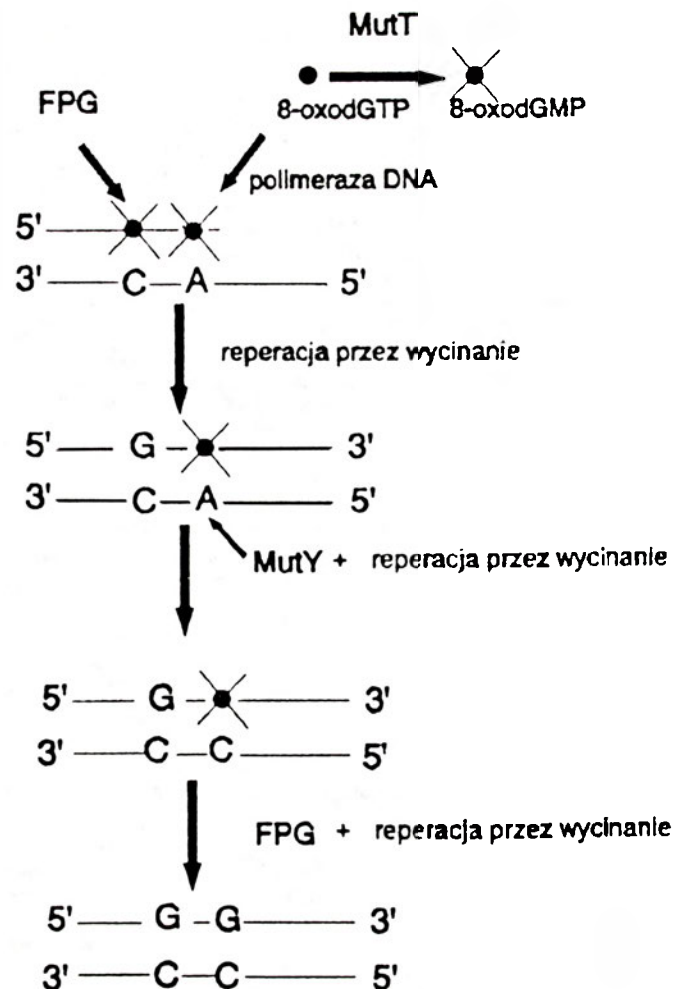
## V. Podsumowanie

Organizmy żywe posiadają szereg enzymatycznych i nieenzymatycznych dróg eliminacji reaktywnych form tlenu z komórki jak np.: katalazy, peroksydazy, dysmutazy natlenkowe czy kwas askorbinowy lub karoten [76]. Jednakże te bariery nie wystarczają do wylapania wszystkich reaktywnych form tlenu. W pojedynczej komórce wątroby szczura w ciągu każdego dnia tworzy się  $4 \times 10^5$  reszt 8-oxodG, a uszkodzenie to stanowi około 5% wszystkich oksydacyjnych modyfikacji DNA [77].

W komórkach *E. coli* istnieją przynajmniej trzy, nawzajem uzupełniające się drogi eliminacji 8-oxodG z puli trójfosforanów dezoksynukleotydów i z DNA. Pierwsza polega na usuwaniu 8-oxodGTP z puli nukleotydów komórkowych przez 8-oxodGTP-azę kodowaną przez gen *mutT*. 8-oxodGTP jest włączane do DNA przez polimerazy DNA naprzeciw dC lub dA indukując transwersje A:T → C:G. Obecna w DNA 8-oxodG jest z niego usuwana w kaskadzie reakcji katalizowanych przez wiele enzymów. Białko FPG (MutM), dzięki aktywności N-glikozylazowej usuwa 8-oxodG, a następnie nacina nić DNA w miejscu uszkodzenia rozpoczynając proces naprawy przez wycinanie. Jeśli jednak przed reperacją rozpocznie się następna runda replikacji DNA, 8-oxodG nie jest rozpoznawane i usuwane z jednoniciowych fragmentów DNA przez białko FPG i może błędnie parować z dA. Polimerazy DNA z różnych źródeł z różną wybiórczością włączają dC lub dA naprzeciw 8-oxodG, przy czym polimerazy eukariotyczne preferują włączanie adeniny do nowosyntetyzowanej nici DNA naprzeciw 8-oxodG. Para 8-oxodG:dA również nie jest rozpoznawana przez białko FPG. Kolejny etap naprawy 8-oxodG byłby realizowany przez białko MutY, usuwające adeninę z pary 8-oxodG:dA. W procesie naprawy zapoczątkowanym przez białko MutY powstają miejsca apurynowe, które podlegają naprawie przez wycinanie. Naprzeciw 8-oxodG może wtedy zostać włączona dC, co umożliwia białku FPG wycięcie 8-oxodG i ostateczną korekcję pary 8-oxodG:dA w parę dG:dC (Ryc. 2).

8-oxodG nie usunięta z DNA charakteryzuje się silnymi właściwościami mutagennymi. Mutacja w locus *mutT* oraz *mutY* zwiększa 100-10 000 razy częstotliwość spontanicznych transwersji. Uszkodzenie dwóch enzymów, FPG (= MutM) i MutY synergistycznie, 10-20-krotnie zwiększa częstotliwość mutacji spontanicznych ponad wartość, która wynikałaby z sumy częstotliwości obserwowanej u mutantów pojedynczych.

Duże ilości 8-oxodG powstają w mitochondriach ssaków [78], w tym i człowieka, a jej poziom wzrasta drastycznie pod wpływem niektórych leków, np. AZT [79] stosowanego w terapii AIDS, czy pewnych antybiotyków takich jak tetracyklina, bacytracyna i rifamycyna [80]. 8-oxodG jest usuwana z DNA ssaków



Rys. 2. Eliminacja 8-oxodG z puli trójfosforanów nukleotydów i z DNA *E. coli* przez białka MutT, FPG i MutY.

i wydalana z moczem zarówno zwierząt jak i ludzi [76]. Jednakże enzymy umożliwiające eliminację tej zmodyfikowanej zasady są słabo poznane. Białko FPG zostało częściowo oczyszczone z komórek grasicy cielęcej [81].

Artykuł otrzymano 4 stycznia 1993 r.  
Zaakceptowano do druku 11 marca 1993 r.

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



1. Flohe L, Beckman R, Giertz H, Loschen G (1985) W: Sies H (red) Oxidative stress. Academic Press, London, str. 403-435
2. Rubanyi GM (1988) *Free Rad Biol Med* 4: 107-120
3. Zweier JL (1988) *J Biol Chem* 263: 1353-1357
4. Meneghini R (1988) *Mutat Res* 195: 215-230
5. Sun Y (1990) *Free Rad Biol Med* 8: 583-599
6. Richard J, Aguilani B, Arnaud J, Gout JP, Decoux G, Favier A (1989) W: Neve J, Favier A (red) Selenium in Medicine and Biology. Water de Gruyter, str 219-223
7. Cerutti PA, Trump BF (1991) *Cancer Cells*, 3: 1-7
8. Smith MT, Evans CG, Thor H, Orrenius S (1985) W: Sies H. (red.) Oxidative stress, Academic Press, London, str. 91-113
9. Foote CS (1991) *Photochemistry and Photobiology* 54: 659
10. Cadet J, Berger M, Decarroz C, Mouret JF, van Lier JE, Wagner RJ (1991) *J Chim Phys* 88, 1021.
11. Cadet J, Berger M, Ravanat J (1991) W: Protection biologique et therapeutique contre les radicaux libres, Grenoble, str. 1-28.
12. Hazra DK, Steenken J (1983) *J Am Chem Soc* 105: 4380-4386
13. Wagner JR, van Lier JE, Johnston LJ (1990) *Photochem Photobiol* 52: 333
14. Isildar M, Schuchmann MN, Schulte-Frohlinde D, von Sonntag C (1982) *Int J Radiat Biol* 41: 525
15. Boiteux S, Gajewski E, Laval J, Dizdaroglu M (1992) *Biochemistry* 31: 106-110
16. Blakley WF, Fuciarelli AF, Wegher BJ, Dizdaroglu M (1990) *Radiat Res* 121: 338
17. Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M (1989) *J Biol Chem* 264: 20509-20512
18. Dizdaroglu M, Aruoma OI, Halliwell B (1990) *Biochemistry* 29: 8447-8451
19. Mouret JF, Odin F, Polverelli M, Cadet J (1990) *Chem Res Toxicol* 3: 102-110
20. Schraufstatter I, Hyslop PA, Jackson JH, Cochran CG (1988) *Clin Invest* 82: 1040-1050
21. Dizdaroglu M, Nackerdien Z, Chao BC, Gajewski E, Rao G (1991) *Arch Biochem Biophys* 285: 388-390
22. Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootsuyama A, Tanooka H (1986) *Carcinogenesis* 7: 1849-1851
23. Kasai H, Nishimura S, Kurokawa Y, Hayashi Y (1987) *Carcinogenesis* 8: 1959-1961
24. Kasai H, Okada Y, Nishimura M, Rao MS, Reddy JK (1989) *Cancer Res* 49: 2602-2605
25. Malins DC, Ostrander GK, Haimanot R, Williams P (1991) *Carcinogenesis* 11: 1045-1047
26. Malins DC, Haimanot R (1991) *Cancer Res* 51: 5430-5432
27. Kuchino Y, Mori F, Kasai H, Inoue H, Isai S, Miura K, Ohtsuka E, Nishimura S (1987) *Nature (Lond)* 327: 77-79
28. Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP (1991) *Nature (Lond)* 349: 431-434
29. Wood ML, Dizdaroglu M, Gajewski E, Essigmann JM (1990) *Biochemistry* 29: 7024-7032
30. Moriya M, Ou C, Bodepudi V, Johnson F, Takeshita M, Grollman AP (1991) *Mutation Res* 254: 281-288
31. Grzesiuk E (1992) *Post Biochem* 38: 59-64
32. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA (1992) *J Biol Chem* 267: 166-172
33. Guschlbauer W, Duplaa AM, Guy A, Teoule R, Fazakerley GV (1991) *Nucleic Acids Res* 19: 1753-1758
34. van Hemmen JJ, Bleichrodt JJ (1971) *Radiat Res* 46: 444-456
35. Haines JA, Reese CB, Lord Todd J (1962) *J Chem Soc* 5281-5288
36. O'Connor TR, Boiteux S, Laval J (1988) *Nucleic Acids Res* 16: 5879-5894
37. Tudek B, Boiteux S, Laval J (1992) *Nucleic Acids Res* 20: 3079-3084
38. Treffers HP, Spinelli C, Belser NO (1954) *Proc Natl Acad Sci USA* 40: 1064-1071
39. Yanofsky C, Cox EC, Horn V (1966) *Proc Natl Acad Sci USA* 55: 274-281
40. Siegel EC, Kamel F (1974) *J Bacteriol* 117: 994-1001
41. Cox EC, Yanofsky C (1969) *J Bacteriol* 100: 390-397
42. Cox EC (1973) *Genetics* 73 (suppl.): 67-80
43. Schaaper RM, Dunn RL (1987) *J Biol Chem* 262: 16267-16270
44. Akiyama M, Horiuchi T, Sekiguchi M (1987) *Mol Gen Genet* 206: 9-16
45. Akiyama M, Maki H, Sekiguchi M, Horiuchi T (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3949-3952
46. Bhatnagar SK, Bessman MJ (1989) *J Biol Chem* 263: 8953-8957
47. Maki H, Sekiguchi M (1992) *Nature (Lond)* 355: 273-275
48. Chetsanga CJ, Lindahl T (1979) *Nucleic Acids Res* 6: 3673-3683
49. Muller N, Eisenbrand G (1985) *Chem Biol Interactions* 53: 173-181
50. Kallama S, Hemminki K (1986) *Chem Biol Interact* 57: 85-96
51. Chetsanga J, Frenette GP (1983) *Carcinogenesis* 4: 997-1000
52. Boiteux S, Bichara M, Fuchs RPP, Laval J (1989) *Carcinogenesis* 10: 1905-1909
53. Beranek DT, Weiss CC, Evans FE, Chetsanga CJ, Kadlubar FF (1983) *Biochem Biophys Res Commun* 110: 625-631
54. Kadlubar FF, Beranek DT, Weiss CC, Evans FE, Cox R, Irving CC (1984) *Carcinogenesis* 5: 587-592
55. Boiteux S, O'Connor TR, Laval J (1987) *EMBO J* 6: 3177-3183
56. Boiteux S, O'Connor TR, Lederer F, Gouyette A, Laval J (1990) *J Biol Chem* 265: 3916-3922
57. Laval J, Boiteux S, O'Connor TR (1990) *Mutation Res* 233: 73-79
58. Tchou J, Kasai H, Shibutani S, Chung MH, Laval J, Grollman AP, Nishimura S (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4690-4694
59. O'Connor TR, Laval J (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5222-5226
60. Castaing B, Boiteux S, Zelwer H (1992) *Nucleic Acids Res* 20: 389-394
61. Bailly V, Verly WG, O'Connor TR, Laval J (1989) *Biochem J* 262: 581-589
62. Graves RJ, Felzenszwalb I, Laval J, O'Connor TR (1992) *J Biol Chem* 267: 14429-14435
63. O'Connor TR, Graves RJ, de Murcia G, Castaing B, Laval J *J Biol Chem* (w druku)
64. Boiteux S, Huisman O (1989) *Mol Gen Genet* 215: 300-305
65. Michaels ML, Pham L, Cruz C, Miller JH (1991) *Nucleic Acids Res* 19: 3629-3632
66. Cabrera M, Nghiem Y, Miller JH (1988) *J Bacteriol* 170: 5405-5407
67. Chung MH, Kasai H, Jones DS, Inoue H, Ishikawa H, Ohtsuka E, Nishimura S (1991) *Mutation Res* 254: 1-12
68. Czeczot H, Tudek B, Lambert B, Laval J, Boiteux S (1991) *J Bacteriol* 173: 3419-3424
69. Nghiem Y, Cabrera M, Cupples CG, Miller JH (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2709-2713
70. Au KG, Clark S, Miller JH, Modrich P (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8871-8881
71. Michaels ML, Pham L, Nghiem Y, Cruz C, Miller JH (1990) *Nucleic Acids Res* 18: 3841-3845
72. Breimer LH, Lindahl T (1984) *J Biol Chem* 259: 5534-5548
73. Radicella JP, Clark EA, Fox MS (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9674-9678
74. Tsai-Wu JJ, Radicella JP, Lu AI (1991) *J Bacteriol* 173: 1902-1910
75. Michaels ML, Cruz C, Grollman AP, Miller JH (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7022-7025
76. Degan P, Shigenaga MK, Park EM, Alperin PE, Ames BN (1991) *Carcinogenesis* 12: 865-871
77. Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P,

- Ames BN (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4533-4537  
78. Richter C, Park JW, Ames BN (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6465-6467  
79. Hayakawa M, Ogawa T, Sugiyama S, Tanaka M, Ozawa T (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **176**: 87-93  
80. Quinlan GJ, Gutteridge MC (1991) *Biochem Phar-*

- macol* **42**: 1595-1599  
81. Laval J, O'Connor TR, d'Herin-Lagravere C, Auffret van der Kemp P, Boiteux S (1990) W: Laval J, Lambert M (red) *Repair mechanisms and their biological implications in mammalian cells*. Plenum Press, New York, str 25-36

# Organizacja genetyczna wirusa zapalenia wątroby typu B

## Genetic organization of hepatitis B virus

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

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa HBV i cząstek subwiralnych
- III. Organizacja genetyczna HBV
  - III-1 Budowa genomu
  - III-2 Elementy regulatorowe w genomie HBV
  - III-3 Proces replikacji HBV

### Contents:

- I. Introduction
- II. Structure of HBV and subviral particles
- III. Genetic organization of HBV
  - III-1 Structure of the genome
  - III-2 Regulatory elements in HBV genome
  - III-3 HBV replication process

**Wykaz stosowanych skrótów:** HBV — wirus zapalenia wątroby typu B (ang. — *hepatitis B virus*); HBsAg — antygen powierzchniowy HBV; HBcAg — antygen rdzeniowy HBV; HBeAg — antygen e; ORF — otwarta ramka odczytu; aa — aminokwas(y); pz — pary zasad; kz — tysiąc par zasad.

## I. Wstęp

Mimo upływu dwudziestu lat od identyfikacji wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV), stanowi on nadal poważny problem kliniczny i społeczny ze względu na masowość zakażeń i ich przewlekłe następstwa. Bada-

nia epidemiologiczne wskazują, że na świecie jest obecnie ok. 300 mln. nosicieli wirusa HBV. Są oni stałym źródłem zakażeń [1]. Następstwa wirusowego zapalenia wątroby takie jak zapalenie przewlekłe i marskość wątroby oraz rak pierwotny wątroby stanowią poważne zagrożenie zdrowia i życia dla znacznego odsetka (40%) nosicieli [2, 3]

Z powodu ograniczonej liczby gospodarzy HBV (człowiek i mały naczeln), dużej swoistości tkankowej oraz długotrwałych trudności z opracowaniem hodowli komórkowej zapewniającej replikację HBV, możliwości analizy molekularnej cyklu życiowego wirusa były bardzo ograniczone. Wiele ważnych informacji uzyskano dzięki analizie zakażonej tkanki, badaniu zwierząt (świstak, wiewiórka ziemna, kaczka pekińska) zakażonych przez inne rodzaje wirusów *Hepadna* (WHV, GSHV, DHBV), czy wreszcie przez ekspresję pojedynczych wirusowych genów w hodowlach komórkowych. Intensywny rozwój badań nastąpił dopiero od momentu zastosowania komórek ludzkiego raka pierwotnego wątroby (hepatoma), w których okazała się możliwa ekspresja całego genomu HBV [4, 5]. Linie komórkowe, wyprowadzone z ludzkich raków pierwotnych wątroby (HepG2, huH6, huH7) wydzielają pełne cząstki wirionu, które wywołują zapalenie wątroby typu B u szympanów [6, 7]. Badanie pośrednich form replikacji pochodzących z linii komórkowej HepG2 wykazało, że są one podobne do występujących w tkance wątrobowej zakażonych osób [8, 9].

Dokonany już postęp w badaniach oraz rozwój nowych technologii w genetyce i wirusologii molekularnej stwarza nadzieję na pełną analizę cząstki wirusowej i poznanie mechanizmu zakażenia. W artykule

<sup>1</sup> dr I Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Łodzi, 90-131

<sup>2</sup> doc. Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN, Łódź, ul. Dąbrowskiego 251.

omówiono współczesne poglądy na temat struktury genetycznej HBV oraz nietypowej strategii replikacyjnej tego wirusa.

## II. Budowa HBV i cząstek subwiralnych

Wirus HBV należy do rodziny *Hepadna viridae* składającej się z kilku spokrewnionych hepatotropowych DNA wirusów zaliczonych do niej na podstawie wspólnej morfologii, typowej wielkości genomu, charakterystycznego nadmiaru cząstek antygeny powierzchniowej i sposobu replikacji.

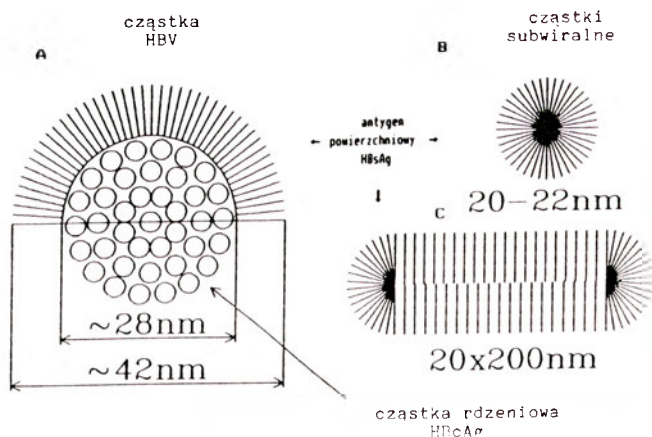
Uznawany do niedawna za pewny monotropizm tkankowy wirusa (komórka docelowa: hepatocyt) nie znalazł potwierdzenia w wynikach ostatnich badań. Wykazano obecność wirusowego DNA w licznych tkankach poza wątrobą takich jak: trzustka, grasica, śledziona, szpik kostny i limfocyty krwi obwodowej [10, 11].

HBV posiada rzadką wśród czynników zakaźnych zdolność utrzymywania się we krwi nosicieli w wysokim stężeniu sięgającym  $10^{10}$  cząstek na mililitr [12].

Cząstka wirusa (wirion), zwana także cząstką Dane'a [13] ma średnicę 42 nm i składa się z nukleokapsydu o średnicy 28 nm oraz płaszczka złożonego z białek powierzchniowych o grubości 7 nm. W skład nukleokapsydu wchodzi: częściowo dwuniciowa cząsteczka DNA, białko służące jako primer dla odwrotnej transkrypcji połączone z 5' końcem minusowej nici DNA, polimeraza DNA o własnościach odwrotnej transkryptazy i główne białko rdzeniowe P22 wykazujące również aktywność kinazy białkowej [3, 14]. 180 podjednostek białka rdzeniowego w nukleokapsydzie tworzy tzw. cząstkę rdzeniową HBcAg.

Otoczka wirusa składa się z białek powierzchniowych: S (małego), M (średniego) i L (dużego) występujących w połączeniu z węglowodanami oraz lipidami. Pochodzące z komórek gospodarza lipidy to głównie: fosfatydylocholina, zestyfikowany cholesterol i niewielkie ilości trójglicerydów [12].

Białka powierzchniowe w połączeniu z błonami lipidowymi stanowią tzw. antygen powierzchniowy HBsAg. HbsAg występuje również we krwi w postaci niezakaźnych form subwiralnych w stężeniu do ok.  $10^{15}$  cząstek na ml. Antygen powierzchniowy produkowany jest przez hepatocyty w dwóch formach morfologicznych: kulistej o średnicy 20-22 nm oraz pałeczkowatej o podobnej szerokości i długości 200 nm (Ryc. 1). Zarówno monomery białka S jak i pozostałe białka powierzchniowe połączone są kowalencyjnie przy udziale mostków dwusiarczkowych [12]. W skład wirionu wchodzi 300-400 monomerów białka S natomiast w 20 nm cząsteczce subwiralnej jest ich około 100. Oprócz tego wiriony oraz formy pałeczkowate mogą zawierać 10-20% białek L, podczas gdy kuliste cząstki subwiralne pochodzące od tych samych nosicieli zawierają tylko do 3% białka L. Większa ilość białka L w cząsteczce wirusa (40-80 kopii na cząstkę)



Ryc. 1. Antygen powierzchniowy (HBsAg) syntezowany w czasie zakażenia HBV stanowi otoczkę białkową pełnej cząstki wirusa (A) oraz tworzy niezakaźne subwiralne cząstki kuliste (B) lub pałeczkowate (C). Ryc. wykonano na podstawie danych z pracy [2]. Rycina przedstawia jedynie schemat cząstek nie mający potwierdzenia w badaniach ultrastrukturalnych.

potrzebna jest prawdopodobnie do dojrzewania i sekcji wirionów [15].

Obserwacja formowania cząstek Dane'a w transfekowanych HBV komórkach Huh7 wykazała, że wszystkie trzy rodzaje białek powierzchniowych (szczególnie istotne są proporcje między L i M) są niezbędne do utworzenia wirionu [16].

Skład otoczki białkowej zależy nie tylko od rodzaju cząstek, ale także od stadium zakażenia. W surowicach chronicznych nosicieli w czasie replikacji wirusa cząstki kuliste zawierają tę samą ilość białka S i M i około 20 razy mniej białka L. Gdy nie zachodzi replikacja cząstki kulistej, zawierają głównie białko S i mniej niż 1% białka L [17].

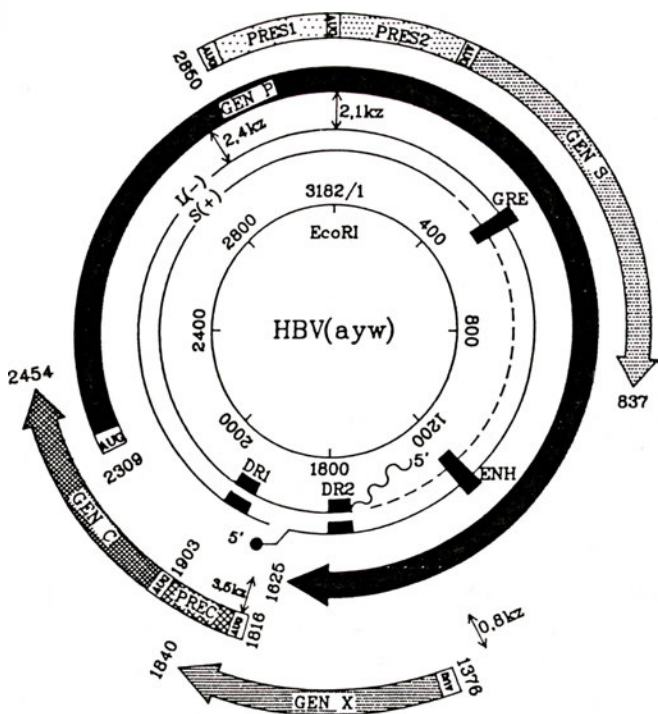
## III. Organizacja genetyczna HBV

### III-1. Budowa genomu

Wkrótce po sklonowaniu genomu HBV wyizolowanego z cząstek Dane'a [18] określono jego całkowitą sekwencję [19, 20]. Genom HBV oraz innych wirusów *Hepadna* ma bardzo charakterystyczną strukturę (Ryc. 2). Jest to mała, częściowo dwuniciowa cząsteczka DNA. Długość jej waha się w zależności od podtypu wirsa od 3182 do 3221 nukleotydów. Czterem klasycznym podtypom: adw, adr, ayw i awr odpowiada dziesięć zestawów sekwencji nukleotydowych, co jest podstawą klasyfikacji w obrębie podtypów [21]. Zmienność sekwencji różnych klonów tego samego podtypu HBV sięga 2% [22].

Minusowa nić DNA komplementarna do cząsteczek m-RNA, określana inaczej jako nić długa (L), ma charakter liniowy i liczy ok. 3200 nukleotydów. Nić krótka S (+) może mieć różną długość stanowiącą od 50-100% długości nici minus (najczęściej 1700-2800 nukleotydów). Mimo swojej liniowości, obie nici DNA tworzą strukturę kolistą, która jest utrzymywana





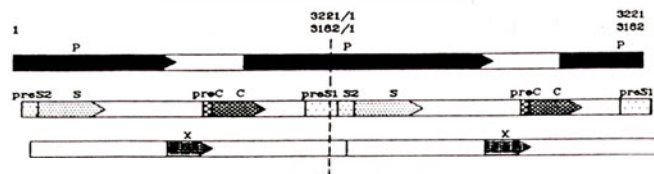
Ryc. 2. Organizacja genetyczna wirusa zapalenia wątroby typu B. Przedstawiono kolistą, częściowo dwuniciowy genom HBV (podtyp ayw) z zaznaczeniem ORF genów preS/S, preC/C, P, X oraz sekwencji regulatorowych. Czarna kropka na 5' końcu nici L symbolizuje białkowy primer replikacji. Ryc. 2 wykonano na podstawie danych pochodzących z prac: [14], [19], [20], [26].

dzięki tworzeniu komplementarnych par zasad przez 220 nukleotydów na końcach 5' obu nici DNA. Ten krótki fragment odpowiedzialny za utrzymanie kolistej struktury genomu zawiera także krótką sekwencję reprezentującą trójniciowe DNA (rejon 5' nici minus). Do końca 5' nici (-) przyłączone jest kowalencyjnie białko, które służy jako primer w replikacji [23]. Na obu końcach 5' nici DNA znajdują się proste powtórzenia DR1 i DR2 (*direct repeats*) o sekwencji TTCACCTCTGC (11pz), które służą jako pierwotne miejsca replikacji dla obu nici DNA.

Genom HBV zawiera cztery częściowo nakładające się otwarte ramki odczytu (ORF) na nici L: preS/S, preC/C, P oraz X (Ryc. 3). Kodują one trzy białka powierzchniowe wirusa [12], białka rdzeniowe [19], wirusową polimerazę z aktywnością odwrotnej transkryptazy [24] i transaktywujące białko X [25]. Ostatnie prace donoszą o istnieniu dwu dodatkowych otwartych ramek odczytu: ORF 5 na nici L i ORF 6 na nici S [26] nakładających się częściowo na ORF P i ORF X. Nie zidentyfikowane są dotychczas produkty białkowe mogące pochodzić z tych ramek odczytu.

ORF preC/C, inaczej nukleokapsydowa ORF, znajduje się pomiędzy 1816 i 2454 nukleotydem w genomie HBV (współrzędne dla podtypu ayw). Zawiera dwa znajdujące się w fazie kodony startu translacji i koduje dwa peptydy różniące się obecnością 29 aminokwasów na N-końcu dłuższego tzw. przedrdzeniowego polipeptydu (preC). Ta część przedrdzeniowego produktu

translacji funkcjonuje jako peptyd sygnałowy kierujący cząsteczkę do retikulum endoplazmatycznego, gdzie po proteolitycznym odcięciu N-końca pozostała jej część jest transportowana do aparatu Golgiego i wydzielana jako HBeAg. Główne białko rdzeniowe P22 jest produktem translacji, rozpoczynającej się od drugiego kodonu inicjującego w ORF C.



Ryc. 3. Ułożenie otwartych ramek odczytu na linearnym genomie HBV. Ten niewielki genom (ok. 3200 pz), dzięki nakładaniu się otwartych ramek odczytu przy jednoczesnym przesunięciu fazy odczytu dla poszczególnych genów (niezależnie od podtypu HBV), koduje białka wirusowe o łącznej masie cząsteczkowej ~180 tysięcy D. Ryc. 3 wykonano na podstawie danych pochodzących z prac: [21], [26].

ORF dla preS/S zlokalizowana została między nukleotydami 2850-837. Zawiera ona trzy, znajdujące się w fazie kodony ATG, które dzielą je na rejony preS1, preS2 i S. ORF preS/S koduje trzy białka powierzchniowe: L, M i S posiadające taki sam C-końcowy fragment cząsteczki [12]. Gen S i preS2 mają stałą długość we wszystkich podtypach HBV i kodują odpowiednio białko S o długości 226aa oraz peptyd preS2 o długości 55aa. Długość rejonu preS1 różni się w poszczególnych podtypach. Koniec 5' rejonu preS1 w podtypach adw, adr i ayr zawiera sekwencję złożoną z dodatkowych 12 lub 33 pz w porównaniu z podtypem ayw. Ośmionukleotydomowa sekwencja o charakterze prostego powtórzenia (DR) znajdująca się na końcach tej dodatkowej sekwencji ulega prawdopodobnie delekcji lub insercji. N-koniec białka L kodowanego przez wszystkie trzy rejony ORF preS/S zawiera w stosunku do białka M dodatkowo 108-119 aminokwasów.

ORF P znajduje się pomiędzy 2309 i 1625 nukleotydem genomu HBV. Koduje ona polimerazę wirusa o właściwościach odwrotnej transkryptazy. Jest to białko o masie cząsteczkowej 92 kd złożone z 822aa, o wysokiej zawartości reszt histydynowych.

ORF X zlokalizowana pomiędzy 1376 i 1840 nukleotydem genomu HBV koduje białko składające się z 145aa mające właściwości transaktywatora.

### III-2. Elementy regulatorowe w genomie HBV

Regulacja ekspresji HBV zależy bezpośrednio od czterech elementów promotorowych. Promotor rdzeniowy ulokowany jest bezpośrednio przed ORF C i odpowiada za powstanie transkryptu o długości 3,5 kb, który kończy się pojedynczym miejscem poliadenylacji [27]. Sygnał poliadenylacji, wspólny dla wszystkich rodzajów m-RNA, ulokowany jest w genie C między nukleotydami 1919 a 1962.

Produkty transkrypcji wszystkich promotorów

HBV mają zatem taki sam koniec 3'. Charakterystyczną cechą syntezy transkryptu o długości 3,5 kZ jest „ignorowanie” przez aparat transkrypcyjny miejsca poliadenylacji, które napotyka po inicjacji syntezy RNA w obrębie sekwencji pre-C [28]. 3,5 kZ RNA służy jako pregenomowa matryca dla odwrotnej transkryptazy przy syntezie nici (-). W procesie translacji służy jako m-RNA kodujący produkt genu P oraz, ze względu na mikroheterogenność na końcu 5', antygeny HBcAg i HBeAg [29, 30]. W przeciwieństwie do odwrotnej transkryptazy retrowirusów produkt genu P w HBV powstaje niezależnie od produktu genu C bez tworzenia pierwotnego białka fuzyjnego [24]. Kodon ATG dla genu P znajduje się w rejonie nakładania się ORF C i ORF P.

Promotor rdzeniowy jest bardzo aktywny transkrypcyjnie, co wydaje się zrozumiałe ze względu na znaczenie kontrolowanych przez niego transkryptów i polipeptydów w cyklu życiowym wirusa. Jest on aktywowany przez wątrobowospecyficzne czynniki oddziałujące poprzez wirusową sekwencję wzmacniającą (*enhancer*) [31, 32]. W obrębie sekwencji promotorowej znaleziono sekwencje nukleotydowe stanowiące miejsca wiązania komórkowych czynników transaktywujących, jak wątrobowy białkowy czynnik C/EBP [33].

Promotor HBs znajduje się w ORF dla białek otoczki przed miejscem startu translacji białka M [34]. Sekwencja tego promotora przypomina sekwencję późnego promotora wirusa SV40. Promotor kieruje syntezą RNA o długości 2,1 kZ. W związku z mikroheterogennością na końcu 5' transkrypt ten kodować może zarówno białko M jak i S. Jak wykazano, białka M i S mogą ulegać ekspresji pod kontrolą własnego lub heterogennego promotora w wielu liniach komórkowych. Synteza 2,1 kZ RNA jest więc w dużym stopniu niezależna od czynników wątrobowospecyficznych [35]. Badając złożony proces regulacji syntezy 2,1 kZ RNA w liniach komórkowych HepG2 i Huh7 wykazano oddziaływanie na promotor HBs sześciu czynników aktywujących i jednego czynnika hamującego transkrypcję [36].

W zakażonych komórkach wątrobowych 2,1 kZ RNA jest jednym z dwóch głównych wykrywanych transkryptów. Opowiedzialny jest za charakterystyczną nadprodukcję subwiralnych cząstek HBsAg o średnicy 22 nm.

Promotor preS1 o typowej sekwencji TATA zlokalizowany jest przed pierwszym kodonem ATG ORF preS/S i odpowiada za poziom syntezy 2,4 kZ RNA kodującego białko otoczki L. W porównaniu z promotorem rdzeniowym lub promotorem HBs jest mało aktywny [27]. Ze względu na ważną rolę białka L dla struktury całego wirionu [12] ekspresja genu preS1 podlega ścisłej regulacji. Dysregulacja aktywności promotora preS1 i w konsekwencji nadprodukcja białka L może być przyczyną chorób indukowanych przez HBV [37].

Wydatną ekspresję białka L *in vitro* obserwowano tylko w transfekowanych HBV liniach komórkowych ludzkiego hepatoma [10] i w transfekowanych komórkach HeLa. Nie zachodzi ona natomiast w mysich fibroblastach [38] lub w komórkach jajników chomika (CHO) [39]. Wskazuje to na zależność ekspresji od czynników komórkowo-specyficznych. Wykazano, że wątrobowy czynnik transkrypcyjny HNF1, który wpływa między innymi na poziom transkrypcji z promotora genu kodującego ludzką albuminę oddziałuje także na sekwencję promotorową białka L [40]. Prawdopodobnie ekspresja wszystkich genów regulowanych przez promotory zawierające miejsce wiązania HNF1 jest wątrobowo-specyficzna.

Promotor genu X jest mało aktywny transkrypcyjnie również *in vivo*. Transkrypt specyficzny dla genu X, czyli RNA o długości 0,8 kZ reprezentuje mniej niż 1% całego RNA obecnego w zakażonej wątrobie [41]. Analiza produktów transkrypcji genomu HBV uzyskanych w hodowli komórkowej wykazała obecność transkryptu o długości 3,9 kZ zawierającego dwie kopie sekwencji gen X. Synteza tego transkryptu inicjowana jest również przez promotor genu X [42].

Kluczowymi elementami regulatorowymi wszystkich znanych wirusów i większości genów komórkowych są elementy wzmacniające (*enhancers*). W genomie HBV element wzmacniający znaleziono pomiędzy ORF S i ORF X to jest pomiędzy 1074 a 1234 nukleotydem [43]. Element wzmacniający wirusa HBV jest aktywny przede wszystkim w komórkach wątrobowych. W połączeniu z promotorem genu rdzeniowego jest ściśle tkankowo specyficzny. Element wzmacniający HBV zawiera miejsca wiążące dla przynajmniej czterech różnych czynników komórkowych: E, TGT3, EP i NF1 [31]. Wszystkie te miejsca działają synergistycznie, ale element przyłączający czynnik EP ma szczególne znaczenie dla funkcjonowania całego kompleksu wzmacniającego [44]. Badanie wpływu czynnika C/EPB, którego działanie na promotor genu C poznano wcześniej wykazało, że w niskich stężeniach wiąże się on z miejscem E aktywując *enhancer*, natomiast w wyższych stężeniach, poprzez wiązanie się z kolejnym miejscem — EP, hamuje działanie sekwencji wzmacniającej. Wykryto także drugi element wzmacniający w genomie HBV - ENH II [45]. Występuje on pomiędzy nukleotydami 1636 a 1741. Stwierdzono, że ENH II stymuluje aktywność transkrypcyjną obu promotorów genu preS/S.

W rejonie genu S, między nukleotydem 351 a 368 zidentyfikowano również element odpowiadający na działanie glukokortykoidów (GRE) [46]. Wcześniej już zaobserwowano, że u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B, którzy poddawani byli leczeniu kortykosteroidami znacznie podnosi się poziom produktów genów HBV. Wykazano, że podanie glukokortykoidów zwiększa ekspresję HBsAg u transgenicznym myszy [47]. Badanie wpływu kortykosteroidów na komórki ludzkiej hepatotoblastomy



transfekowane DNA HBV otrzymanym techniką rekombinacyjną wykazały wzrost ilości HBsAg, HBeAg i wirusowego DNA w następstwie stymulacji transkrypcji [48].

### III-3. Proces replikacji HBV

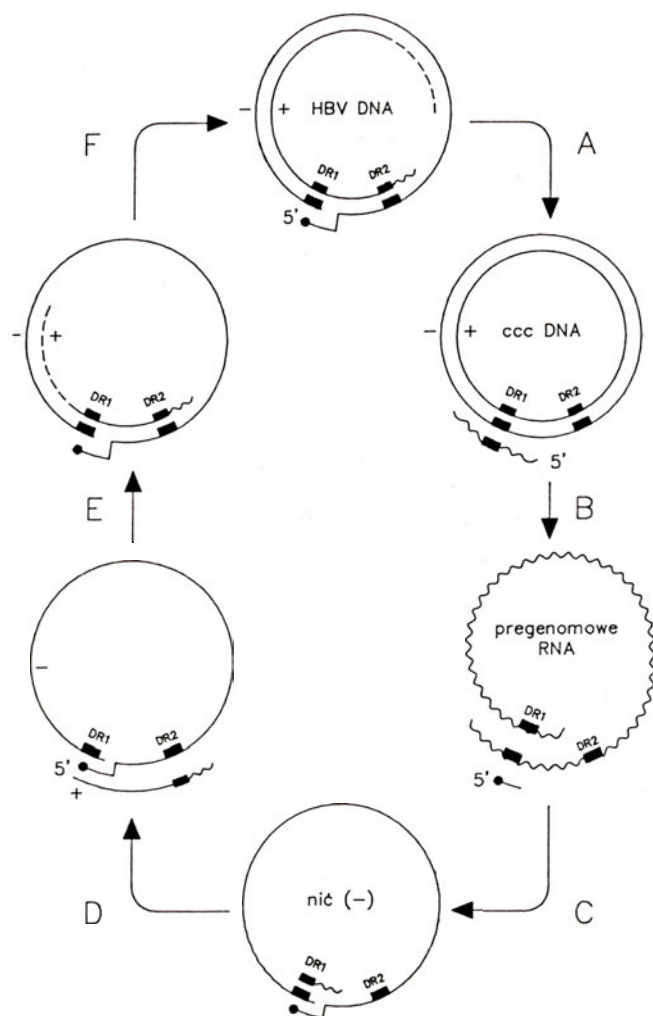
Na niezwykłość replikacji u wirusów *Hepadna* zwrócono uwagę ze względu na widoczną asymetryczność nici DNA w cząstce Dane'a. Badania wewnątrzcząsteczkowych form wirusowego DNA wykazały jeszcze jedną istotną asymetrię [49]. Zakażone hepatocyty zawierały duże ilości nici (-) o długości mniejszej niż 3200 zasad, przy czym część z nich nie była sparowana z nimi (+). Te asymetryczne formy, których obecność nie daje się wyjaśnić za pomocą klasycznego semikonserwatywnego mechanizmu replikacji, zlokalizowane są w wirusowych nukleokapsydach w cytoplazmie i stanowią produkty pośrednie innego typu replikacji [28].

Porównania komputerowe przewidywanej sekwencji aminokwasowej najdłuższej ORF w genomie HBV z sekwencją odwrotnej transkryptazy retrowirusów wykazały ścisłą homologię, co potwierdza tezę, że wirusy *Hepadna* są odpowiedzialne za syntezę własnej zależnej od DNA polimerazy RNA [50].

Główne etapy replikacji są wspólne dla genomów wszystkich wirusów *Hepadna* [51]. Pierwszym z nich jest przekształcenie asymetrycznych cząsteczek DNA obecnych w wirionach w kowalencyjnie zamknięte koliste cząsteczki DNA (Rys. 4) zlokalizowane w jądrach zakażonych hepatocytów. Drugim etapem jest transkrypcja tego DNA przez pochodzącą z komórki gospodarza polimerazę RNA II w celu utworzenia matrycowego RNA (pregenom) dla odwrotnej transkryptazy i połączenie pregenomu z białkiem rdzeniowym wirusa. Trzeci etap to synteza (-) nici DNA przez kopiowanie pregenomowego RNA przy udziale białkowego primera. Etap czwarty to synteza nici (+) przez kopiowanie nici (-) przy udziale oligonukleotydu RNA jako primera.

Po wnikięciu wirusa do hepatocytu syntetyzowana jest nić (+). Prowadzi do utworzenia kowalencyjnie zamkniętej kolistej cząsteczki DNA (ccc DNA). Przenosi się ona do jądra hepatocytu i służy tam jako matryca transkrypcyjna dla komórkowej polimerazy II do syntezy pregenomowego RNA oraz m-RNA [34]. Stwierdzono, że spośród wszystkich rodzajów cząsteczek RNA występujących w zakażonych wirusem HBV hepatocytach tylko RNA o długości 3,5 kb może pełnić rolę pregenomu. Jego długość przekracza jednostkową długość genomu dzięki obecności ok. 120 nukleotydów na końcu 5'. Pregenomowy RNA jest transportowany do cytoplazmy, gdzie razem z nowo syntetyzowaną polimerazą wirusową i białkiem primerowym tworzy kompleks z cząsteczkami białka rdzeniowego [27]. Badanie replikacji w stabilnym systemie ekspresji (komórki HepG2 transfekowane DNA pochodzącym z HBV) wykazały, że ten etap

replikacji jest silnie hamowany przez interferon (INF $\alpha$  i INF $\beta$ ) [52].



Ryc. 4. Cykl replikacyjny HBV składa się z trzech zasadniczych faz: transkrypcji, odwrotnej transkrypcji i replikacji DNA. Poszczególne etapy to: A — tworzenie kolistej cząstki DNA, B — transkrypcja nici (-), C — odwrotna transkrypcja prowadząca do odtworzenia nici (-) z równoczesną degradacją pregenomowego RNA, D — przeniesienie pregenomowego RNA primera do obszaru DR2 i rozpoczęcie syntezy nici (+), E — wewnątrzcząsteczkowe „przełączenie” procesu replikacji nici (+) na rejon 3' nici (-), F — wydłużenie nici (+), tworzenie cząstki ccc DNA. Ryc. wykonano na podstawie danych pochodzących z [3], [28], [52].

Wewnątrz powstałych cząstek syntetyzowana jest przez odwrotną transkryptazę minusowa nić DNA. Proces ten inicjowany jest w sekwencji DR1 przy 3' końcu matrycy RNA a jako primer służy w nim białko pochodzące z N-końcowej części produktu białkowego ORF P [51]. Podczas gdy koniec 3' nici DNA ulega wydłużaniu pregenomowe RNA jest stopniowo hydrolyzowane dzięki aktywności RNA-zy H charakterystycznej dla odwrotnej transkryptazy HBV [28]. Nowo utworzona nić (-) służy teraz jako matryca do syntezy nici (+). Primerem w tej syntezie jest krótki oligonukleotyd pochodzący z 5' końca pregenomowego RNA. Synteza nici plus rozpoczyna się w fragmencie DR2 i postępuje w kierunku końca 5' nici (-) na długości ok. 240 nukleotydów. Następnie, w wyniku



wewnątrzcząsteczkowego „przełączenia”, wydłużanie nici (+) odbywa się dzięki wykorzystaniu 3' końca nici (-) jako matrycy. Powoduje to przekształcanie liniowych form DNA w dwuniciowe cząsteczki koliste (oc).

Cząstki rdzeniowe, po opłaszczeniu przez białka powierzchniowe, wydzielane są na zewnątrz hepatocytów jako nowe pokolenie wirionów. Część cząstek rdzeniowych jest transportowana z powrotem do jądra, gdzie forma oc wirusowego DNA przekształcana jest w formę ccc, co wydatnie zwiększa pulę genomu HBV w komórce [53]. Po wielu takich cyklach (w zakażeniach chronicznych) wirusowe DNA może integrować się z genomem gospodarza. Towarzyszy temu często modulacja ekspresji zarówno genów wirusa jak i gospodarza [54].

Podobieństwo pomiędzy replikacją wirusów *Hepadna* i retrowirusów oraz uderzająca homologia pomiędzy konserwatywnymi rejonami ich genomów prowadzi do wniosku, że HBV i retrowirusy mogą mieć wspólne pochodzenie [55].

Artykuł otrzymano 8 grudnia 1992 r.  
Zaakceptowano do druku 25 marca 1993 r.

## Piśmiennictwo

- Shapiro CN, Margolis HS (1990) *Epidemiologic Reviews* **12**: 221-227
- Hollinger R (1990) red BN Fields, DM Knipe, Raven Press, Ltd. New York: 2171-2236
- Ganem D, Varmus HR (1987) *Annu Rev Biochem* **56**: 651-693
- Sureau C, Romet-Lemonne JL, Mullins JI, Essex M (1986) *Cell* **47**: 37-47
- Sells MA, Zelent AZ, Shvartsman M, Acs G (1988) *J Virol* **8**: 2836-2844
- Acs G, Sells MA, Purcell H, Engle R, Shapiro M, Popper H (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 4641-4644
- Sureau C, Eichberg JW, Hubbard GB, Romet-Lemonne JL, Essex M (1988) *J Virol* **8**: 3064-3067
- Sells MA, Chen ML, Acs G (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 1005-1009
- Gerber MA, Sells MA, Chen M-L, Thung SW, Tabibzadeh SS, Hood A, Acs G (1988) *Lab Invest* **59**: 173-180
- Omata M (1990) *Hepatology* **2**: 364-366
- Yoffe B, Burns DK, Bhatt HS, Combes B (1990) *Hepatology*
- Heerman K-H, Gerlich WH (1989) *Rheumatol Intern* **9**: 167-173
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M (1970) *Lancet* **1**: 695-698
- Tiollais P, Pourcel Ch, Dejean A (1985) *Nature (Lond)* **317**: 489-495
- Neurath AR, Jameson BA, Huima T (1987) *Microbiological Sci* **4**: 45-51
- Ueda K, Tsurimoto T, Matsubara K (1991) *J Virol* **65**: 3521-3529
- Stibbe W, Gerlich WH (1983) *J Virology* **46**: 626-628
- Valenzuela P, Gray P, Quiroga H, Zaldivar J, Goodman HM, Rutter WJ (1979) *Nature (Lond)* **280**: 815-819
- Pasek M, Goto T, Gilbert W, Zink B, Schaller H, Mackay P, Leadbetter G, Murray K (1979) *Nature (Lond)* **282**: 575-579
- Galibert F, Mandort E, Fitoussi F, Tiollais P, Charney P (1979) *Nature (Lond)* **281**: 646-650
- Okamoto H, Jmai M, Shimozaki M, Hoshi Y, Jzuka J, Goptanda T, Tsuda F, Miyakawa X, Mayumi M (1986) *J Gen Virol* **67**: 2305-2314
- Kajino K, Ohta Y, Miyamura T, Saito J (1991) *J Med Virol* **33**: 33-38
- Gerlich WH, Robinson WS (1980) *Cell* **21**: 801-809
- Schlicht H-J, Radziwill G, Schaller H (1989) *Cell* **56**: 85-92
- Spandau DF, Lee Ch-H (1988) *J Virol* **62**: 427-434
- Miller RH, Kaneko S, Chung CT, Citrones R, Purcell H (1989) *Hepatology* **9**: 322-327
- Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Buscher M, Sprengel R, Cattaneo R, Schaller H (1987) *J Virol* **61**: 904-911
- Summers J, Mason WS (1982) *Cell* **29**: 403-415
- Enders GH, Ganem D, Varmus HE (1985) *Cell* **42**: 297-308
- Ou J, Laub O, Rutter WJ (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 1578-1582
- Ben Levy R, Faktor O, Berger I, Shaul Y (1989) *Mol Cell Biol* **9**: 1804-1809
- Patel NU, Jameel S, Isom H, Siddiqui A (1989) *J Virol* **63**: 5293-5301
- Lopez-Cabrera M, Letovsky J, Hu K-Q, Siddiqui A (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5069-5073
- Rall LB, Standing DN, Laub O, Rutter WJ (1983) *Mol Cell Biol* **3**: 1766-1773
- Neurath AR, Thanavala Y (1990) red MH V Van Regenmortel, AR Neurath, Elsevier Science Publishers BV: 403-458
- Raney AK, Millich DR, McLachlan A (1991) *J Virol* **65**: 4805-4811
- Chisari FV, Filippi P, Buras J, McLachlan A, Poper H, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 6909-6913
- Marquardt O, Heermann K-H, Seifer M, Gerlich WH (1987) *Arch Virol* **96**: 249-256
- Michel M-L, Pontisso P, Sobczak E, MacPeece Y, Streeck RE, Tiollais P (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 7708-7712
- Raney AK, Easton AJ, Milich DR, McLachlan A (1991) *J Virol* **65**: 5774-5781
- Kaneko S, Miller RH (1988) *J Virol* **62**: 3979-3984
- Guo W, Wang J, Tam G, Yen TSB, Ou J (1991) *Virology* **181**: 630-636
- Shaul Y, Rutter WJ, Laub O (1985) *EMBO J* (4): 427-430
- Dikstein R, Faktior O, Ben-Levy R, Shaul Y (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 3683-3689
- Yuh Ch-H, Ting L-P (1990) *J Virol* **64**: 6141-6147
- Tur-Kaspa R, Burk RD, Shaul Y (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 1627-1637
- Yamamura K, Araki K (1989) *Cell Struct Funct* **14**: 509-513
- Tur-Kaspa R, Laub O (1990) *J Hepatol* **11**: 34-36
- Miller RH, Marion PL, Robinson WS (1984) *Virology* **139**: 64-72
- Toh H, Hayashida H, Miyata T (1983) *Nature (Lond)* **305**: 827-829
- Seeger C, Ganem D, Varmus HE (1986) *Science* **323**: 477-484
- Hayashi Y, Koike K (1989) *J Virol* **63**: 2936-2940
- Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J (1986) *Cell* **47**: 451-460
- Slagle BL, Zhou Y-Z, Butel JS (1991) *Cancer Research* **51**: 49-54
- Miller RH (1988) *Virology* **164**: 147-155

# Białka jedwabiu *B. mori* — charakterystyka, biosynteza i regulacja ekspresji genów

## Silk proteins of *B. mori* — description, biosynthesis and regulation of gene expression

BARBARA KŁUDKIEWICZ<sup>1</sup>  
KRYSTYNA GRZELAK<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Gruczoł przedny — funkcja i budowa
- II. Białka jedwabiu
  - II-1 Fibroina
  - II-2 Białko P<sub>25</sub>
  - II-3 Serycyny
- III. Biosynteza fibroiny
  - III-1 Zaopatrzenie w aminokwasy
  - III-2 mRNA fibroiny
  - III-3 Gen fibroiny
- IV. Biosynteza białka P<sub>25</sub>
  - IV-1 mRNA białka P<sub>25</sub>
  - IV-2 Gen białka P<sub>25</sub>
- V. Biosynteza serycyn
  - V-1 mRNA serycyn
  - V-2 Geny serycyn
- VI. Czynniki regulujące syntezę białek jedwabiu

### Contents:

- I. Silk gland — function and structure
- II. Silk proteins
  - II-1 Fibroin
  - II-2 Protein P<sub>25</sub>
  - II-3 Sericin
- III. The biosynthesis of fibroin
  - III-1 Supply of amino acids
  - III-2 Fibroin mRNA
  - III-3 Fibroin gene
- IV. The biosynthesis of P<sub>25</sub> protein
  - IV-1 P<sub>25</sub> protein mRNA
  - IV-1 P<sub>25</sub> protein gene
- V. The biosynthesis of sericin
  - V-1 Sericin mRNA
  - V-2 Sericin genes
- VI. Factors controlling the synthesis of silk proteins

Wykaz stosowanych skrótów: Gly — glicyna; Ala — alanina; Ser — seryna; Tyr — tyrozyna; G — guanozyna; C — cytydyna; A — adenozylna; T — tymidyna; pz — pary zasad; kpz — tysiąc par zasad; kD — kilodalton; Py — pirymidyna; poli A<sup>+</sup> RNA — poliadenylowany RNA; FmRNA — mRNA fibroiny; M.cz. — masa cząsteczkowa.

### I. Gruczoł przedny — funkcja i budowa

Najbardziej znanym owadem snującym jedwab z rodziny *Lepidoptera* jest jedwabnik morowy *B. mori*. Jego jedwab wykorzystuje się do celów przemysłowych. *B. mori*, znany od ponad 4000 lat, jest owadem w pełni udomowionym. Obecnie nie występuje w stanie dzikim. Jest typowym monofagiem, którego gąsienice żywią się jedynie liśćmi morwy białej. Rozwój jedwabnika morowego obejmuje 4 stadia: jaja, larwy, poczwarki i dorosłego owada. Stadium larwalne dzieli się na 5 okresów. Pod koniec ostatniego, V stadium, które trwa 8 dni, owady rozpoczynają snucie kokonu. Głównym składnikiem kokonu jest fibroina, która stanowi 70-80% wszystkich białek. Udział serycyn jest znacznie mniejszy, około 20-30%. Pozostałe składniki to: substancje woskowe nieorganiczne, barwiące oraz węglany [1]. Synteza białek oprzędu przebiega w gruczole przednym owada, będącym odpowiednikiem przetransformowanych gruczołów śliniankowych. Jest to parzysty organ, w którym pod względem morfologicznym i funkcjonalnym można wyróżnić 3 części:

- długą i wąską część tylną, gdzie zachodzi synteza głównego białka jedwabiu fibroiny i związanego z nią niskocząsteczkowego białka o m.cz. 25 kKD-białko P<sub>25</sub> [2, 3].
- część środkową — miejsce syntezy serycyn. Białka, przesunięte z części tylnej, są tutaj oplatane serycynami i przechowywane w tej części gruczolu aż do momentu snucia kokonu [3, 4].
- część przednią — cienki kanał, przez który podczas snucia kokonu uwalnia się gotowa nić.

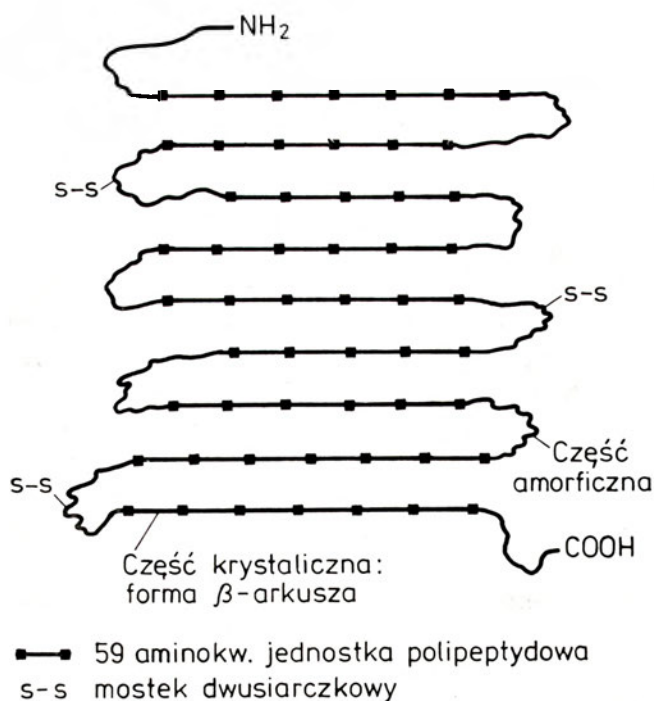
W ostatnim, V stadium larwalnym, obserwuje się bardzo gwałtowne zmiany strukturalne i biochemiczne komórek gruczolu przedniego. Waga gruczolu zwiększa się 20-krotnie, podczas gdy waga ciała w tym czasie wzrasta tylko 6-krotnie [5]. Następuje też znaczny wzrost ilości DNA, RNA i białek. [6]. Po zakończeniu snucia kokonu, podczas metamorfozy dorosłej larwy w poczwarkę, gruczoł przedny ulega degeneracji i autolizie.

<sup>1</sup> inż., <sup>2</sup> dr, Zakład Biochemii Porównawczej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

## II. Białka jedwabiu

### II-1. Fibroina

Fibroina jest dużym, nierozpuszczalnym polipeptydem o m.c.z.  $370 \pm 20$  kD [2, 7, 8]. Zawiera ona 4700-5000 reszt aminokwasowych, głównie glicyny, alaniny, seryny i tyrozyny. Stanowią one około 90% wszystkich reszt aminokwasowych tego białka [2, 3, 7, 8]. W fibroinie wyróżnić można dwa obszary: krystaliczny i amorficzny [9,10] (Rys. 1). Część krystaliczna, nierozpuszczalna, składa się z około 50-ciu powtarzających się jednostek polipeptydowych o długości 59 reszt aminokwasowych i sekwencji: Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Ala-Gly-(Ser-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly)<sub>8</sub>-Tyr [11]. Powtarzający się heksapeptyd uczestniczy w stabilizacji struktury fibroiny. Region amorficzny, rozpuszczalny, jest mieszaniną peptydów długości 3-35 reszt aminokwasowych, w których glicyna, dominujący aminokwas (40%), występuje w połączeniu głównie z alaniną, rzadziej waliną, proliną czy tyrozyną [12]. Łańcuchy polipeptydowe fibroiny mogą występować w dwóch odmiennych konformacjach. Łańcuch fibroiny, obecny w kokonie, tworzy tzw. formę  $\beta$ -arkusza, w której równoległe łańcuchy polipeptydowe połączone są poprzecznymi wiązaniami wodorowymi (Ryc. 1). Wiązania te nadają takiej strukturze dużą trwałość. Odmienna konformacja fibroiny, znana jako "silk I" czy " $\alpha$ -silk", jest stosunkowo słabo poznana. Opiera się ona na  $\alpha$ -heliksie, jest mniej stabilna i prawdopodobnie w takiej formie występują łańcuchy polipeptydowe fibroiny w gruczole przednim [9].



Ryc. 1. Model łańcucha fibroiny *B. mori* tworzący tzw. formę  $\beta$ -arkusza, wg. [10], zmodyfikowane.

### II-2. Białko P<sub>25</sub>

Niskocząsteczkowe białko jedwabiu *B. mori* o m.c.z. 25 kD (P<sub>25</sub>), syntetyzowane w tylnej części gruczolu przedniego [2, 3, 13], związane jest z fibroiną wiązaniami S-S [14]. Białko to różni się składem aminokwasowym od fibroiny. W białku P<sub>25</sub> zawartość glicyny i alaniny jest stosunkowo niska (14,7% i 13,2%) w porównaniu z fibroiną (46,1% i 31,6%), natomiast jest ono bogate w aminokwasy kwaśne i hydrofobowe, takie jak: kwas glutaminowy, fenyloalanina, prolina, cysteina, walina i leucyna [12, 15, 16]. Funkcja białka P<sub>25</sub> nie jest znana. Przypuszczalnie bierze ono udział w stabilizacji cząsteczki fibroiny [3].

### II-3. Serycyny

Serycyny syntetyzowane specyficjnie przez komórki środkowej części gruczolu przedniego [17], stanowią mieszaninę 3-4 większych i kilku mniejszych polipeptydów, o m.c.z. od 60 do 400 kD [3, 8, 18]. Charakteryzują się wysoką zawartością seryny, od 16 do 42% [8]. G a m o i w s p. [8] analizując białka pochodzące z różnych regionów części środkowej gruczolu wykazali obecność trzech większych (s-1; s-2 i s-3) i dwóch mniejszych (s-4 i s-5) białek. Serycyny s-2 i s-5 o m.c.z. 177 i 133 kD wydzielane są przez komórki przedniego regionu części środkowej gruczolu. Serycyny s-1 i s-3 o m.c.z. odpowiednio 305 i 140 kD syntetyzowane są w środkowym, a serycyny s-4 o m.c.z. 80 kD w końcowym regionie części środkowej gruczolu. Skład aminokwasowy czterech polipeptydów (s-1; s-2; s-3 i s-4) jest podobny. W każdym z nich dominującymi aminokwasami są: seryna, glicyna i kwas asparaginowy. Jedynie serycyna s-5 zawiera o połowę mniej reszt serynowych w porównaniu z pozostałymi, podczas gdy zawartość glicyny i kwasu asparaginowego jest podobna [18]. Serycyny *B. mori* są glikoproteidami. Zawierają dwa typy jednostek oligosacharydowych: N-acetylgalaktozoaminy i galaktozy dołączone do seryny czy treoniny oraz N-acetylglikoaminy i mannozy związane z resztami asparaginowymi białka [19].

## III. Biosynteza fibroiny

### III-1. Zaopatrzenie w aminokwasy

Gruczoł przedni w pierwszych dniach ostatniego stadium larwalnego syntetyzuje niewielkie ilości białek jedwabiu. W tym okresie większość aminokwasów użytkowanych do syntezy białek pochodzi z pożywienia i pobierana jest z hemolimfy [20]. Gdy larwa przestaje żerować i rozpoczyna się snucie kokonu, synteza białek jedwabiu odbywa się głównie kosztem innych tkanek, np. jelita czy powłoki ciała [21]. Wewnątrzkomórkowa pula wolnych aminokwasów gruczolu przedniego *B. mori* nie jest dostatecznie bogata w takie aminokwasy jak glicyna, alanina, seryna czy



tyrozyna, które stanowią około 90% reszt aminokwasowych fibroiny [6]. Zawartość ich w tylnej części gruczołu przedniego pozwoliłaby na utrzymanie syntezy fibroiny jedynie przez 3 minuty [3]. Utrzymanie się puli wolnych aminokwasów w gruczole na stałym poziomie, podczas intensywnej syntezy białek, wskazuje na bardzo gwałtowny proces zarówno ich pobierania jak i zużytkowywania w syntezie białka [6]. Za wybór odpowiedniego aminokwasu wbudowywanego do łańcucha białkowego odpowiedzialne są zarówno transportujące RNA (tRNA), jak i aminoacylo-tRNA syntetazy. W tylnej części gruczołu przedniego *B. mori* ponad połowę całej puli tRNA stanowią: tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Ser</sup> oraz tRNA<sup>Tyr</sup> [3]. W ostatnim, V-tym stadium larwalnym, od momentu zaprzestania żerowania (4 dzień), do snucia kokonu (8 dzień) dwukrotnemu wzrostowi poziomu całkowitego tRNA w tylnej części gruczołu towarzyszy 8-krotny wzrost tRNA<sup>Ala</sup> i tRNA<sup>Gly</sup> [22]. Występuje tutaj zjawisko tzw. funkcjonalnego przystosowania populacji tRNA do składu aminokwasowego syntetyzowanego białka-fibroiny [3, 22-25]. Wzrost poziomu pewnych rodzajów tRNA w gruczole może być wynikiem zarówno selektywnej transkrypcji genów, jak też wybiórczego dojrzewania prekursorowych tRNA (pre-tRNA). Nie zużytkowywane w syntezie białka rodzaje tRNA ulegałyby gwałtownemu zanikowi [3, 24].

### III-2. mRNA fibroiny (FmRNA)

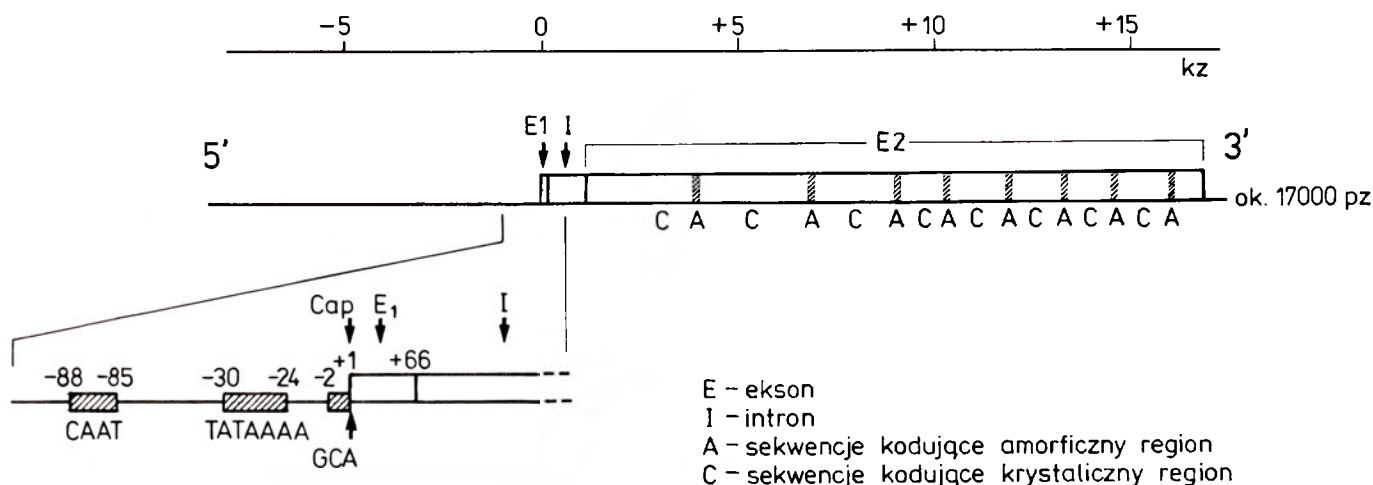
FmRNA został wyizolowany i częściowo zsekwencjonowany [26]. Sumę zawartości G i C w FmRNA określono na 59%, w tym guanina staowała 40% [26]. M.cz.FmRNA wg L i z a r d i e g o i w s p. [27] wynosi  $5,8 \times 10^6$  daltonów (około 16 000 nukleotydów). Ponieważ fibroina składa się z 4700-5000 reszt aminokwasowych [3, 7, 8] jej mRNA powinien zawierać około 15 000 nukleotydów. Tak więc FmRNA posiada nadmiar sekwencji w stosunku do ilości oczekiwanej a różnica ta spowodowana jest obecnością w cząsteczce mRNA obszarów niekodujących [2, 7, 27, 28]. 60% cząsteczek fibroinowego mRNA ma na 5' końcu

7-metyloguanozynę ( $m^7G$ ) i zmetylowane sąsiadujące nukleotydy, a więc strukturę kapturka (ang. cap) typu:  $m^7G^{(5')} ppp^{(5')} A^m p U^m p C p X p G p$  [29]. Pozostałe 40% zawiera niezmetrylowane nukleotydy na 5' końcu i strukturę:  $G_{ppp}^{(5')(5')} A_p P y_p X_p X_p G_p$  [30].

Do 3' końca FmRNA dołączony jest odcinek poli(A) o długości 100 nukleotydów [27]. Przylegający do segmentu poli(A) niekodujący fragment FmRNA, złożony z 34 nukleotydów, jest bogaty w reszty urydylowe i zawiera sekwencję-AAUAAA- [28]. Sekwencja ta jest prawdopodobnie sygnałem poliadenylacji [31]. S u z u k i i S u z u k i [32] badając zawartość FmRNA w rozwoju gruczołów przednich, wykazali nagromadzenie się mRNA w czasie kolejnych stadiów larwalnych. Pod koniec III-go, IV-go i V-tego (ostatniego) stadium larwalnego, gruczoły gromadzą FmRNA w ilościach odpowiednio: 0,2 µg; 2,0 µg i 170 µg/parę gruczołów. Podczas linienia synteza FmRNA zanika, a cząsteczki FmRNA ulegają całkowitej degradacji [32, 33]. Tak więc podczas rozwoju gruczołu zachodzi cykliczne włączanie i wyłączenie genu fibroinowego oraz degradacja dojrzałego mRNA w czasie kolejnych linek [13, 33].

### III-3. Gen fibroiny

Gen fibroiny (Ryc. 2) jest intensywnie badany od początku lat siedemdziesiątych, a na szczególną uwagę zasługują prace S u z u k i i w s p. [30, 34-36]. Gen ten składa się z ponad 17 000 par nukleotydów, a więc jest tylko nieznacznie większy (ok. 7%) od dojrzałego FmRNA [27, 37, 38]. Zawartość par G+C w genie fibroinowym wynosi 59-60% [37]. W genomie komórki gruczołów przednich gen fibroiny występuje w jednej kopii, co stanowi około 0,0022% całkowitej ilości genomowego DNA (0,5 pg DNA/genom) [34, 37, 39, 40]. DNA komórek gruczołów przednich podczas kolejnych stadiów rozwoju podlega około siedemnastu cyklom replikacyjnym bez podziału komórkowego [5, 39]. W wyniku tej poliploidyzacji zawartość DNA w komórkach gruczołu w 3-cim, 4-tym dniu, V-tego



Ryc. 2. Schemat budowy genu fibroiny u *B. mori*. wg. [3, 30, 36, 41].

ostatniego stadium larwalnego osiąga wartość 0,2  $\mu\text{g}/\text{komórkę}$  (ok.  $4 \times 10^5$  kopii genu fibroiny/komórkę) [39]. Mimo, że udział genu fibroiny w całkowitym DNA komórek gruczołu jest niewielki, Oshima i Suzuki [35] otrzymali klony genu w plazmidzie pMB9. Jeden z tych klonów, pFb 29 z insertem o długości 21 kZ, zawiera cały gen fibroiny z flankującymi sekwencjami na obu końcach. Powtarzalne sekwencje, stanowiące rdzeń części kodującej (ok. 15 000 par nukleotydów), składają się z co najmniej 10 domen o dl. ok. 1-2 kZ, kodujących krótszymi (0,2 kZ) sekwencjami, kodującymi amorficzny obszar białka [41, 42]. Ten duży blok sekwencji oporny na działanie większości enzymów restrykcyjnych trawiony jest przez dwie endonukleazy: Alu I i Hpa II [41]. Natomiast miejsca rozpoznawane przez takie enzymy restrykcyjne jak: Pst I, Bg II, Hinf I, Hind III, Tag I znajdują się jedynie w pobliżu końców 5' i 3' genu fibroinowego [35, 36, 43].

Szczegółowo zbadano strukturę regionu 5' końca genu fibroiny [30, 36]. Miejsce startu transkrypcji (nukleotyd +1) zlokalizowano w sekwencji-GCA- [30]. Wspólną cechą wielu regionów promotorowych jest duży udział par A:T w ich składzie [44]. Wykazano, że sekwencje poprzedzające 5' koniec genu fibroiny (między -7 a -119 nukleotydem) są również b. bogate w pary A:T (ok. 75%) oraz zawierają liczne odcinki oligo(dA) i oligo(dT)[30]. W obszarze promotorowym genu fibroinowego wykazano obecność siedmionukleotydowej sekwencji -TATAAAA- (w pozycji -30 -24) podobnej do tzw. fragmentu Pribnowa -TAT<sub>6</sub>ATG- [45]. Przyjmuje się, że fragment Pribnowa, jest ogólnym sygnałem rozpoznawanym przez polimerazę RNA. Delecja sekwencji -TATA- (pozycja -30 -27) prawie całkowicie znosi transkrypcję, a bardzo niskiemu jej poziomowi towarzyszy błędne umiejscowienie miejsca startu transkrypcji [46]. Między nukleotydem -88 a -85 znajduje się sekwencja -CAAT- odpowiedzialna za podstawowy poziom transkrypcji [30, 36]. W odległości ok. 200 par nukleotydów na lewo od sekwencji -TATAAAA- w rejonie od -238 do -116 wykazano obecność sekwencji wzmacniających (ang. *enhancer*), które wpływają na wydajność transkrypcji niezależnie od odległości i orientacji w stosunku do miejsca startu transkrypcji [47]. Tsujimoto i Suzuki [30, 36] wykazali obecność w genie fibroiny długiej (~1,0 kZ) sekwencji interweniującej (inaczej intronu), która przerywa gen w miejscu oddalonym od końca 5' (na prawo) o ok. 70 par nukleotydów. Kopii tej sekwencji nie było w dojrzałym fibroinowym FmRNA, co świadczy, że jest ona wycinana podczas dojrzewania mRNA [48]. Powtarzalne sekwencje kodującego regionu genu, oddalone są od 5' końca genu o ok. 1 100 par nukleotydów. Sekwencje znajdujące się w rejonie połączenia sekwencji interweniującej i kodującej (intronu z eksonem) odgrywają ważną rolę w składaniu pierwotnego transkryptu genu fibroiny [36].

## IV. Biosynteza białka P<sub>25</sub>

### IV-1. mRNA białka P<sub>25</sub>

Analizując poliadenylowane RNA tylnej części gruczołu przedniego *B. mori*, w okresie intensywnej syntezy fibroiny, Couble i wsp. [49] wykazali obecność dwóch dominujących mRNA, które stanowiły ponad 80% puli całkowitego poli A<sup>+</sup> RNA. Jednym z nich był FmRNA, natomiast drugi został zidentyfikowany jako mRNA dla białka P<sub>25</sub> [13, 50]. Oba te mRNA występują w komórce w ilościach ekwimolarnych [13, 49]. M.c.z. mRNA białka P<sub>25</sub> wynosi 4,0-4,2  $\times 10^5$  daltonów (1 100-1 200 nukleotydów) [13, 51]. Tak więc messenger ten ma nadmiar sekwencji nukleotydowych (około 40%) w stosunku do wielkości syntetyzowanego białka, składającego się z 220 aminokwasów. Zmiany stężenia mRNA białka P<sub>25</sub> w czasie rozwoju gruczołów przednich *B. mori* są podobne do tych, które obserwowano w wypadku FmRNA [13, 32, 33, 51]. W stadium linienia synteza P<sub>25</sub>mRNA, podobnie jak FmRNA zanika, a 85% jego cząsteczek ulega degradacji. Śladowe ilości mRNA białka P<sub>25</sub> wykrywane wtedy w tylnej części gruczołu, wskazują na wyższą stabilność tego mRNA niż FmRNA, którego nie wykrywano w okresie linienia [13]. W piątym ostatnim stadium rozwoju, obserwowany jest wzrost zawartości mRNA białka P<sub>25</sub> w tylnej części gruczołu od ok. 2  $\mu\text{g}/\text{parę}$  gruczołów w 2 dniu do około 20  $\mu\text{g}/\text{parę}$  gruczołów w 6-7 dniu, tzn. w okresie snucia kokonu. Zdaniem Coubla i wsp. [13] duże nagromadzenie mRNA białka P<sub>25</sub>, podobnie jak FmRNA w piątym ostatnim stadium rozwoju gruczołu jest możliwe dzięki intensywnej transkrypcji i wysokiej stabilności tych mRNA podczas tego stadium.

### IV-2. Gen białka P<sub>25</sub>

Gen białka P<sub>25</sub> został sklonowany i całkowicie zsekwencjonowany [52, 53]. Składa się z 3485 par nukleotydów i podobnie jak gen fibroiny występuje w jednej kopii w genomie. Zawiera pięć bloków sekwencji kodujących -eksonów (5' E<sub>1</sub> - E<sub>5</sub> 3'), które przedzielone są sekwencjami interweniującymi, stanowiącymi aż ~60% całkowitej długości cząsteczki genu. Miejsce startu transkrypcji (nukleotyd +1) zlokalizowano w obrębie sekwencji -GCA- [52, 53]. W obrębie promotorowym genu na lewo od 5' końca zlokalizowano sekwencję -TATA- (-32, -29), miejsce rozpoznawane przez polimerazę RNA II, oraz sekwencję -CAAT- (-90, -87) która obecna jest również w podobnej pozycji w genie fibroinowym [52].

W odległości 23 par nukleotydów od miejsca startu transkrypcji w eksonie E<sub>1</sub> wykazano obecność odcinka DNA (+23, +74) niekomplementarnego z mRNA białka P<sub>25</sub>. Okazało się, że ten fragment DNA koduje peptyd sygnałowy obejmujący siedemnaście aminokwasów, w tym trzynaście o charakterze hydrofobo-

wym (z przewagą waliny i alaniny). Peptydy sygnałowe, odcinane podczas translokacji umożliwiają transport pozostałej części cząsteczki białka przez błonę szorstkiego reticulum endoplazmatycznego. Fragment DNA kodujący peptyd sygnałowy poprzedza sekwencja -CAAC- (+19, +22), która występuje również w genach serycynowych. Rola tej sekwencji nie jest znana, chociaż wykazano jej obecność w obszarze 5' końca wielu genów owadów [54]. W pobliżu 3' końca genu *P<sub>25</sub>* wykazano obecność sekwencji -AATAAA- (pozycja +3461, +3466) będącej sygnałem do poliadenylacji. Gen *P<sub>25</sub>* i gen fibroiny, znacznie różniące się strukturą, wykazują wysoki stopień homologii między sekwencjami flankującymi 5' końców obu tych genów [52].

## V. Biosynteza serycyn

### V-1. mRNA serycyn

W środkowej części gruczołu przedniego *B. mori*, wykazano obecność kilkunastu poliadenylowanych RNA o długości: 10,5; 9,0; 4,0; 2,8; 5,4; 3,1; 3,5; 2,95 i 0,45 kZ, kodujących białka typu serycyn [55-57]. Mesengery o długości 10,5; 9,0; 4,0 i 2,8 kZ transkrybowane są w postaci wspólnego wielkocząsteczkowego pre-mRNA, który następnie podlega zróżnicowanemu cięciu i składaniu. Gen kodujący ten duży transkrypt został określony jako *Ser-1* [56-58]. Informacyjne RNA kodowane przez gen *Ser-1* zawierają powtarzalną, sekwencję o długości 114 nukleotydów bogatą w kodony serynowe, oraz mają takie same sekwencje na 5' i 3' końcach cząsteczki [57]. Serycynowe mRNA o długości 5,4 i 3,1 kZ powstają również w wyniku zróżnicowanego cięcia i składania wspólnego transkryptu, produktu genu *Ser-2* [57]. Oprócz tych dwóch głównych „grup mRNA serycyn”, pozostałe trzy mRNA o długości 3,5; 2,95 i 0,45 kZ kodowane są przez różne geny określone jako *MSGs-3, 4 i 5* [59]. Serycynowe mRNA są syntetyzowane podczas kolejnych stadiów larwalnych natomiast w okresie linienia synteza zanika [60]. W V-tym, ostatnim stadium rozwoju, następuje znaczny wzrost zawartości tych mRNA osiągający poziom maksymalny ok. 5-tego dnia rozwoju. Z badań *Coubla i wsp.* [57] i *Michaille i w s p.* [56] wynika, że w różnych regionach środkowej części gruczołu przedniego są syntetyzowane określone rodzaje serycynowych mRNA. W przedniej części następuje synteza mRNA kodowanych przez gen *Ser-2* i *MSGs-4*, w środkowej przez gen *Ser-1* i *MSGs-3*, natomiast w tylnej części syntetyzowane są krótkie mRNA. Synteza tych mRNA zależy nie tylko od umiejscowienia komórek syntetyzujących je w gruczole, lecz również od stadium rozwoju gruczołu.

### V-2. Geny serycyn

Geny serycynowe *Ser-1*, *Ser-2*, *MSGs-3, 4 i 5* zostały

sklonowane i częściowo zsekwencjonowane [56, 59, 61]. Najlepiej poznano strukturę genu *Ser-1* kodującego cztery mRNA [56, 61]. Gen ten składa się z 24 000 par nukleotydów. Podobnie jak gen białka *P<sub>25</sub>* [52] i gen fibroiny [39, 40] występuje w genomie w jednej kopii [56]. Gen *Ser-1* składa się z co najmniej 5 odcinków kodujących, które są przedzielone intronami [61]. Miejsce startu transkrypcji zlokalizowano w obrębie sekwencji -GCATAGT-. Sekwencję -GCA- można odnaleźć w miejscu startu transkrypcji genu fibroiny [30] i genu białka *P<sub>25</sub>* [52]. Sekwencja -TATAAAA-, podobna do tzw. fragmentu Pribnowa została zlokalizowana między nukleotydami -30, a -24 i znajduje się w identycznej pozycji jak w genie fibroiny [30]. W pozycji -90 do -86 genu *Ser-1* wykazano obecność sekwencji -CAAAT-, która wykazuje duże podobieństwo do sekwencji -CAAT- występującej w genie fibroiny w pozycji -88 do -85 [30, 36], a w genie *P<sub>25</sub>* -90 do -87 [52]. Wykazano znaczny stopień homologii między sekwencjami flankującymi 5' końców genów *Ser-1* i fibroiny [61]. Gen *Ser-2* o długości 16 200 par nukleotydów kodujący dwa mRNA, podobnie jak gen *Ser-1* występuje w genomie w jednej kopii [57]. Został on sklonowany, jednak jego struktura nie jest jeszcze znana [52] podobnie jak pozostałych genów serycyn: *MSGs-3, 4 i 5* [59].

## VI. Czynniki regulujące syntezę białek jedwabiu

Przedstawione wyżej dane wskazują, że geny kodujące białka jedwabiu, różne strukturalnie, mogą mieć wspólne mechanizmy regulacyjne, o czym świadczy bardzo wysoki stopień homologii flankujących sekwencji na końcach 5' tych genów. Szczegółowe badania strukturalne regionów końca 5' genów fibroiny, białka *P<sub>25</sub>* i *Ser-1* prowadzone przez *Hui i w s p.* [62] potwierdzają tę hipotezę. W obrębie proksymalnych sekwencji promotorowych (do ~100 par nukleotydów na lewo od miejsca startu transkrypcji) genu fibroiny, *P<sub>25</sub>* i *Ser-1* wykazano obecność sekwencji o wspólnym rdzeniu: -A/TGTTT- które znajdują się w pozycjach: dla genu fibroinowego -41 TCGAGTTTTGAC -52; i -80 AGATGTTTATTC -69; genu *Ser-1* -101 CATTGTTTGAC -89; genu *P<sub>25</sub>* -89 AATTGTTTCCAC -78, [62, 63].

Sekwencje te może rozpoznawać białkowy czynnik SGF-1 pochodzący z ekstraktów komórkowych tylnej części gruczołów przednich *B. mori* [62]. Wiązanie się czynnika SGF-1 z tymi sekwencjami DNA wykazano dla genu fibroiny i *Ser-1*. Ponieważ w regionie promotorowym genu białka *P<sub>25</sub>* jak również genu fibroiny *Antheraea yamamai* [62], znaleziono podobne sekwencje, wydaje się bardzo prawdopodobne, że czynnik SGF-1 odgrywa znaczącą rolę w ekspresji genów białek jedwabiu. W odległości ponad 100 par nukleotydów od miejsca startu transkrypcji genu fibroiny,



*Ser-1* i białka  $P_{25}$  wykazano obecność powtarzających się sekwencji bogatych w pary A+T o wspólnym rdzeniu -TAAT- i długości 10 pz. Sekwencje te wykazują duże podobieństwo do sekwencji największej zgodności (ang. *consensus sequence*) -TCAATTAAAT- wiążącej białka kodowane przez odcinki mRNA zwane homeoboks (ang. *homeobox*) [62, 64]. Znalezione je w wielu genach np. u *Drosophila*. Wykazano, że białka *Drosophila* kodowane przez homeoboks, tzw. białka ZEN i EVE [65, 66], są wiązane przez sekwencje o rdzeniu -TAAT- genów fibroiny i *Ser-1*. Według Hui i wsp. [62] geny kodujące białka jedwabiu mogą stanowić grupę genów specyficznie reagujących z niektórymi białkami kodowanymi przez homeoboksy. Wykazano, że sekwencje o rdzeniu -TAAT- mogą być również rozpoznawane przez białkowe czynniki z ekstraktów zarówno tylnej, jak i środkowej części gruczołów *B. mori*, określane jako SGF-2; SGF-3 i SGF-4. Do ich wiązania się z DNA konieczna jest obecność segmentu -TAAT- [62, 64]. Dopiero dalsza charakterystyka tych czynników pozwoli na określenie ich roli w ekspresji genów białek jedwabiu. Z badań Hui i wsp. [62] można wnioskować, że homologiczne sekwencje wykrywane w flankujących regionach 5' końców genów fibroiny, *Ser-1* i białka  $P_{25}$  mogą być odpowiedzialne za wspólną i zsynchronizowaną ekspresję tej grupy genów. W komórkach *Eukaryota* opisano szereg genów, których regulacja aktywności zachodzi pod wpływem hormonów [67, 68]. Są dane wskazujące, że może to również dotyczyć genów kodujących białka jedwabiu [58, 60, 69]. W rozwoju osobniczym owadów główną rolę odgrywają dwa hormony: ekdyzon i hormon juvenilny (JH). JH należy do grupy izoprenoidów, natomiast ekdyzon jest związkiem steroidowym. Ekdyzon jest przekształcany w tkankach owada do 20-hydroksyekdyzonu, który jest bardziej aktywną formą hormonu. Badania Akai i wsp. [69] i Garella [70] wskazują, że snucie jedwabiu kontrolują hormony. Podanie larwie *B. mori* JH w początkowym okresie V-tego stadium larwalnego powoduje spowolnienie procesów replikacji, transkrypcji i translacji w gruczole przednim, a w konsekwencji wydłużenie stadium larwalnego i wzrost produkcji jedwabiu o około 30%. 20-hydroksyekdyzon podany larwie w początkowym okresie V-tego stadium powoduje znaczne obniżenie zawartości mRNA serycynowych i fibroiny [59]. Spadek zawartości tych mRNA w normalnym rozwoju obserwuje się wtedy, gdy miano endogennego hormonu jest wysokie. Badania Tripoulosa i Samolsa [59] wskazują, że egzogeny 20-hydroksyekdyzon może wpływać na przebieg cięcia i składania transkryptów kodujących serycyny. Tak więc hormony mogą być jednym z czynników regulujących ekspresję genów kodujących białka jedwabiu.

Artykuł otrzymano 8 marca 1993 r.  
Zaakceptowano do druku 22 marca 1993 r.

## Piśmiennictwo

1. Tazima Y (1964) W: The Genetics of the Silkworm London: Logos Press and Academic Press, str 253
2. Tashiro Y, Otsuki E, Shimadzu T (1972) *Biochim Biophys Acta* **257**: 198-209
3. Prudhomme J-C, Couble P, Garel J P, Daillic J (1985) W: Kerkut G A, Gilbert L J (red) Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology t 10. Pergamon Press, str 571-594
4. Fukuda T, Suto M, Nakagawa Y (1960) *Bull Agr Chem Soc Japan* **24**: 501-505
5. Tashiro Y, Morimoto T, Matsuura S, Nagata S (1968) *J Cell Biol* **38**: 574-588
6. Prudhomme J-C, Couble P (1979) *Biochimie* **61**: 215-227
7. Sprague K U (1975) *Biochemistry* **14**: 925-931
8. Gamo T, Inokuchi T, Laufer H (1977) *Insect Biochem* **7**: 285-295
9. Lotz B, Cesari C (1979) *Biochimie* **61**: 205-214
10. Garel J-P, (1982) *Trends Biochem Sci* **7**: 105-108
11. Strydom D J, Haylett T, Stead R H (1977) *Biochim Biophys Res Commun* **3**: 932-938
12. Shimura K (1983) *Experientia* **39**: 455-460
13. Couble P, Moine A, Garel A, Prudhomme A-C (1983) *Develop Biol* **97**: 398-407
14. Shimura K, Kikuchi Y, Katagata Y, Ohotomo K (1982) *J Ser Sci Japan* **51**: 20-26
15. Tokutake S (1980) *Biochem J* **187**: 413-417
16. Yamaguchi K, Kikuchi Y, Takagi T, Kikuchi A, Oyama F, Shimura K, Mizuno S (1989) *J Mol Biol* **210**: 127-139
17. Michaille J-J, Couble P, Prudhomme J-C, Garel A (1986) *Biochimie* **68**: 1165-1173
18. Gamo T (1982) *Biochem Genet* **20**: 165-177
19. Sinohara H (1979) *Comp Biochem Biophys* **63 B**: 87-91
20. Suzuki Y (1977) W: Beermann (red) Results and Problems in Cell Differentiation t. 8 Springer-Verlag, Berlin str. 1-44
21. Noguchi A, Takeshita H, Shigematsu H (1974) *J Insect Physiol* **20**: 783-794
22. Garel J-P, Mandel P, Chavancy G, Daillic J (1971) *FEBS Lett* **12**: 249-252
23. Garel J-P, Mandel P, Chavancy G, Daillic J (1970) *FEBS Lett* **7**: 327-329
24. Fournier A, Chavancy G, Garel J-P (1976) *Biochem Biophys Res Commun* **72**: 1187-1194
25. Chevallier A i Garel J-P (1979) *Biochimie* **61**: 245-263
26. Suzuki Y, Brown D D (1972) *J Mol Biol* **63**: 409-429
27. Lizardi P M, Williamson R, Brown D D (1975) *Cell* **4**: 199-205
28. Hagenbuchle O, Krikeles M S, Sprague K U (1979) *J Biol Chem* **254**: 7157-7162
29. Yang N-S, Manning R F, Gage L P (1976) *Cell* **7**: 339-347
30. Tsujimoto Y, Suzuki Y (1979) *Cell* **16**: 425-436
31. Merregaert J, van Emmelo J, Devos R, Porter A, Fellner P, Fiers W (1978) *Eur J Biochem* **82**: 55-83
32. Suzuki Y, Suzuki E (1974) *J Mol Biol* **88**: 393-407
33. Maekawa H, Suzuki Y (1980) *Devel Biol* **78**: 394-406
34. Suzuki Y, Gage P, Brown D D (1972) *J Mol Biol* **70**: 637-649
35. Ohshima Y, Suzuki Y (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5363-5367
36. Tsujimoto Y, Suzuki Y (1979) *Cell* **18**: 591-600
37. Lizardi P M, Brown D D (1975) *Cell* **4**: 207-215
38. Szala S (1979) *Post Biochem* **25**: 469-499
39. Gage L P (1974) *J Mol Biol* **86**: 97-108
40. Gage L P, Manning R F (1976) *J Mol Biol* **101**: 327-348
41. Gage L P, Manning R F (1980) *J Biol Chem* **255**: 9444-9450
42. Manning R F, Gage L P (1980) *J Biol Chem* **255**: 9451-9457
43. Manning R F, Gage L P (1978) *J Biol Chem* **253**: 2044-2052
44. Breathnach R, Chambon P (1981) *Annu Rev Biochem* **50**: 349-383

45. Gilbert W (1976) W: Losick R i Chamberlin M (red) In RNA polymerase, Cold Spring Harbor Laboratory Press - New York, str 193-205
46. Tsujimoto Y, Hirose S, Tsuda M, Suzuki Y (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 4838-4842
47. Tsuda M, Suzuki Y (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 7442-7446
48. Tsuda M, Oshima Y, Suzuki Y (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4872-4876
49. Couble P, Garel A, Prudhomme J-C (1981) *Devel Biol* **82**: 139-149
50. Ohmachi T, Nagayama H, Shimura K (1982) *FEBS Lett* **146**: 385-388
51. Kimura K, Oyama F, Ueda H, Mizuno S, Shimura K (1985) *Experientia* **41**: 1167-1171
52. Couble P, Chevillard M, Moine A, Ravel-Chapuis P, Prudhomme J-C (1985) *Nucl Acids Res* **13**: 1801-1814
53. Chevillard M, Couble P, Prudhomme J-C (1986) *Nucl Acids Res* **14**: 6341-6342
54. Kozak M (1984) *Nucl Acids Res* **12**: 857-872
55. Ishikawa E, Suzuki Y (1985) *Dev Growth Differ* **27**: 73-82
56. Michaille J-J, Couble P, Prudhomme J-C, Garel A (1986) *Biochimie* **68**: 1165-1173
57. Couble P, Michaille J-J, Garel A, Couble M-L, Prudhomme J-C (1987) *Dev Biol* **124**: 431-440
58. Hamada Y, Yamashita O, Suzuki Y (1987) *Cell Differ* **20**: 65-76
59. Michaille J-J, Garel A, Prudhomme J-C (1989) *Insect Biochem* **19**: 19-27
60. Tripoulas N A, Samols D (1986) *Dev Biol* **116**: 328-336
61. Okamoto H, Ishikawa E, Suzuki Y (1982) *J Biol Chem* **257**: 15192-15199
62. Hui C-c, Matsuno K, Suzuki Y (1990) *J Mol Biol* **213**: 651-670
63. Matsuno K, Hui C-c, Takiya S, Suzuki T, Ueno K, Suzuki Y (1989) *J Biol Chem* **264**: 18707-18713
64. Hui C-c, Suzuki Y (1990) *J Mol Biol* **213**: 395-398
65. Hoey T, Levine M (1988) *Nature (Lond)* **332**: 858-861
66. Han K, Levine M, Manley J L (1989) *Cell* **56**: 573-583
67. Brunner G (1977) *Differentiation* **8**: 123-132
68. Yamamoto K R (1985) *Annu Rev Genet* **19**: 209-252
69. Akai H, Kiguchi K, Kobari Y, Shibukawa A (1981) W: Kloza M (red) Regulation of Insect Development and Behaviour, International Conference Karpacz, str 781-792, Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
70. Garel J P (1983) *Experientia* **39**: 461-466.

## Sekretja heterologicznych białek z *S. cerevisiae*

## Secretion of heterologous proteins by *S. cerevisiae*

BOŻENA REMPOŁA\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Drożdżowe wektory ekspresyjne
- III. Peptydy wyprowadzające
- IV. Czynniki płciowy  $\alpha$  — synteza, obróbka potranslacyjna
- V. Konstrukcja układów do sekrecji heterologicznych białek wykorzystująca wydzielniczy system czynnika  $\alpha$
- VI. Glikozylacja
- VII. Czynniki wpływające na wydajność sekrecji
  - VII-1. Wydajność ekspresji klonowanego genu
  - VII-2. Peptydy wyprowadzające
  - VII-3. Rodzaj wektora
  - VII-4. Szczepy drożdżowe
  - VII-5. Podłoża hodowlane
- VIII. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Yeast expression vectors
- III. Leaders
- IV. Mating  $\alpha$ -factor — synthesis, processing
- V. Construction of systems for secretion of heterologous proteins based on  $\alpha$ -factor
- VI. Glycosylation
- VII. Factors influencing the level of secretion
  - VII-1. The level of expression of the cloned gene
  - VII-2. Leaders
  - VII-3. Vectors
  - VII-4. Yeast strains
  - VII-5. Culture media
- VIII. Summary

### I. Wstęp

Drożdże *S. cerevisiae* od wielu lat uważane są za atrakcyjnego gospodarza dla produkcji heterologicznych białek tak w celach aplikacyjnych, jak i badawczych. Drożdże, podobnie jak bakterie, są organizmami jednokomórkowymi, łatwo poddają się manipulacjom genetycznym, hodowanie ich jest tanie, a tempo

\* mgr. Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Rakowiecka 36, 02-582 Warszawa

wzrostu stosunkowo szybkie. W odróżnieniu jednak od organizmów prokariotycznych, drożdże z ich eukariotyczną organizacją struktur i procesów komórkowych są zdolne do przeprowadzania postranslacyjnej obróbki i modyfikacji białek (glikozylacja, formowanie mostków dwusiarczkowych). Procesy te często są niezbędne do uzyskania aktywnych białek o natywnej strukturze przestrzennej. Wyodrębnienie i charakterystyka mutantów defektywnych w postranslacyjnej obróbce i sekrecji homologicznych drożdżowych białek wydzielniczych, takich jak inwertaza, fosfataza czy płciowy czynnik  $\alpha$ , umożliwiły poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za ich wydzielanie. Genetyczne i biochemiczne dane wykazują, że wewnątrzkomórkowy transport i sekrecja białek z *S. cerevisiae* zachodzi w sposób podobny do przebiegu tych procesów w komórkach wyższych eukariotów. Białka są transportowane przez błonę retikulum endoplazmatycznego i cysterny aparatu Golgiego [1], gdzie ulegają modyfikacjom, a następnie zamknięte w pęcherzykach wydzielniczych transportowane są do błony cytoplazmatycznej i po fuzji z nią uwalniane.

Postranslacyjna obróbka i modyfikacje zachodzące w trakcie transportu heterologicznych białek przez drożdżową „drogę wydzielniczą”, poza wpływem na strukturę przestrzenną, umożliwiają prawidłowe uformowanie aminowego końca rekombinacyjnych białek. Wydzielanie produktów ekspresji klonowanych genów na zewnątrz komórek może zapobiegać ich toksycznemu działaniu na komórki oraz zdecydowanie upraszcza procedury czyszczenia białek.

## II. Drożdżowe wektory ekspresyjne

Narzędziami umożliwiającymi ekspresję heterologicznych genów i sekrecję ich produktów są odpowiednie drożdżowe wektory ekspresyjne. Wektory te są konstruowane w oparciu o wektory drożdżowe dzielące się na dwie główne kategorie: 1) integracyjne, nie posiadające własnego replikonu i utrzymujące się w komórce dzięki integracji do chromosomu i 2) autonomiczne, replikujące się niezależnie do chromosomu. Wektory autonomiczne, najczęściej stosowane do konstrukcji drożdżowych wektorów ekspresyjnych dzieli się na: a) pochodzące od endogenego 2 $\mu$ m plazmidu drożdżowego (YEp-yeast episomal plasmid) występujące w komórce w 20-60 kopiach [2], b) oparte na drożdżowych sekwencjach chromosomalnych będących miejscami startu replikacji ARS (*autonomously replicating sequence*) — plazmidy te występują w komórkach w 5-10 kopiach, ale pozbawione mechanizmu segregacji podczas mejozy są bardzo niestabilne [2, 3], c) ARS/CEN, plazmidy centromerowe czyli posiadające dodatkową sekwencję centromerową CEN-zachowują się w czasie mejozy jak minichromosomy, są więc stosunkowo stabilne, występują w 1-2 kopiach na komórkę [4]. Niezbędnymi elementami wektorów są

drożdżowe markery umożliwiające selekcję komórek niosących plazmid oraz sekwencje niezbędne do replikacji i selekcji w *E. coli*.

Część plazmidu, związaną bezpośrednio z ekspresją klonowanej sekwencji kodującej, określa się mianem kasyety ekspresyjnej. Jednym z jej elementów jest promotor kierujący transkrypcją klonowanego genu. Cechy charakteryzujące poszczególne promotory to ich siła i możliwości regulowania inicjowanej przez nie transkrypcji (indukcyjność). Pozostałe składniki kasyety ekspresyjnej to sekwencja kodująca klonowanego genu podłączona do promotora bądź bezpośrednio, bądź przez sekwencję peptydu wyprowadzającego (lidera) oraz sekwencje terminujące transkrypcję DNA.

## III. Peptydy wyprowadzające

Peptydy wyprowadzające (lidery) to klasa specyficznych amino-terminalnych sekwencji peptydowych odpowiedzialnych za wewnątrzkomórkowy transport białek i ich wydzielanie. Są częścią składową prekursorów białek wydzielniczych, tak bakterii, jak i komórek eukariotycznych. Znanych jest ponad 200 sekwencji wyprowadzających. Ustalono najważniejsze elementy ich struktury: składają się z zasadowego regionu N-terminalnego, centralnego regionu hydrofobowego i bardziej polarnego regionu C-terminalnego [5], zawierającego sekwencje rozpoznawane przez proteazy biorące udział w obróbce postranslacyjnej białka prekursorowego.

*S. cerevisiae* wydzielają do peryplazmy bądź na zewnątrz komórek tylko kilka białek. Ilości wydzielanej inwertazy, czynnika  $\alpha$  i kwaśnej fosfatazy wynoszące mniej niż 100 mg w litrze podłoża hodowlanego [6, 7, 8] w porównaniu z możliwościami wydzielniczymi innych organizmów są ograniczone. Dla przykładu *Aspergillus niger* wydziela kilka gramów glukoamylazy na litr hodowli [9], a *Bacillus subtilis* podobne ilości  $\alpha$ -amylazy [10]. *S. cerevisiae* okazały się jednak organizmem zdolnym do wydajnej sekrecji wielu heterologicznych białek. Niezbędnym warunkiem dla sekrecji obcych białek jest to, aby peptyd wyprowadzający był prawidłowo rozpoznawany w komórkach drożdżowych. Mimo, że mechanizmy transportu i obróbki postranslacyjnej białek są ewolucyjnie zachowane przez wiele organizmów, nie wszystkie lidery pochodzące z innych gatunków prawidłowo funkcjonują w *S. cerevisiae* [11-13]. Z drugiej strony z powodzeniem poddawano ekspresji w *S. cerevisiae* geny licznych prekursorów heterologicznych białek. Naturalnie występujące w tych białkach lidery zapewniały prawidłowy transport i sekrecję oraz obróbkę postranslacyjną (np. glukoamylaza z *A. niger* [14], ludzki trzustkowy wydzielniczy inhibitor tripsyny, [15] czy  $\alpha$ -amylaza ludzkiej śliny [16]). Sekrecję heterologicznych białek z *S. cerevisiae* można także uzyskać stosując homologiczne peptydy wyprowadzające pochodzące z prekursorów wydzielniczych białek drożdżowych, takich



jak inwertaza [13] czy kwaśna fosfataza [17] lub lidery pochodzące z innych gatunków drożdży, np. lider toksyny z *Kluyveromyces lactis* (ang. *killer toxin*) [18], czy zmutowany lider  $\alpha$ -glukoamylazy z *S. carlsbergensis* [19]. Najczęściej jednak stosowany jest lider pochodzący z prekursora drożdżowego czynnika płciowego  $\alpha$  *S. cerevisiae*.

#### IV. Czynniki płciowe $\alpha$ — synteza, obróbka potranslacyjna

Czynnik  $\alpha$  jest peptydem składającym się z 13 aminokwasów, wydzielanym przez haploidalne komórki typu płciowego  $\alpha$ , niezbędnym dla efektywnej koniugacji między haploidalnymi komórkami typu  $\alpha$  i  $\alpha$ , a w konsekwencji, tworzenia form diploidalnych. Genom *S. cerevisiae* zawiera dwa geny kodujące prekursorowe białko czynnika  $\alpha$  [20, 21]. Większy z nich (MF $\alpha$  1) koduje 165 aminokwasowy polipeptyd (pre-pro  $\alpha$ -factor, gdzie sekwencja oznaczona mianem pre-pro odpowiada sekwencji lidera) zawierający 19 aminokwasowy pre-region (sekwencja sygnałna) i 64 aminokwasowy pro-region z trzema potencjalnymi miejscami N-glikozylacji [22]. Za liderem następują 4 powtórzenia sekwencji aminokwasowych dojrzałego czynnika  $\alpha$ , z których każda poprzedzona jest krótkim peptydem rozdzielającym o sekwencji Lys-Arg-(Glu/Asp-Ala)<sub>2,3</sub>. Drugi gen czynnika  $\alpha$  (MF $\alpha$  2) koduje białko prekursorowe zawierające tylko 2 jednostki czynnika  $\alpha$ . Lider i peptydy rozdzielające zawierają sekwencje aminokwasowe stanowiące sygnały do specyficznej proteolizy i sekrecji czynnika  $\alpha$ . (Ryc. 1). W obróbce potranslacyjnej biorą udział 4 różne enzymy proteolityczne: 1) sygnałna peptydaza hydrolizująca wiązanie między 19 a 20 aminokwasem sekwencji liderowej, 2) endoproteinaza (kodowana przez gen *KEX2*) tnąca od karboksylowego końca sekwencji Lys-Arg peptydu rozdzielającego, 3) dipeptydyloaminopeptydaza (produkt genu *STE13*) usuwająca pozo-

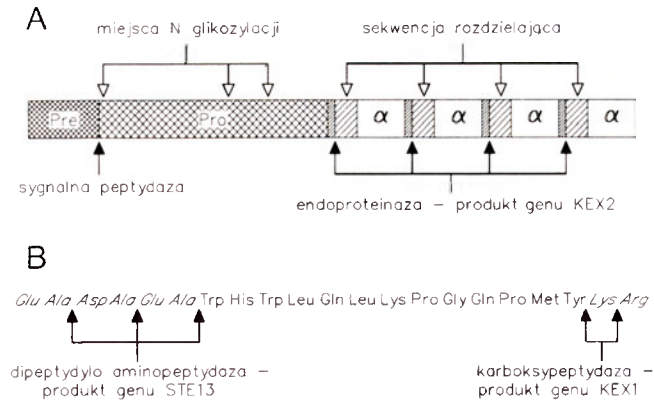
stałe aminokwasy sekwencji rozdzielającej od N-końca każdej powtarzalnej jednostki czynnika  $\alpha$ , 4) karboksypeptydaza (kodowana przez gen *KEX1*) usuwająca argininę i lizynę z COOH-końca czynnika  $\alpha$  powstałego z trzech pierwszych jednostek [23].

Białko-prekursor czynnika  $\alpha$  (pre-pro  $\alpha$ -factor) przechodząc klasyczną drogę wydzielniczą w pierwszym etapie przemieszczane jest do retikulum endoplazmatycznego, gdzie po usunięciu sekwencji sygnałnej staje się czynnikiem pro- $\alpha$ . Do trzech miejsc N-glikozylacji pro-regionu dołączany jest rdzeń oligosacharydowy. Modyfikacja rdzenia oligosacharydowego zachodzi w aparacie Golgiego poprzedzając działanie enzymów proteolitycznych. Powstały w efekcie obróbki potranslacyjnej dojrzały czynnik  $\alpha$  szybko jest wydzielany na zewnątrz komórek (egzocytoza) [24].

#### V. Konstrukcja układów do sekrecji heterologicznych białek wykorzystujących wydzielniczy system czynnika $\alpha$

Pierwsze doniesienia o zastosowaniu wydzielniczego systemu czynnika płciowego  $\alpha$  do sekrecji białek z *S. cerevisiae* pojawiły się w latach 1983-84. Ermiwsp [25] wykazali, że produkt ekspresji hybrydowego genu powstałego w wyniku połączenia sekwencji kodującej lider czynnika  $\alpha$  z sekwencją kodującą drożdżowy enzym inwertazę (z zachowaniem ramki odczytu lidera) podlegał prawidłowej obróbce potranslacyjnej (usuwanie segmentu hybrydowego białka pochodzącego z pre-pro sekwencji czynnika  $\alpha$ ) i był wydzielany do przestrzeni peryplazmatycznej. W pracy Bittera [26] opisane zostały pozytywne wyniki ekspresji i sekrecji do podłoża hodowlanego produktów ekspresji fuzji sekwencji kodującej lider czynnika  $\alpha$  z syntetycznymi genami kodującymi heterologiczne dla drożdży białka  $\beta$ -endorfinę i analog ludzkiego interferonu  $\alpha$ . Od tej pory w *S. cerevisiae* poddawano ekspresji wiele różnych heterologicznych genów korzystając z fuzji klonowanego genu z sekwencją liderową czynnika  $\alpha$  [27-30]. W większości wydzielanych produktów formowały się natywne mostki dwusiarczkowe, a powstające białka wykazywały biologiczną aktywność. Ponieważ wiadomo, iż w retikulum endoplazmatycznym występuje enzym izomeraza dwusiarczkowa [31], uczestniczący w procesie tworzenia mostków dwusiarczkowych w homologicznych białkach drożdżowych, przypuszcza się, że bierze on także udział w powstawaniu mostków dwusiarczkowych w białkach heterologicznych.

Istotnym problemem związanym z produkcją heterologicznych białek w *S. cerevisiae* jest to, aby uzyskane rekombinacyjne białko posiadało cechy białka natywnego, a więc prawidłową sekwencję aminokwasową, natywną strukturę przestrzenną i w konsekwencji aktywność biologiczną identyczną z aktywnością białka natywnego. Czynnikiem decydującym o zgodności sekwencji aminokwasowej biegnącej od N-końca



**Ryc. 1.** A. Schemat prekursora czynnika  $\alpha$  z zaznaczonymi miejscami N-glikozylacji i proteolitycznej obróbki prowadzonej przez sygnałną peptydazę i endoproteinazę-produkt genu *KEX2*. B. Sekwencja aminokwasowa pojedynczej jednostki czynnika  $\alpha$  otrzymanej po trawieniu endoproteinazą kodowaną przez gen *KEX2* z zaznaczonymi miejscami proteolitycznego cięcia przez produkty genów *STE13* i *KEX1*.

białka rekombinacyjnego z sekwencją produktu naturalnego jest sposób połączenia klonowanego genu z sekwencją peptydu wyprowadzającego. W efekcie ekspresji hybrydowego genu powstałego w wyniku fuzji sekwencji kodującej lider czynnika  $\alpha$  z syntetycznym genem ludzkiego czynnika wzrostowego komórek epidermalnych (hEGF) większość wydzielanego, biologicznie aktywnego produktu zawierała na swoim końcu aminowym sekwencję (Glu-Ala)<sub>3</sub> pochodzącą z peptydu rozdzielającego. Sugeruje to, że ilość kodowanej przez gen *STE13* dipeptydyloaminopeptydazy obecnej w komórce jest niewystarczająca dla prawidłowej obróbki dużej ilości hybrydowego białka. Po usunięciu z fuzji genowej kodonów peptydu rozdzielającego (metodą mutagenyzy *in vitro*) otrzymano dojrzały hEGF o prawidłowej sekwencji aminokwasowej końca NH<sub>2</sub> [32]. Zarówno w przypadku hEGF, jak i wielu innych białek rekombinacyjnych wykazano iż obecność sekwencji (Glu-Ala)<sub>3</sub> peptydu rozdzielającego nie wpływa na działanie endopeptydazy kodowanej przez gen *KEX2*. Z tego względu w konstrukcji wektorów służących do ekspresji i sekrecji heterologicznych białek z wykorzystaniem lidera drożdżowego czynnika  $\alpha$  najczęściej usuwano sekwencje peptydu rozdzielającego. Istnieją jednak dane wykazujące, że nie wszystkie hybrydowe białka pozbawione peptydu rozdzielającego są dobrym substratem dla proteazy kodowanej przez gen *KEX2*. Efekt taki opisano badając ekspresję fuzji genowej sekwencji kodującej lider czynnika  $\alpha$ , kończący się kodonami Lys-Arg z genem *INF-con1*. Wydzielany, hiperglikozylowany produkt nie podlegał prawidłowej obróbce potranslacyjnej. Natomiast po ekspresji podobnej fuzji zawierającej sekwencje peptydu rozdzielającego głównym produktem sekwencji był dojrzały IFN [33].

Drożdżowy system obróbki potranslacyjnej prekursorów białek, w którym bierze udział proteaza kodowana przez gen *KEX2*, stosowano także do sekrecji heterologicznych białek połączonych z innymi niż lider czynnika płciowego  $\alpha$  peptydami wyprowadzającymi [34, 35].

## VI. Glikozylacja

Innym z procesów modyfikacji prekursorów białek w *S. cerevisiae* jest glikozylacja zachodząca podczas syntezy białek w retikulum endoplazmatycznym i podczas ich transportu poprzez aparat Golgiego. Sygnałem dla glikozylacji asparaginy jest sekwencja aminokwasowa Asn-Xaa-Ser/Thr, pod warunkiem, że jest ona sterycznie dostępna dla enzymów glikozylujących. Sygnał ten jest silnie zachowany ewolucyjnie od drożdży do ssaków. Chociaż rdzeń (core) oligosacharydowy dołączany do Asn jest podobny lub identyczny w komórkach drożdżowych i zwierzęcych, to modyfikacje rdzenia różnią się znacząco. W drożdżowych glikoproteinach przeznaczonych do sekrecji (np. kwaśna fosfataza) do rdzenia dodawane są zewnętrzne

łańcuchy cukrowe składające się z 50 lub więcej mannoz, podczas gdy u ssaków do rdzenia oligosacharydowego dołączane są 3 mannozy podstawiane przez kwas sialowy, galaktozę i N-acetyloglukozoaminę<sup>1</sup> [36]. Heterologiczne glikoproteiny wytwarzane w *S. cerevisiae* często są hiperglikozylowane (zawierają nieobecne w białkach natywnych łańcuchy cukrowe). Hiperglikozylacja najczęściej nie wpływa na ich biologiczną aktywność *in vitro* [37], ale w przypadku białek o znaczeniu farmakologicznym może zmieniać ich właściwości immunogenne. Sposobem na zminimalizowanie różnic między białkami produkowanymi przez drożdże, a ich naturalnymi odpowiednikami jest zastosowanie do sekrecji szczepów drożdżowych niosących mutacje w genach odpowiadających za glikozylację. Mori i Dumias [38] porównywali strukturę ludzkiej antytrypsyny  $\alpha 1$  ( $\alpha 1$ -AT) wydzielanej przez szczepy drożdżowe niosące dziki lub zmutowany gen *mnn9*. Mutacja ta blokuje dodawanie zewnętrznych łańcuchów mannozy do rdzenia oligosacharydowego [39]. Wydzielana przez szczep dziki (*MNN9*)  $\alpha 1$ -AT będąc mieszaniną glikoprotein o większej masie cząsteczkowej niż białko natywne, wykazywała zmienioną ruchliwość elektroforetyczną. Heterogenność produktu wynika z różnej długości dołączanego łańcucha węglowodanowego. Produkt wydzielany przez komórki niosące mutację był homogeny i charakteryzował się ruchliwością elektroforetyczną bardzo zbliżoną do ruchliwości naturalnej  $\alpha 1$ -AT.

Lista heterologicznych glikoprotein wydzielanych przez drożdże do środowiska jest bardzo długa. Liderzy kierujące te białka do sekrecji są pochodzenia bądź drożdżowego, np. lider czynnika płciowego  $\alpha$  (mu GM-CSF [40], bydłęca Interleukina 2 [41]), czy lider inwertazy (ludzka  $\alpha 1$  antytrypsyna, [38]), bądź są natywnymi liderami białek ssaków (glukoamylaza, [14]). Wyniki Sleepa i wsp. [34] uzyskane przy klonowaniu albuminy surowicy ludzkiej wskazują, że obecność lub brak w liderach sekwencji podlegających glikozylacji nie wpływa na poziom sekrecji heterologicznego białka.

## VII. Czynniki wpływające na wydajność sekrecji

### VII-1. Wydajność ekspresji klonowanego genu

Wydajność sekrecji heterologicznych białek z *S. cerevisiae* uzależniona jest między innymi od pojemności drożdżowej „drogi wydzielniczej”. Jeżeli ilość powstałego w komórce białka jest większa niż zdolność komórki do jego transportu i obróbki potranslacyjnej, wytwarzane białka w nikłym stopniu uwalniane są na zewnątrz, a produkt ekspresji gromadzony jest we-

<sup>1</sup> Przebieg procesu glikozylacji i obróbki reszt cukrowych w aparacie Golgiego był tematem artykułu przeglądowego G. Palamarczyk (1987) *Post Biochem* 33, 297-307.



wewnątrz komórek. Taka akumulacja hamuje tempo wzrostu i obniża żywotność komórek, obniża liczbę kopii plazmidu i jego stabilność [13, 17]. Dlatego ważne jest, by liczba kopii plazmidu i siła promotora, które w dużym stopniu odpowiadają za wydajność ekspresji, zapewniały równowagę pomiędzy wytwarzaniem białka i jego wydzielaniem. Ścisła regulacja ekspresji heterologicznych genów przez regulowane promotory polegająca na indukcji ekspresji genu w odpowiedniej fazie wzrostu, lub przy odpowiedniej gęstości hodowli pozwala uniknąć ewentualnego toksycznego wpływu produktu na komórki drożdży.

Elliot i w s p. [42] klonując gen kodujący ludzką erytropoetynę (EPO), badali wpływ poziomu ekspresji na wydajność sekrecji białka. Wykazali, że zmniejszenie wydajności sekrecji dojrzałego białka przy nasileniu ekspresji genu spowodowane jest osłabieniem skuteczności obróbki potranslacyjnej przeprowadzanej przez proteazę kodowaną przez gen *KEX2*. Odsetek w pełni dojrzałej EPO wydzielanej przez komórki drożdżowe był mniejszy w systemie zapewniającym wysoką ekspresję (wielokopijny wektor oparty na 2  $\mu$ m DNA) niż w układzie determinującym niski poziom ekspresji (plazmid centromerowy występujący w małej ilości kopii). Sekrecja wytwarzanej na wysokim poziomie EPO limitowana jest także na etapie transportu przez drogę wydzielniczą. Badanie ekstraktów komórkowych wykazało, że gromadzona w komórkach EPO głównie akumulowana jest w retikulum endoplazmatycznym, a więc najprawdopodobniej upośledzony jest etap transportu z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego.

## VII-2. Peptydy wyprowadzające

Na wydajność sekrecji heterologicznych białek z *S. cerevisiae* może mieć wpływ rodzaj użytego peptydu wyprowadzającego. Może on także wpływać na jakość otrzymanego produktu określaną przez stopień jego jednorodności. W wyniku zastosowania 5 różnych peptydów liderowych do sekrecji tego samego białka — albuminy surowicy ludzkiej (HSA) uzyskano efektywne wydzielanie badanego białka (od 20 do 55 mg w litrze podłoża hodowlanego), przy czym obserwowano różnice w wydajnościach w zależności od użytego lidera. Najlepsze wyniki uzyskano stosując dwa hybrydowe lidery zawierające 1) część pre-regionu HSA, 2) fragment pre-regionu toksyny kilerowej *Kluyveromyces lactis* połączone z fragmentem lidera czynnika  $\alpha$  zawierającym sekwencje rozpoznawane przez proteazę kodowaną przez gen *KEX2*. Nieco niższą wydajność sekrecji uzyskano stosując naturalny peptyd wyprowadzający HSA lub lider czynnika  $\alpha$ , najniższą stosując lider toksyny kilerowej. Główną frakcję izolowanych z podłoża hodowlanego białek stanowiła dojrzała albumina. Oprócz niej obserwowano jednak produkt o mniejszej masie cząsteczkowej, występujący

w różnej proporcji w zależności od zastosowanego lidera. Jest on fragmentem HSA kończącym się na 403 lub 409 aminokwasie albuminy składającej się z 585 aminokwasów. Mechanizm prowadzący do tworzenia się tego fragmentu nie jest jasny. Autorzy sugerują, że różnice w zwijaniu się cząsteczek wynikające ze stosowanego lidera mogą powodować różną wrażliwość białka na wewnątrzkomórkowe enzymy proteolityczne, a w konsekwencji są powodem różnego stopnia heterogenności otrzymanego produktu [34]. Zależność wydajności sekrecji od stosowanych peptydów wyprowadzających opisano także w przypadku produkcji białek, takich jak np. tkankowy aktywator plazminogenu tPA [17] lub wieprzowa trzustkowa fosfolipaza A<sub>2</sub> [43], a także HSA [44].

Sekwencje wyprowadzające nie zawsze równie wydajnie kierują sekrecją różnych heterologicznych białek. Wydaje się więc, że pewne cechy dojrzałych białek, a w szczególności charakter sekwencji aminokwasowej regionu N-terminalnego ma wpływ na funkcje peptydu wyprowadzającego. Zmiana składu aminokwasowego w regionie N-terminalnym ludzkiego lizozymu polegająca na wprowadzeniu aminokwasów polarnych i niosących ładunek ujemny powoduje nieprawidłowe związanie się białka i przez to obniża sekrecję, natomiast wprowadzenie aminokwasów z ładunkiem dodatnim upośledza translokację białka prekursorowego przez membranę. Zamiana pierwszego aminokwasu lizozymu lizyny na prolinę utrudnia odcinanie peptydu wyprowadzającego [45].

## VII-3. Rodzaj wektora

Problem zwiększenia wydajności sekrecji rekombinacyjnych białek z *S. cerevisiae* może być rozwiązany przez zmianę wektorów ekspresyjnych lub ich składników. Zwiększenie wydajności ekspresji klonowanego genu osiąganę przez podwyższenie ilości kopii plazmidu lub zmianę promotora może mieć pozytywny wpływ na ilość otrzymanego produktu [44, 46-48].

Smith i w s p. [13] klonując gen kodujący cielęcą prochymozynę udowodnili, że efektywność sekrecji prochymozyny może być regulowana przez zastosowanie wektora integracyjnego. Integracja kilku kopii jednostki transkrypcyjnej (zawierającej promotor oraz klonowany gen połączony z sekwencją kodującą lider kierujący sekrecją białka) do chromosomu drożdżowego powodowała czterokrotne zwiększenie ilości wydzielanej prochymozyny w porównaniu ze szczepem zawierającym taką samą jednostkę zrekombinowaną z plazmidem występującym w wielu kopiach, mimo iż poziom ekspresji genu w obu przypadkach był porównywalny. Mechanizm prowadzący do podwyższenia poziomu sekrecji nie jest znany. Autorzy sugerują, że ekspresja genu zlokalizowanego na plazmidzie wielokopijnym jest bardziej zsynchronizowana niż ekspresja jego kopii rozsianych po drożdżowym genomie i w konsekwencji pulsowe uwalnianie dużej ilości



produktu powoduje „przesycenie” drogi wydzielniczej obniżające poziom sekrecji.

Dodatkową zaletą wbudowania zrekombinowanego genu do chromosomu jest wysoka stabilność systemu ekspresyjnego. W przypadku klonowania genu kodującego MU GM-CSF [49] poprzez integrację kasety ekspresyjnej do chromosomu drożdżowego, po 30 generacjach nie zaobserwowano segregacji plazmidu z komórek. Taka stabilność znosi ograniczenia w hodowli związane z koniecznością stosowania presji selekcyjnej dla utrzymania plazmidu i umożliwia prowadzenie hodowli w bogatym podłożu, w którym drożdże rosną szybciej i do wyższej gęstości. Jest to bezpośrednia przyczyna otrzymania większej ilości wydzielanego białka (MU GM-CSF) w bogatym podłożu hodowlanym w stosunku do podłoża selekcyjnego.

#### VII-4. Szczepy drożdżowe

Jednym ze sposobów podwyższenia poziomu wydzielania heterologicznych białek było poszukiwanie szczepów drożdżowych charakteryzujących się zwiększoną zdolnością do ich sekrecji. Smith i wsp. [13] wyizolowali mutanty *S. cerevisiae* (nazwane *ssc*) wydzielające proporcjonalnie więcej produkowanej wewnątrz komórek prochymozyny niż szczep dziki. Podwyższenie poziomu sekrecji rekombinacyjnego białka przez mutanty *ssc* nie jest zależne od zastosowanego układu ekspresyjnego — podobny efekt obserwowano stosując różne promotory i lidersy, jak i integrację jednostki transkrypcyjnej do chromosomu. Mutacja *ssc* wydajnie podnosi poziom sekrecji innych heterologicznych białek takich jak ludzka prourokinaza (u-PA) czy ludzki aktywator tkankowy (t-PA), a z drugiej strony nie ma wpływu na wydajność wydzielania  $\alpha$ -1 antytrypsyny [50]. Poszukiwano także innych mutantów *S. cerevisiae* o podwyższonym poziomie sekrecji wytwarzanego białka. Szczep niosący mutację *ose1* wydzieliał 12-15 razy więcej mysiej alfa-amylazy niż szczep dziki [51]. Poziom sekrecji ludzkiego lizozymu przez inny szczep z mutacją *ssl1* był dziesięciokrotnie podwyższony względem szczepu dzikiego [52]. Również szczepy fenotypowo dzikie pod względem zdolności do sekrecji różnią się między sobą wydajnością wydzielania produktów ekspresji klonowanych genów.

#### VII-5. Podłoża hodowlane

Dodatkowym elementem mogącym mieć wpływ na ilość wydzielanego białka są warunki hodowania zrekombinowanych szczepów drożdżowych. Wzbogacenie standardowego minimalnego podłoża przez dodanie hydrolizatu kazeiny spowodowało znaczące podwyższenie poziomu sekrecji ludzkiego hormonu przytarczycznego [29]. Podobny skutek osiągnięto dla  $\beta$ -galaktozydazy z *E. coli* uzupełniając podłoże ekstraktem drożdżowym i peptonem [53]. Przy wzboga-

caniu podłoża trzeba jednak mieć na uwadze obniżenie stabilności plazmidu na skutek ewentualnego braku presji selekcyjnej.

### VIII. Podsumowanie

Sekrecja heterologicznych białek z *S. cerevisiae* jest użyteczną i szeroko stosowaną metodą w produkcji białek zarówno do celów badawczych, jak i stosowanych. Jednakże obszerna literatura dotycząca tego problemu, jak dotąd nie tłumaczy różnic w skuteczności obróbki potranslacyjnej czy w poziomie sekrecji uzyskiwanym dla różnych białek. Czynniki mające wpływ na wydajną ekspresję i sekrecję to między innymi liczba kopii wektora, indywidualna charakterystyka zastosowanego promotora, stabilność mRNA, rodzaj lidera i szczep drożdżowy. Lista ta musi być uzupełniona o badania właściwości hybrydowego białka podlegającego obróbce potranslacyjnej i sekrecji oraz jego interakcji ze składnikami drożdżowego aparatu wydzielniczego.

Wydajność, z jaką drożdże *S. cerevisiae* wydzielają heterologiczne białka do podłoża hodowlanego, waha się od kilkunastu mikrogramów w 1 l podłoża (np. ludzka interleukina 5 [54]) do kilkudziesięciu miligramów (np. HSA [44]). Najczęściej jednak uzyskuje się kilka miligramów rekombinacyjnego białka z 1 litra podłoża hodowlanego. Niskie wydajności sekrecji heterologicznych białek z *S. cerevisiae* a także stopniowe gromadzenie wiedzy z zakresu fizjologii i genetyki innych gatunków drożdży oraz rozwój technik transformacji umożliwiły rozszerzenie badań nad ekspresją i sekrecją obcych białek na takie gatunki drożdży jak *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces occidentalis* i *Yarrowia lipolytica*. Porównanie wydajności sekrecji różnych białek z *S. cerevisiae* i z alternatywnych systemów drożdżowych wykazuje, że organizmy te są często bardziej produktywne [55]. Dlatego też w coraz większym stopniu stają się one obiektem zainteresowania badaczy, a przede wszystkim koncernów biotechnologicznych nastawionych na bardzo wydajną i taną produkcję rekombinacyjnych białek o znaczeniu handlowym.

Artykuł otrzymano 11 lutego 1993 r.  
Zaakceptowano do druku 23 marca 1993 r.

### Piśmiennictwo

1. Scheckman R, Novick P (1982) W: Strathern J N, Jones E W, Broach J R (red) *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae: Metabolism and Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. str 361-369
2. Fitcher A B, Cox B S (1984) *J Bacteriol* **157**: 283-290
3. Murry A W, Szostek J W (1983) *Cell* **34**: 961-970
4. Clarke L, Carbon J (1980) *Nature (Lond)* **287**: 504-509
5. von Heijne G (1986) *Nucleic Acids Res* **14**: 4683-4690

6. Bostian KA, Lemire JM, Halvorson HO (1982) *Mol Cell Biol* 2: 1-10
7. Julius D, Blair R, Brake A, Sprague G, Thorner J (1983) *Cell* 32: 839-852
8. Williams RS, Trumbly RJ, MacColl R, Trimble RB, Maley F (1985) *J Biol Chem* 260: 13334-13341
9. Cullen D, Gray GL, Wilson LJ, Hayenga KJ, Lamsa MH, Rey MW, Norton S, Berka RM (1987) *Bio Technology* 5: 369-376
10. Yamazaki H, Ohmura K, Nakayama A, Takeichi Y, Ootzol K, Yamasaki M, Tamura G, Yamane K (1983) *J Bacteriol* 156: 327-337
11. Hitzeman RA, Leung DW, Perry LJ, Kohr WJ, Levine HL, Goeddel DV (1983) *Science* 219: 620-625
12. Hitzeman RA, Chen CY, Hagie FE, Lugovoy JM, Singh A (1984) W: Ballou A (red) *Recomb DNA Prod: Insulin, Interferon, Growth Hormone*. CRC Press, Boca Raton, Fla. str 47-65
13. Smith RA, Duncan MJ, Moir DT (1985) *Science* 229: 1219-1224
14. Innis MA, Holland MJ, McKabe PC, Cole GE, Wittman VP, Tal R, Watt KWK, Gelfand DH, Holland JP, Meade JH (1985) *Science* 228: 21-26
15. Izumato Y, Sato T, Yamamoto T, Yoshida N, Kikuchi N, Ogawa M, Matsubara K (1987) *Gene* 59: 151-159
16. Nakamura Y, Sato T, Emi M, Miyanojara A, Nishide T, Matsubara K (1986) *Gene* 50: 239-245
17. Hinnen A, Meyhack B, Heim J (1989) W: Barr PJ, Brake AJ, Valenzuela P (red) *Yeast Genetic Engineering*. Butterworths, Boston, str 193-213
18. Baldari C, Murray JAH, Ghiara P, Cesareni G, Galeotti CL (1987) *EMBO J* 6: 229-234
19. Hofmann KJ, Schultz LD (1991) *Gene* 101: 105-111
20. Kurjan J, Herskowitz I (1982) *Cell* 30: 933-945
21. Sigh A, Chen EY, Lugovoy JM, Chang CN, Hitzeman RA, Seeburg PW (1983) *Nucl Acids Res* 11: 4049-4063
22. Julius D, Schekman R, Thorner J (1984) *Cell* 36: 309-319
23. Bussey H (1988) *Yeast* 4: 17-26
24. Caplan S, Green R, Rocco J, Kurjan J (1991) *J Bacteriol* 173: 627-635
25. Erm SD, Schekman R, Flessel MC, Thorner J (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 7080-7084
26. Bitter GA, Chen KK, Banks AR, Lai P-H (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 5330-5334
27. Nonato RV, Shishido K (1988) *Biochem Biophys Res Comm* 152: 76-82
28. Bourbonnaist Y, Bolin D, Shields D (1988) *J Biol Chem* 263: 15342-15347
29. Gabrielsen OS, Reppe S, Seather O, Blingsmo OR, Sletten K, Gordeladze JO, Hogset A, Gautvik VT, Alestrom P, Oyen TB, Gautvik KM (1990) *Gene* 90: 255-262
30. Chen X-M, Qian Y-W, Chi C-W, Gan K-D, Zhang M-F, Chen C-Q (1992) *J Biochem* 112: 45-51
31. Freedman RB (1984) *Trends Biochem Sci* 106: 438-441
32. Brake AJ, Merryweather JP, Coit DG, Heberlein UA, Masiarz FR, Mullenbach GT, Urdea MS, Valenzuela P, Barr PJ (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4642-4646
33. Zsebo KM, Lu H-S, Fieschko JC, Goldstein L, Davis J, Duker K, Suggs SV, Lai P-H, Bitter GA (1986) *J Biol Chem* 261: 5858-5865
34. Sleep D, Belfield GP, Goodey AR (1990) *Bio/Technology* 8: 42-46
35. Clements JM, Catlin GH, Price MJ, Edwards RM (1991) *Gene* 106: 267-272
36. Innis MA (1989) W: Barr PJ, Brake AJ, Valenzuela P (red) *Yeast Genetic Engineering*. Butterworths, Boston, str 233-246
37. Van Arsdell JN, Kwok S, Schweichart VL, L腺ner MB, Gelfand DH, Innis MA (1987) *Bio/Technology* 5: 60-64
38. Moir DT, Dumias DR (1987) *Gene* 56: 209-217
39. Tsai PK, Frevert J, Ballou CE (1984) *J Biol Chem* 259: 3805-3811
40. Ernst JF, Mermod J-J, DeLamarier JF, Mattaliano RJ, Moonen P (1987) *Bio/Technology* 5: 831-834
41. Price V, Mochizuki D, March CJ, Cosman D, Deeley MC, Klinke R, Clevenger W, Gillis S, Baker P, Urdal D (1987) *Gene* 55: 287-293
42. Elliott S, Giffon J, Suggs S, Lau EP, Banks AR (1989) *Gene* 79: 167-180
43. Bekkers AC, Franken PA, Van den Bergh CJ, Verbakel JMA, Verheij HM, De Haas GH (1991) *Biochim Biophys Acta* 1089: 345-351
44. Okabayashi K, Nakagawa Y, Hayasuke N, Ohi H, Miura M, Ishida Y, Shimizu M, Murakami K, Hirabayashi K, Minamino H, Horii H, Masaki A, Sumi A, Ohmura T, Kawabe H (1991) *J Biochem* 110: 103-110
45. Kohara A, Yamamoto Y, Kikuchi M (1991) *J Biol Chem* 266: 20363-20368
46. Kinsella BT, Cantwell BA (1991) *Yeast* 7: 445-454
47. Blechl AN, Thrasher KS, Vensel WH, Greene FC (1992) *Gene* 116: 119-127
48. Laing L, Pretorius IS (1992) *Gene* 121: 35-45
49. Shaw KJ, Frommer BR, Anagnost JA, Narula S, Leibowitz PJ (1988) *DNA* 7: 117-126
50. Moir DT (1989) W: Barr PJ, Brake AJ, Valenzuela P (red) *Yeast Genetic Engineering*. Butterworths, Boston, str 215-230
51. Sakai A, Shimizu Y, Hishinuma F (1988) *Genetics* 119: 499-506
52. Suzuki K, Ichikawa K, Jigami Y (1989) *Mol Gen Genet* 219: 58-64
53. Vanoni M, Porro D, Martegani E, Alberghina L (1989) *Biochem Biophys Res Comm* 164: 1331-1338
54. Ingley E, Clutler RL, Fung M-C, Sanderson CJ, Young IG (1991) *Eur J Biochem* 196: 623-629
55. Buckholz RG, Gleeson MAG (1991) *Bio Technology* 9: 1067-1072



## 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”.

# Nowy aspekt metabolizmu poliamin — posttranslacyjne, zależne od transglutaminaz, modyfikacje białek przez poliaminy

## New aspect of polyamine metabolism — posttranslational, transglutaminase dependent, protein modifications mediated by polyamines

MAŁGORZATA MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Reakcje katalizowane przez transglutaminazy; poliaminy jako fizjologiczne substraty transglutaminaz
- III. Rola biologiczna transglutaminaz
- IV. Połączenia kowalencyjne poliamin z białkami w materiale biologicznym i metody ich identyfikacji
- V. Funkcja poliamin związanych kowalencyjnie z białkami  
V-1. Poliaminy jako inhibitory sieciowania białek  
V-2. Modulacja struktury i biologicznej aktywności białek przez poliaminy
- VI. Indukcja transglutaminaz przez kwas retinowy, rola poliamin
- VII. Udział transglutaminaz w programowanej śmierci komórki
- VIII. Transglutaminazy w komórkach nowotworowych
- IX. Uwagi końcowe

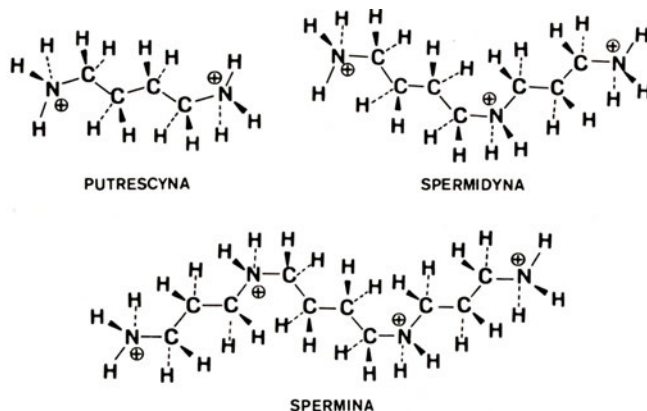
### Contents:

- I. Introduction
- II. Transglutaminase-catalyzed reactions, polyamines as physiological substrates for transglutaminase
- III. Biological role of transglutaminases
- IV. Covalent polyamine-protein conjugates in biological material and the methods of their identification
- V. Function of polyamines covalently bound to proteins  
V-1. Polyamines as cross-linking inhibitors  
V-2. Polyamine modulation of the structure and biological activity of proteins
- VI. Transglutaminase induction by retinoic acid, role of polyamines
- VII. The role of polyamines in programmed cell death
- VIII. Transglutaminase in tumour cells
- IX. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: TG — transglutaminaz(a); tTG (TGII) — tkankowa transglutaminaza; TGI — transglutaminaza epidermalna, związana z błonami; pu — putrescyna; spd — spermidyna; spm — spermina; DFMO —  $\alpha$ -difluorometyloornityna; PAO — oksydaza poliaminowa; eIF-4D — eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4D

### I. Wstęp

Poliaminy — putrescyna\*, spermidyna i spermina są alifatycznymi polikationami z odpowiednio 2, 3 i 4 ładunkami dodatnimi w fizjologicznym pH (Ryc. 1). Poliwalencyjność tych prostych amin sprawia, że *in vivo* są one w większości odwracalnie związane z komórkowymi anionami, a więc z kwasami nukleinowymi, białkami i fosfolipidami. Niestabilność od kilkunastu lat zainteresowanie poliaminami wiąże się z istotną rolą tych związków w podstawowych procesach zachodzących w komórce [1-4]. Poliaminy wpływają zarówno na proliferację komórek, jak i ich wzrost oraz różnicowanie, jednak mechanizm ich działania na poziomie molekularnym pozostaje nie całkowicie wyjaśniony. Ostatnio zwrócono uwagę na nowy aspekt metabolizmu poliamin, które w tkankach i płynach ustrojowych obecne są nie tylko jako polikationy, ale mogą być również nieodwracalnie inkorporowane do białek w procesie posttranslacyjnym katalizowanym przez transglutaminazy (TG) [5, 6]. Kowalencyjne związanie poliamin z białkami, prowadzące do modyfi-



Ryc. 1. Wzory poliamin

\* dr, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

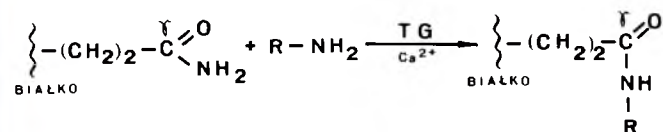
\* putrescyna, chociaż jest diaminą, zwyczajowo zaliczana jest do poliamin



kacji ich właściwości i funkcji biologicznych, oraz wynikające z tego konsekwencje dla funkcjonowania komórki, a także funkcjonalna rola TG w komórkowych procesach, są przedmiotem tego opracowania.

## II. Reakcje katalizowane przez transglutaminazy; poliaminy jako fizjologiczne substraty transglutaminaz

Transglutaminazy (EC 2.3.2.13, R-glutaminylopeptyd: amino  $\gamma$ -glutamylotransferaza), spokrewnione z proteazami, katalizują zależną od wapnia reakcję przeniesienia grupy acylowej, w której grupa  $\gamma$ -karboksamidowa związanej peptydowo glutaminy jest donorem acylu, a I rzędowa grupa aminowa peptydowo związanej lizyny — akceptorem acylu. Rolę akceptora grupy acylowej może również grać *in vitro*, a także jak wykazano ostatnio *in vivo*, I rzędowa grupa aminowa poliaminy czy monoaminy [7-9], (Ryc. 2).



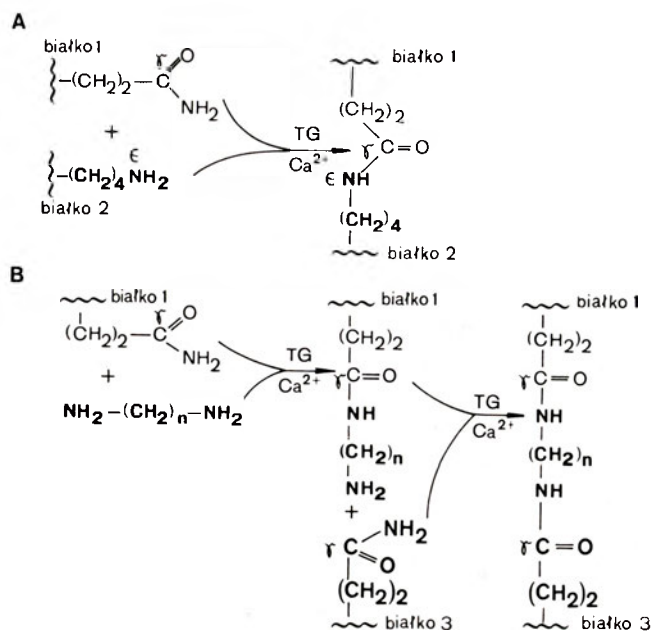
Ryc. 2. Reakcja katalizowana przez transglutaminazy

Opisany został mechanizm tej reakcji, w której niezwykle reaktywna grupa tiolowa cysteiny z centrum aktywnego enzymu reaguje z grupą  $\gamma$ -karboksamidową reszty glutamylowej białka tworząc intermediat acyl-enzym, który z kolei jest przedmiotem ataku nukleofilowego I rzędowej aminy ( $\text{RNH}_2$ ).

W rezultacie reakcji katalizowanej przez TG tworzy się bądź wiązanie izopeptydowe glutamylolizynowe prowadzące do sieciowania białka, bądź też wiązanie  $\gamma$ -glutamylolizynowe, którym I rzędowa amina zostaje nieodwracalnie związana z białkiem.

Transglutaminazy różnią się specyficznością w stosunku do obydwu substratów biorących udział w reakcji. Cechuje je wysoka selektywność wobec substratu będącego donorem acylu, z którym tworzą intermediat. Glutamina nie tylko więc musi być związana z białkiem, ale niezbędna jest również odpowiednia sekwencja otaczających ją aminokwasów warunkujących właściwą strukturę II rzędową. Te uwarunkowania sprawiają, że tylko niewiele białek może być donorem acylu; co więcej na ogół w takim białku jedynie pojedyncza grupa glutamylowa podlega modyfikacji. Przeciwnie, transglutaminazy nie wykazują wysokiej specyficzności wobec substratowej grupy aminowej. Dobrym substratem jest związana z białkiem grupa aminowa lizyny (w przeciwieństwie jednak do wolnej lizyny), bardzo dobrymi są też poliaminy. Kowalencyjne przyłączenie poliaminy do białka nie tylko może prowadzić do modyfikacji jego właściwości o daleko idących konsekwencjach metabolicznych, lecz także — do wysoce specyficznego sieciowania białek. Wynika to z faktu, że przyłączona do białka

poliamina ma jeszcze jedną I rzędową grupę aminową umożliwiającą kolejną reakcję z drugą resztą glutamylową tego samego lub następnego białka (Ryc. 3).



Ryc. 3. Sieciowanie białka poprzez wiązanie  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lizynowe (A) i poprzez wiązanie N,N-bis( $\gamma$ -glutamyl)poliaminowe (B)

Następuje wówczas, podobnie jak to ma miejsce gdy substratową grupą aminową jest związana z białkiem lizyna, sieciowanie dwóch łańcuchów polipeptydowych, które będą w tym przypadku połączone wiązaniem N,N-bis-( $\gamma$ -glutamyl)poliaminowym. Należy podkreślić, że zaznaczone na rycinie 3 białko 2 biorące udział w wiązaniu glutamylolizynowym i białko 3 związane przez połączenie N,N-bis(glutamyl)poliaminowe są różnymi białkami; podczas gdy białko 2 jest donorem grupy aminowej, białko 3 (podobnie jak białko 1) dostarcza glutamylowej grupy substratowej.

Modyfikacja białka przez przyłączenie monoaminy (np. histaminy czy cystaminy), bądź acetylowych pochodnych putrescyny, spermidyny i sperminy z wolna tylko jedną I rzędową grupą aminową, nie stwarza możliwości sieciowania białek.

## III. Rola biologiczna transglutaminaz

Transglutaminazy, enzymy katalizujące sieciowanie białka, występują powszechnie zarówno w komórkach i tkankach (TG wewnątrzkomórkowe), jak i w płynach ustrojowych (TG zewnątrzkomórkowe). Białka zmodyfikowane przez TG odnajdywane są w tak różnych strukturach jak w sieci fibrynowej krzepnącej krwi, w przestrzeniach międzykomórkowych, czy w rogowaciej warstwie skóry i w jej przydatkach (włosy, paznokcie).

Funkcja transglutaminaz związana jest z powstawaniem stabilnych polimerów białkowych niewrażliwych

na proteolizę i zwiększających odporność struktur subkomórkowych i tkanek na enzymatyczną, chemiczną i fizyczną degradację. Przykładem tak działającej, wszechstronnie przebadanej, TG zewnątrzkomórkowej jest powstający w osoczu krwi z nieaktywnego proenzymu czynnik XIIIa będący mediatorem kowalencyjnej polimeryzacji fibryny w czasie hemostazy [8-10]. Zewnątrzkomórkowa TG płynu nasieniowego katalizuje jego koagulację [11], (o roli poliamin w tym procesie będzie mowa w rozdz. V.1.). Wewnątrzkomórkowa TG epidermalnych keratynocytów (TG I), związana z błoną komórkową, indukowana w czasie różnicowania końcowego keratynocytów, stabilizuje ich błonę poprzez sieciowanie rozpuszczalnych białek cytoplazmatycznych w duże, nierozpuszczalne polimery tworzące zrogowaciałą otoczkę (*cornified envelope*) [12, 13]. Podobnie katalizowane przez TG reakcje sieciowania stabilizują wewnątrzkomórkową organizację strukturalnych składników w zapłodnionym jajku [14].

Mniej poznana jest funkcja rozpuszczalnej, wewnątrzkomórkowej TG, zwanej tkankową (tTG, TG II, rozpuszczalna, cytoplazmatyczna). Podwyższona ekspresja tTG prowadzi do zmiany zarówno morfologii komórki, która staje się spłaszczona, jak i jej adhezji do podłoża [15-17]. Niezmiernie ciekawa rola tkankowej TG w apoptozie, czyli programowanej śmierci komórki będzie omówiona w oddzielnym rozdziale.

#### IV. Połączenia kowalencyjne poliamin z białkami w materiale biologicznym i metody ich identyfikacji

Tabela 1 zawiera wybrane przykłady komórek i tkanek zwierzęcych, ale także roślinnych, oraz płynów ustrojowych, w których stwierdzono obecność poliamin włączonych kowalencyjnie do białek. Identyfikacja takich połączeń opiera się na ich niezwyklej trwałości. Wiązania glutamylaminowe, podobnie jak glutamylolizynowe, są odporne na działanie enzymów proteolitycznych, a ulegają rozbiciu dopiero w wyniku długotrwałej hydrolizy kwaśnej (6N HCl, 120°, 16 godzin), której poddaje się frakcję białkową. Połączona z białkiem poliamina zostaje w tych warunkach odszczepiona i zidentyfikowana chromatograficznie (najczęściej przy zastosowaniu HPLC). W opinii niektórych badaczy [5, 25] procedura ta jest nie w pełni specyficzna wobec poliamin związanych kowalencyjnie z białkiem wiązaniami  $\gamma$ -glutamylowymi. Może ona dawać wyniki zawyżone o te poliaminy, które są silnie związane z frakcją białkową, ale nie wiązaniami kowalencyjnymi, lecz elektrostatycznymi czy hydrofobowymi.

Ograniczeń tych nie ma inna strategia metodyczna polegająca na trawieniu frakcji białkowej enzymami proteolitycznymi. Otrzymuje się wówczas w hydrolizacie związku o strukturze  $\gamma$ -glutamylpoliaminy, lub też bis-( $\gamma$ -glutamyl)poliaminy. Obecność tej ostatniej

**Tabela 1.**

Występowanie poliamin kowalencyjnie połączonych z białkami.

komórka/tkanka	hydroliza	poliamina/ $\gamma$ -glutamylpoliamina
skoagulowany płyn nasieniowy szczura [11]	proteolityczna	$\gamma$ -glutamylospd $\gamma$ -glutamylspm bis( $\gamma$ -glutamyl)spd bis( $\gamma$ -glutamyl)spm
prostata szczura [18]	kwaśna	spd spm ślady pu
hepatocyty szczura [19]	proteolityczna	$\gamma$ -glutamylopu
wątroba szczura [20]	kwaśna proteolityczna	pu, spd, spm $\gamma$ -glutamylospd $\gamma$ -glutamylspm bis( $\gamma$ -glutamyl)spm
stymulowane ludzkie limfocyty [21]	proteolityczna	$\gamma$ -glutamylopu $\gamma$ -glutamylospd $\gamma$ -glutamylspm
soczewka oka ludzkiego [22]	kwaśna	pu
komórki CHO [23]	proteolityczna	$\gamma$ -glutamylopu $\gamma$ -glutamylospd
<i>Helianthus tuberosus</i> [24]	kwaśna	pu ślady spd i spm

struktury świadczy o połączeniu poliamin z dwiema grupami glutamylowymi białka, a więc o jej udziale w jego sieciowaniu. Dalszym potwierdzeniem struktury otrzymanej glutamylpoliaminy, oprócz jej identyfikacji chromatograficznej, jest użycie jej jako substratu cyklotransferazy  $\gamma$ -glutamylaminowej specyficznej wobec glutamylamin (a także glutamylolizyny). O roli tego enzymu w katabolizmie sieciowań glutamylolizynowych i glutamylpoliaminowych będzie mowa poniżej. Znikanie glutamylamin z jednoczesnym pojawianiem się wolnych amin stanowi w pełni przekonującą identyfikację tych struktur.

Podawanie znakowanych poliamin, czy amin, i badanie powstałych znakowanych pochodnych glutamylaminowych jest wygodną i użyteczną techniką śledzenia aktywności TG w żywej komórce. Pozwoliło to na stwierdzenie wzrostu inkorporacji trytowanej putrescyny do białek w jajach jeżowca po jego zapłodnieniu [14]. Podobnie po wstrzyknięciu [ $^3\text{H}$ ] putrescyny do neuronu olbrzymiego R2 *Aplysia* zidentyfikowano znakowaną  $\gamma$ -glutamylputrescynę i  $\gamma$ -glutamylspermidynę, oraz ich bis(glutamyl)poliaminowe odpowiedniki [26]. Komórki tuczne PT18 po podaniu znakowanej histydyny lub histaminy syntetyzowały  $\gamma$ -glutamylhistaminę, co było skorelowane z aktywnością TG [27]. Wyniki tych badań nie świadczą bezpośrednio o obecności kowalencyjnie włączonych amin, a jedynie wskazują na możliwość takiej modyfikacji. Są jednak dowodem na aktywnie działającą *in vivo* TG. W przypadku jaj jeżowca [14], w których poziom putrescyny wzrasta po zapłodnieniu, a także komórek tucznych, w których histamina osiąga bardzo wysoki poziom [27] modyfikacja białek przez aminy jest wysoce prawdopodobna.

## V. Funkcja poliamin związanych kowalencyjnie z białkami

### V-1. Poliaminy jako inhibitory sieciowania białek

W latach 70-tych i na początku 80-tych, kiedy inkorporacja poliamin do białek w warunkach fizjologicznych w komórce nie była jeszcze udokumentowana, postrzegano aminy (zarówno mono- jak i poli-) jako skuteczne inhibitory TG, współzawodniczące z peptydowo związaną lizyną o miejsce aktywne enzymu. W praktyce stosowano więc aminy jako inhibitory sieciowania białek oprócz klasycznego inhibitora TG — dansylokadaweryny. Związek ten, powstały poprzez dansylację jednej z dwu grup aminowych macierzystej kadaweryny, nie tylko używa się do hamowania włączenia peptydu zawierającego lizynę do białek, ale również, dzięki obecności grupy dansylowej łatwo wykrywanej metodami fluorescencyjnymi, służy do detekcji TG np. na żelu po rozdziale elektroforetycznym [8], czy też do znakowania endogennych substratów TG [28].

Jak wykazano, alifatyczne aminy hamują sieciowa-

nie takich naturalnych substratów jak fibryna [29]. Putrescyna zapobiega sieciowaniu białek tworzących otoczkę w czasie końcowego różnicowania ludzkich keratynocytów [12]. Histaminę i cystaminę stosuje się jako inhibitory TG erytrocytów ludzkich, która katalizuje powstawanie polimeru białkowego w błonie, powodując zmianę kształtu erytrocytu [8].

U niektórych gryzoni, sieciowanie białek płynu nasieniowego powoduje ich koagulację i powstawanie czopu kopulacyjnego, śluzowatej struktury zamykającej wejście do pochwy samicy po kopulacji [11]. W płynie nasieniowym tych zwierząt spermidyna i spermina osiąga wysokie (mM) stężenie. Uważa się, że funkcja tych poliamin, poprzez kompetycję z resztami lizynowymi białek, polega na opóźnieniu koagulacji płynu nasieniowego, co zapobiega blokowaniu cewki moczowej w czasie wytrysku [11].

### V-2. Modulacja struktury i biologicznej aktywności białek przez poliaminy

Jak już wspomniano poliaminy mogą być włączone do białka bądź przez tylko jedną, bądź też przez obydwie swoje I rzędowe grupy aminowe, tworząc w tym ostatnim przypadku połączenia — mostki — między dwoma białkami. Jak się wydaje obydwie takie struktury występują w przyrodzie (Tabela 1).

W wyniku przyłączenia do białka poliaminy poprzez jedną grupę aminową dodatnio naładowana reszta  $\gamma$ -glutamylpoliaminy zastępuje obojętną resztę glutamylową białka substratowego. Taka modyfikacja może mieć daleko idące konsekwencje dla komórki gdy białko substratowe jest enzymem, inhibitorem czy aktywatorem procesów wewnątrzkomórkowych. Wsuwana jest także hipoteza, że zmieniona konformacja zmodyfikowanego przez poliaminę białka może stanowić sygnał w procesie szybkiej, wewnątrzkomórkowej degradacji białka, być może podobnie, jak to ma miejsce w przypadku połączeń białka z ubikwitiną [23].

Sieciowanie dwu białek może zachodzić zarówno poprzez wiązanie  $\gamma$ -glutamylolizynowe jak i bis-( $\gamma$ -glutamyl)poliaminowe. Pomimo wspólnego pochodzenia enzymatycznego te dwa rodzaje sieciowania różnią się między sobą [5]. Mostek bis-( $\gamma$ -glutamyl)poliaminowy ma strukturę bardziej rozciągniętą niż glutamylolizynowy, co umożliwia większą odległość pomiędzy dwoma usieciowanymi białkami. Co więcej, dodatni ładunek II rzędowej grupy aminowej spermidyny (czy sperminy) biorącej udział w wiązaniu może spełniać specyficzną funkcję biologiczną. Wreszcie w przypadku sieciowania białek poprzez wiązanie  $\gamma$ -glutamylolizynowe jedno białko dostarcza reszty glutamylowej, drugie zaś lizynowej. Inaczej w sieciowaniu poprzez  $\gamma$ -glutamylpoliaminę; każde z białek biorących w nim udział dostarcza grupę glutamylową (porównaj rozdział II), co przy dużej specyficzności enzymu wobec donora acylu, wyklucza możliwość



sieciowania przypadkowych białek.

Poliaminy, poprzez udział w sieciowaniu białek, stabilizują cytoszkielet. Na rolę poliamin w polimeryzacji filamentów aktynowych wskazują bowiem badania z użyciem auktotrofów poliaminowych komórek jajnika chomika chińskiego (CHO) [30]. W nieobecności poliamin w pożywce komórki te były niezdolne do replikacji, a w 90% komórek wiązki filamentów aktynowych i mikrotubul zanikały. O sieciowaniu białek cytoszkieletu za pośrednictwem poliamin świadczą też badania oczyszczonej tubuliny z mózgu szczura, która w obecności TG i putrescyny tworzyła mikrotubule [31].

W procesie końcowego różnicowania keratynocytów z utworzeniem zrogowaciałej otoczki komórkowej, oprócz wiązań glutamylolizynowych, tworzą się również wiązania bis-( $\gamma$ -glutamilo)spermidynowe, które w zdrowej skórze stanowią połowę tych pierwszych [5]. Proporcje te ulegają zmianie u pacjentów z łuszczycą charakteryzującą się zaburzeniami różnicowania keratynocytów i podniesionym poziomem poliamin w tej tkance. W keratynocytach osób chorych na łuszczycę liczba wiązań bis-( $\gamma$ -glutamilo)spermidynowych wzrasta kilkakrotnie przy niezmiennym poziomie wiązań glutamylolizynowych.

Aktywacja transglutaminazy epidermalnej związanej z błonami (TGI) będąca wynikiem wzrostu stężenia  $Ca^{2+}$  w pożywce mysich komórek epidermalnych indukuje ich różnicowanie [32]. Procesowi temu towarzyszy podwyższenie poziomu poliamin związanych kowalencyjnie z białkami przy spadku zawartości wolnych poliamin. Tak więc zarówno TG jak i poliaminy są istotne dla procesu różnicowania keratynocytów.

Poliaminy ułatwiają i przyspieszają naprawę uszkodzenia śluzówki żołądka i dwunastnicy szczura wywołanego stresem [33]. Śluzówka zwierząt poddanych stresowi charakteryzuje się nieciągłością powierzchni, nekrotycznym zakończeniem kosmków lub ich utratą, czy też uszkodzeniem powierzchniowych komórek (spęcznienie komórek, wakuolizacja cytoplazmy, piknotyczne jądra). O udziale i specyficznej roli, jaką grają poliaminy oraz TG w gojeniu śluzówki świadczy zahamowanie tego procesu zarówno przez  $\alpha$ -difluorometylornitynę (DFMO), specyficzny inhibitor biosyntezy poliamin, jak i jego opóźnianie przez inhibitor TG — danylokadawerynę. Co więcej, podanie spermidyny jednocześnie z DFMO znosi jej hamujący wpływ i zapewnia prawidłowy przebieg gojenia śluzówki, ale jedynie wówczas, gdy jest aktywna TG, a więc w nieobecności danylokadaweryny.

## VI. Indukcja transglutaminaz przez kwas retinowy, rola poliamin

Retinoidy,\*\* uważane za fizjologiczne regulatory wzrostu komórki, wywierają istotny wpływ na morfogenezę, proliferację i różnicowanie komórek prawidłowych i nowotworowych [34].

Molekularne podstawy działania kwasu retinowego wydają się być związane ze zmianą ekspresji pewnych genów (*retinoic acid-responsive genes*). Takim genem jest m.in. gen transglutaminazy tkankowej (tTG), lecz nie dotyczy to genu transglutaminazy związanej z błonami (TGI). Indukcja tTG, szczególnie spektakularna w makrofażach stymulowanych kwasem retinowym (100-krotny wzrost aktywności tTG), jest następstwem zwiększonej transkrypcji genu tTG i podwyższonego poziomu mRNA specyficznego dla tTG [35]. Modulacja ekspresji genu tTG zachodzi za pośrednictwem jądrowych receptorów kwasu retinowego [36], z superrodziny jądrowych receptorów hormonów sterydowych i hormonów tarczycy [34]. Jądrowe receptory retinoidów, których ekspresja jest regulowana przez kwas retinowy [36], działają jako czynniki transkrypcyjne przyłączając się w postaci heterodimerów do specyficznych sekwencji nukleotydowych genów docelowych [34].

Kwas retinowy dodany do hodowli mysich komórek epidermalnych indukuje tTG (lecz nie indukuje TGI), podwyższa proliferację tych komórek i zapobiega ich różnicowaniu [32]. W rezultacie, podczas gdy w komórkach kontrolnych tTG stanowi jedynie 5% ogólnej aktywności TG, to po stymulacji kwasem retinowym wartość ta wzrasta do 80%. Wzrasta również poziom wolnej putrescyny na skutek jej zwiększonego pobierania i aktywacji interkonwersji poliamin [37], a nie podwyższonej biosyntezy. Zastanawiające jest, że mimo powyższych warunków sprzyjających sieciowaniu obserwuje się w tych komórkach niewiele białek zmodyfikowanych poliaminami. Zgodnie z roboczą hipotezą może to być związane z brakiem specyficznego białka substratowego, którego biosynteza byłaby kontrolowana przez kwas retinowy [32].

W wątrobie szczura stosunki ilościowe dwóch form TG są odwrotne niż w komórkach epidermalnych [38]. Forma przeważająca (70%) — tTG jest indukowana przez kwas retinowy podany jednorazowo zwierzęciu. Wyróżniono dwie fazy indukcji tTG w wątrobie — wczesną, będącą wynikiem aktywacji już istniejącego białka enzymatycznego, oraz późną, związaną z jego syntezą *de novo*. Podobnie jak w mysich komórkach epidermalnych [32] również w wątrobie, a także w komórkach neuroblastoma [37], po podaniu kwasu retinowego obserwuje się wzrost ogólnego poziomu putrescyny (tj. putrescyny niezwiązanej i związanej z białkami). Może to świadczyć o udziale poliamin w indukcji ekspresji tTG zwłaszcza, że zaobserwowano korelację pomiędzy obniżonym poziomem poliamin przez DFMO a zahamowaniem ekspresji tTG [37]. Na modulacyjną rolę poliamin w indukcji tTG przez kwas retinowy wydają się też wskazywać

\* regulacje procesów wzrostu i różnicowania przez kwas retinowy omawia J. Kwiatkowska na łamach *Post Biochem* 38(1992) 32-36

wyniki badań *in vitro* różnicowania ludzkich monocytów krwi obwodowej do makrofagów [39]. Proces ten jest przyspieszony przez kwas retinowy, a towarzyszy mu indukcja tTG. Nie obserwuje się jej jednak, gdy jednocześnie z induktorem dodaje się do pożywki DFMO obniżającą wewnątrzkomórkowy poziom putrescyny i spermidyny. Wzbogacenie pożywki w te poliaminy w obecności kwasu retinowego przywraca indukcję ekspresji tTG.

Podane przykłady wskazują, że kwas retinowy może wywołać różne efekty w różnych systemach komórkowych. Oprócz indukcji różnicowania komórek lub ich proliferacji kwas retinowy może indukować apoptozę (porównaj rozdział VII), tak jak to się dzieje w przypadku komórek neuroblastoma [40, 41]. Komórki te w hodowli *in vitro* wytwarzają dwa odrębne biochemicznie i morfologicznie fenotypy N i S. Regulacja ekspresji genu tTG przez kwas retinowy dotyczy tylko komórek o fenotypie S charakteryzujących się zwiększoną adhezją. W komórkach tych kwas retinowy indukuje tTG oraz apoptozę [40]. W komórkach N typu neuronalnego z charakterystycznymi wypustkami kwas retinowy nie indukuje tTG, lecz stymuluje ich różnicowanie.

## VII. Udział transglutaminaz w programowanej śmierci komórek

Apoptoza, termin użyty po raz pierwszy w 1972 roku, oznacza genetycznie programowaną śmierć komórki zachodzącą na drodze jej autodestrukcji [42-48]. Ten ewolucyjnie konserwatywny proces fizjologiczny odgrywa istotną rolę w rozwoju embrionalnym i metamorfozie, w homeostazie tkankowej, inwolucji hiperplastycznych narządów, eliminacji komórek preneoplastycznych, czy w regresji nowotworu.

Apoptoza jest procesem aktywnym wymagającym syntezy makrocząsteczek (RNA, białka) związanych z ekspresją specyficznych genów. Śmierć apoptyczną rozpoczyna selektywny i szybki eksport jonów i wody z komórki (utrata 1/3-1/2 objętości w ciągu kilku minut) prowadzący do kondensacji cytoplazmy i wzrostu gęstości komórki. Równolegle zachodzi kondensacja i fragmentacja chromatyny (przy udziale aktywowanych endonukleaz\*\*), zaś apoptyczna komórka tworzy ciała apoptyczne (*apoptotic bodies*) z charakterystyczną wysoce usieciowaną białkową otoczką (*envelope, scaffold*). Ciała apoptyczne, zawierające fragmenty jądra oraz nieuszkodzone organelle takie jak mitochondria czy lizosomy, ulegają fagocytozie przez sąsiednie komórki czy makrofagi. Usieciowiona otoczka ciałek apoptycznych, odporna na proteolizę, zapobiega uwalnianiu potencjalnie szkodliwych wewnątrzkomórkowych makrocząsteczek do przestrzeni

międzykomórkowych i krwioobiegu.

Sieciowanie białek w ciałkach apoptycznych zachodzi przy udziale tTG, która ulega aktywacji w czasie apoptozy. Indukcja i aktywacja tTG (przez  $Ca^{2+}$ , którego stężenie wzrasta w czasie apoptozy) jest częścią biochemicznego programu eliminacji komórek przez apoptozę. Pomiedzy apoptozą komórek (mierzoną tzw. indeksem apoptycznym, czyli ilością ciałek apoptycznych/ $10^3$  komórek), a aktywnością tTG oraz ilością białka enzymatycznego zachodzi ścisła korelacja. Zależność taką stwierdzono w różnych komórkach podlegających apoptozie; m.in.: w stymulowanych epidermalnym czynnikiem wzrostu komórek wątroby szczurzych noworodków [49], w hiperplastycznej wątrobie szczura ulegającej inwolucji [50], w traktowanych glukokortykoidem tymocytach szczura [50], w chemicznych komórkach fibrosarcoma i mysich komórkach melanoma [51], czy też w ludzkich komórkach nowotworowych indukowanych do apoptozy kwasem retinowym [41].

Degradacja hepatocytów szczurzych umierających śmiercią apoptyczną prowadzi do akumulacji w pożywce izodipeptydu glutamylolizynowego [52]. Ten proteolityczny produkt usieciowanych białek wyodrębniono również z surowicy szczurów, w których inwolucja hiperplastycznej wątroby była wynikiem apoptycznej śmierci hepatocytów [52]. Taka przejściowa akumulacja izodipeptydu glutamylolizynowego może być uważana za miarę częstotliwości apoptozy w układach biologicznych, obok aktywności TG, która jest użytecznym markerem biochemicznym tego procesu.

Wysoce usieciowana białkowa otoczka ciałek apoptycznych warunkuje ich niezwykle wysoką odporność fizyko-chemiczną, którą wykorzystano do ich izolowania z populacji komórkowej w procedurze polegającej na gotowaniu w redukującym roztworze 2% SDS [51]. Apoptyczne hepatocyty stają się nierozpuszczalne w detergentach, czynnikach chaotropowych, takich jak mocznik czy chlorowodorek guanidyny, i w związkach redukujących [53]. Pod mikroskopem kontrastowo-fazowym widoczne są jako pomarszczone, nieregularne, sferyczne struktury, morfologicznie zbliżone do zrogowaciałych otoczek keratynocytów.

Sieciowanie białek otoczki apoptycznej zachodzi zarówno poprzez wiązania glutamylolizynowe, jak i bis( $\gamma$ -glutamyl)spermidynowe [53], oraz bis( $\gamma$ -glutamyl)sperminowe [41]; ponadto zarówno putrescyna jak i spermina są kowalencyjnie, poprzez jedną grupę  $NH_2$  włączane do białek ciałek apoptycznych [41].

DFMO i kwas retinowy wywierają wyraźny, choć przeciwny efekt na ekspresję tTG i na apoptozę [41]. Tak więc w ludzkich komórkach nowotworowych obniżeniu poziomu poliamin wywołanemu przez DFMO towarzyszy spadek aktywności tTG, zaś apoptoza staje się niewykrywalna. Natomiast kwas retinowy podwyższając wszystkie te parametry indukuje apoptozę. Wyniki te potwierdzają raz jeszcze zależność

\* O roli endonukleaz w apoptozie pisali R. Zepcecki, R. Szmidziński i J. Szopa w *Post Biochem* 37(1991) 18-22

pomiędzy wewnątrzkomórkowym poziomem poli-amin a ekspresją tTG, a także apoptozą.

## VIII. Transglutaminazy w komórkach nowotworowych

Komórki i tkanki nowotworowe wykazują obniżoną aktywność tTG w porównaniu z ich prawidłowymi odpowiednikami [51]. W przypadku chemicznych komórek *fibrosarcoma* i szczyrzych komórek *sarcoma* jest to spowodowane obecnością nieaktywnego enzymu, którego obecność stwierdzono w ekstraktach komórkowych rozdzielanych chromatograficznie [54]. Znalaziono trzy formy antygeny TG różniące się masą cząsteczkową, z których tylko dwie wykazywały aktywność TG i odpowiadały TGI i TGII. Trzecia nieaktywna forma, w wyniku ograniczonej proteolizy ulegała aktywacji i przekształceniu w TGII. Wydaje się, że obecność nieaktywnej enzymatycznie formy TG w komórkach nowotworowych, której nie stwierdzono w wątrobie szczura, jest wynikiem zaburzonej na poziomie transkrypcyjnym lub posttranskrypcyjnym ekspresji genu [54].

Badając *in vitro* komórki nowotworowe różniące się zdolnością do tworzenia przerzutów stwierdzono odwrotną zależność pomiędzy aktywnością tTG a potencjałem przerzutowania komórki [51]. Komórki z obniżoną aktywnością tTG, o podwyższonej zdolności do przerzutów, cechowała wyraźnie obniżona apoptoza. Jak się zatem wydaje związany z aktywnością tTG nieprawidłowy przebieg apoptozy, zaburzający równowagę pomiędzy proliferacją komórek i ich śmiercią, może stanowić ważną cechę fenotypową niezbędną dla progresji nowotworu [51]. Hipoteza o istotnej roli jaką pełni programowana śmierć komórki w kontroli proliferacji komórkowej znalazła niedawno swe potwierdzenie, gdy wykazano, że działanie szeregu leków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej związane jest z indukcją apoptozy [55, 56].

Wysuwana jest również sugestia, że niekontrolowana proliferacja komórek nowotworowych, które cechuje wysoki poziom poliamin, wynika z nieprawidłowej, podwyższonej ich inkorporacji do białek w miejsce peptydowo związanej lizyny [57]. W komórkach B16 melanoma zahamowanie biosyntezy poliamin przez DFMO podwyższało liczbę wiązań glutamylolizynowych w białkach, oraz hamowało proliferację komórek i drastycznie redukowało ich potencjał metastatyczny [57]. Należy jednak zaznaczyć, że w komórkach tych jednocześnie była aktywowana teofilina tTG, co mogło podwyższać apoptozę. Tak więc te interesujące badania wymagają dalszego potwierdzenia.

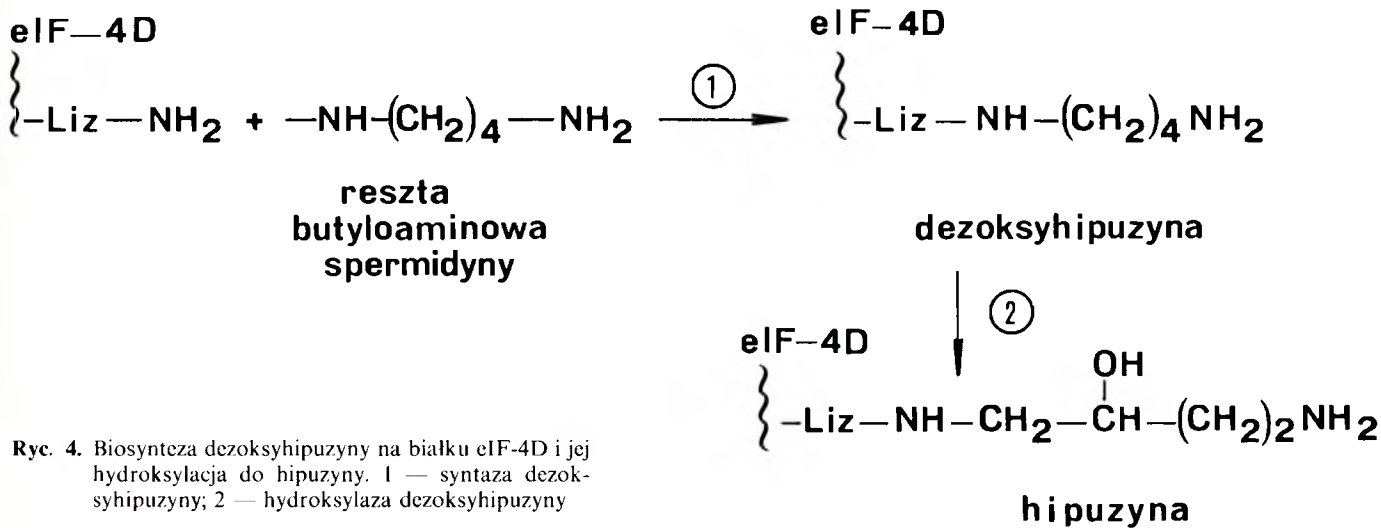
## IX. Uwagi końcowe

Przedstawione dane eksperymentalne wskazują na

niewątpliwą modyfikację własności i funkcji fizjologicznych białek przez kowalencyjne przyłączenie poli-amin. Czy jednak takie związanie poliamin z białkiem może być również mechanizmem utrzymującym ich homeostazę komórkową? Takie przypuszczenia są istotnie wysuwane, a wydaje się je uzasadniać aktywacja TG w wątrobie świnki morskiej po zablokowaniu przez inhibitory głównych szlaków katabolicznych histaminy i putrescyny [58]. Można spekulować, czy taki mechanizm regulacji wewnątrzkomórkowego poziomu poliamin i innych amin biogennych funkcjonuje w warunkach fizjologicznych. Działalby on jednak praktycznie tylko w jednym kierunku — obniżenia stężenia poliamin, ponieważ wiązania glutamylolizynowe (jak i glutamylolizynowe) są niezwykle trwałe i odporne na proteolizę, co było wielokrotnie podkreślane. Możliwe jest co prawda enzymatyczne uwolnienie związanej kowalencyjnie poliamin, ale musiałby ją poprzedzać etap degradacji, czyli proteoliza usieciowanego białka. Powstała w wyniku proteolizy glutamylolizynowa jest dopiero substratem  $\gamma$ -glutamylolizynotransferazy [59], której wysoką aktywność stwierdza się m.in. w nerce [60]. Ostatnio wykryto jeszcze inną możliwość degradacji wiązań  $\gamma$ -glutamylolizynowych, która zachodzi przy udziale oksydazy poliaminowej (PAO) zależnej od FAD [25]. PAO z wątroby szczura odszczepia *in vitro* poliaminę z peptydowo związanej  $\gamma$ -glutamylolizyny i  $\gamma$ -glutamylolizyny [25].

Na zakończenie należy dodać, że posttranslacyjne modyfikacje białek, w które zaangażowane są poli-amin, mogą przebiegać dwoma szlakami metabolicznymi, przy czym tylko jeden z nich, będący przedmiotem tego artykułu, zachodzi przy udziale transglutaminaz. W drugim szlaku fragment butyloaminowy pochodzący ze spermidyny zostaje przyłączony kowalencyjnie, w reakcji niezależnej od TG, do peptydowo związanej lizyny tworząc dezoksyhipuzynę, która następnie ulega hydroksylacji do hipuzyny (Ryc. 4) [61]. W komórkach ssaków hipuzyna tworzy się zawsze posttranslacyjnie na jednym białku, eukariotycznym czynniku inicjacji translacji 4D (eIF-4D) o masie cząsteczkowej 18 kD. Znana jest sekwencja aminokwasowa czynnika 4D wokół pojedynczej reszty hipuzyny, jednak dokładna funkcja tego czynnika nie jest wyjaśniona, choć wiadomo, że ma niewątpliwą związek z syntezą białka w aktywnie proliferujących komórkach. W intensywnie dzielących się komórkach, w przeciwieństwie do komórek spoczynkowych, większość podawanej radioaktywnej putrescyny czy spermidyny odnajdywano właśnie w hipuzynie [3, 8, 21, 32]. Ostatnio wykazano, że dezoksyhipuzyna i hipuzyna, zarówno w formie wolnej jak i związanej z eIF-4D, są substratami tTG z wątroby świnki morskiej, zaś związki powstałe w wyniku proteolizy eIF-4D z kowalencyjnie związaną hipuzyną zidentyfikowano jako  $\gamma$ -glutamylolizynę i  $\gamma$ -glutamylolizynę [61]. Wolno przypuszczać, że zachodzące przy udziale tTG sieciowanie





Ryc. 4. Biosynteza dezoksyhipuzyny na białku eIF-4D i jej hydroksylacja do hipuzyny. 1 — syntaza dezoksyhipuzyny; 2 — hydroksylaza dezoksyhipuzyny

eIF-4D ze specyficznym białkiem, donorem grupy glutamylowej, może zmieniać fizjologiczne własności tego czynnika. Tym samym otwiera się nowe pole przyszłych badań nad rolą tTG oraz poliamin w biologicznej aktywności eIF-4D.

Artykuł otrzymano 17 marca 1993 r.

Zaakceptowano do druku 6 kwietnia 1993 r.

## Piśmiennictwo

1. Jänne J, Pösö H, Raina A (1978) *Biochim Biophys Acta* **473**: 241-293
2. Tabor CW, Tabor H (1984) *Annu Rev Biochem* **53**: 749-790
3. Pegg AE (1986) *Biochem* **234**: 249-262
4. Pegg AE (1988) *Cancer Res* **48**: 759-774
5. Beninati S, Folk JE (1988) W: Zappia V, Pegg AE (red) *Progress in Polyamine Research*. Plenum Publishing Corp. str 411-422
6. Davies PJA, Chiocca EA, Basilion JP, Poddar S, Stein JP (1988) W: Zappia V, Pegg AE (red) *Progress in Polyamine Research*. Plenum Publishing Corp. str 391-401
7. Folk JE (1980) *Annu Rev Biochem* **49**: 517-531
8. Lorand L, Conrad SM (1984) *Mol Cel Biochem* **58**: 9-35
9. Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH (1991) *FASEB J* **5**: 3071-3077
10. Ichinose A, Bottenus RE, Davie EW (1990) *J Biol Chem* **265**: 13411-13414
11. Williams-Ashman HG (1984) *Mol Cel Biochem* **58**: 51-61
12. Rice RH, Green H (1978) *J Cell Biol* **76**: 705-711
13. Thacher SM, Rice RH (1985) *Cell* **40**: 685-695
14. Cariello L, Wilson J, Lorand L (1984) *Biochemistry* **23**: 6843-6850
15. Nara K, Nakamishi K, Hagiwara H, Wakita K, Kojima S, Hirose S (1989) *J Biol Chem* **264**: 19308-19312
16. Gentile V, Thomazy V, Piacentini M, Fesus L, Davies PJA (1992) *J Cell Biol* **119**: 463-474
17. Cai D, Ben T, De Lucca LM (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **175**: 1119-1124
18. Romijn JC (1990) *Andrologia* **22**: 83-91
19. Piacentini M, Beninati S (1988) *Biochem J* **249**: 813-817
20. Beninati S, Piacentini M, Argento-Ceru MP, Russo-Caia S, Autuori F (1985) *Biochim Biophys Acta* **841**: 120-126
21. Folk JE, Park MH, Chung I, Schrode J, Lester EP, Cooper HL (1980) *J Biol Chem* **255**: 3695-3700
22. Kremzner LT, Roy D, Spector A (1982) *Fed Proc* **41**: 676, abstr. 2374
23. Beninati S, Piacentini M, Cocuzzi ET, Autuori F, Folk JE (1988) *Biochim Biophys Acta* **952**: 325-333
24. Dinella C, Serafini-Fracassini D, Grandi B, Del Duca S (1992) *Plant Physiol Biochem* **30**: 531-539
25. Beninati S, Mantile G, Desantis A, Abbruzzese A (1992) *Life Chem Rep* **10**: 29-37
26. Ambron RT, Kremzner LT (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 3442-3446
27. Fesus L, Szucs EF, Barrett KE, Metcalfe DD, Folk JE (1985) *J Biol Chem* **260**: 13771-13778
28. Lorand L, Hsu LKH, Siefring GE, Rafferty NS (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 1356-1360
29. Lorand L, Rule NG, Ong HH, Furlanetto R, Jacobsen A, Downey J, Oner N, Bruner-Lorand J (1968) *Biochemistry* **7**: 1214-1223
30. Pohjanpelto P, Virtanen I, Hölttä E (1981) *Nature (Lond)* **293**: 475-477
31. Maccioni RB, Seeds NW (1986) *Mol Cel Biochem* **69**: 161-168
32. Piacentini M, Martinet N, Beninati S, Folk JE (1988) *Biol Chem* **263**: 3790-3794
33. Wang JY, Johnson LR (1992) *Am J Physiol* **262**: G818-G825
34. De Luca LM (1991) *FASEB J* **5**: 2924-2933
35. Chiocca EA, Davies PJA, Stein JP (1988) *J Biol Chem* **263**: 11584-11589
36. Verma AK, Shoemaker A, Simsiman R, Denning M, Zachman RD (1992) *J Nutr* **122**: 2144-2152
37. Melino G, Farrace MG, Ceru MP, Piacentini M (1988) *Exp Cell Res* **179**: 429-445
38. Piacentini M, Fesus L, Sartori C, Ceru MP (1988) *Biochem J* **253**: 33-38
39. Ientile R, Merendino RA, Fabiano C, Di Giorgio RM, Macaione S (1992) *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **77**: 313-326
40. Piacentini M, Annicchiarico-Petruzzelli, Oliverio S, Piredda L, Biedler JL, Melino G (1992) *Int J Cancer* **52**: 271-278
41. Piacentini M, Fesus L, Farrace MG, Ghibelli L, Piredda L, Melino G (1991) *Europ J Cell Biol* **54**: 246-254
42. Fesus L, Davies PJA, Piacentini M (1991) *Europ J Cell Biol* **56**: 170-177
43. Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR (1991) *Annu Rev Cell Biol* **7**: 663-698
44. Fesus L (1992) *Immunol Today* **13**: A16-A17
45. Yyllie AH (1992) *Cancer Metastasis Rev* **11**: 95-103
46. Bursch W, Kleine L, Tenniswood M (1990) *Biochem Cell Biol* **68**: 1071-1074
47. Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R (1992) *TIPS* **13**: 245-251
48. Lockshin RA, Zakeri ZF (1990) *J Geront: Biol Sci* **45**: B135-B140
49. Piacentini M, Autuori F, Dini L, Farrace MG,

Ghibelli L, Piredda L, Fesus L (1991) *Cell Tissue Res* **263**: 227-235

50. Fesus L, Thomazy V, Falus A (1987) *FEBS Lett* **224**: 104-108

51. Knight CRL, Rees RC, Griffin M (1991) *Biochim Biophys Acta* **1096**: 312-318

52. Fesus L, Tarcsa E, Kedei N, Autuori F, Piacentini M (1991) *FEBS Lett* **284**: 109-112

53. Fesus L, Thomazy V, Autuori F, Ceru MP, Tarcsa E, Piacentini M (1989) *FEBS Lett* **245**: 150-154

54. Knight CRL, Rees RC, Elliott BM, Griffin M (1990) *Biochim Biophys Acta* **1053**: 13-20

55. Barry MA, Behnke CA, Eastman A (1990) *Biochem Pharmacol* **40**: 2353-2362

56. Sen S, D'Incalci M (1992) *FEBS Lett* **307**: 122-127

57. Beninati S, Mantile G, Passeggio A, Abbruzzese A (1992) W: Symposium on the Physiological Role of Polyamines, Padova, str 34

58. Sasiak K, Fogel WA (1992) Agents Actions, Special Conference Issue C398-C401

59. Fink ML, Folk JE (1983) *Methods Enzymol* **94**: 347-351

60. Fink ML, Chung SL, Folk JE (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 4564-4568

61. Beninati S, Mantile G, Di Rao M, Ciaramella C, Abbruzzese A (1991) *Life Chem Rep* **9**: 253-259

# Białka wiążące wapń występujące w układzie nerwowym<sup>2</sup>

## Calcium binding proteins in nervous system

ANNA FILIPEK<sup>1</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp — klasyfikacja białek wiążących wapń
- II. Kalmodulina i niektóre enzymy zależne od kalmoduliny
  - II-1. Kinaza II zależna od wapnia i kalmoduliny
  - II-2. Kalcyneuryna
  - II-3. Cyklaza adenylanowa typu I
- III. Rekoweryna a aktywacja cyklazy guanylanowej
- IV. Białka wiążące wapń o mniej znanych funkcjach
  - IV-1. Kalbindyna D-28K
  - IV-2. Kalretinina
  - IV-3. Parwalbumina
  - IV-4. Przypuszczalna rola kalbindyny D-28K, kalretininy i parwalbuminy w układzie nerwowym
- V. Rodzina białek S-100
- VI. Aneksyny — białka wiążące wapń i fosfolipidy
- VII. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction — classification of calcium binding proteins
- II. Calmodulin and some calmodulin dependent enzymes
  - II-1. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II
  - II-2. Calcineurin
  - II-3. Type I of adenylate cyclase
- III. Recoverin and guanylate cyclase activation
- IV. Calcium binding proteins with less known functions
  - IV-1. Calbindin D-28K
  - IV-2. Calretinin
  - IV-3. Parvalbumin
  - IV-4. Possible role of calbindin D-28K, calretinin and parvalbumin in nervous system
- V. S-100 proteins family
- VI. Annexins — calcium and phospholipid binding proteins
- VII. Summary

<sup>1</sup> dr, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

<sup>2</sup> Wykorzystano materiały z wykładu wygłoszonego przez prof. J. Kuźnickiego na sympozjum pt. „Molekularne i fizjologiczne aspekty regulacji neurohormonalnej”; Kraków, wrzesień 1992.

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

**Wykaz stosowanych skrótów:** CaBP — białka wiążące wapń; CNS — ośrodkowy układ nerwowy; LTP — zjawisko długotrwałego wzmocnienia synaptycznego; NMDA — kwas N-metylo-D-asparaginowy; GABA — kwas  $\gamma$ -aminomasłowy; NGF — czynnik wzrostu nerwu; cAMP — cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan; cGMP — cykliczny 3',5'-guanozynomonofosforan; MAP2, tau — białka związane z mikrotubulami.

## I. Wstęp — klasyfikacja białek wiążących wapń

Jony wapnia odgrywają istotną rolę w przekazywaniu sygnałów przez błonę komórkową oraz w regulacji różnych procesów fizjologicznych wewnątrz komórki. Na wzrost stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie reagują specyficzne białka wiążące wapń. Są wśród nich białka zawierające tzw. domeny "EF-hand" — struktury o charakterystycznej budowie, składające się z dwóch odcinków alfa helisy i pętli łączącej — [1-4] oraz białka, które nie posiadają takich wyspecjalizowanych struktur, a mimo to wiążą jony wapnia [5]. Do pierwszej grupy zalicza się m.in. kalmodulinę, rekowerynę, kalbindynę D-28K, kalretininę, parwalbuminę oraz białka z rodziny S-100. Przedstawicielami białek wiążących wapń nie posiadających typowych domen "EF-hand" są aneksyny.

Funkcja większości białek wiążących wapń w układzie nerwowym nie jest wyjaśniona, jednak na podstawie dostępnych informacji można wyróżnić białka, które regulują różne procesy enzymatyczne tak jak kalmodulina, oraz białka, które pełnią inne funkcje w komórce tak jak kalbindyna D-28K i parwalbumina. Białka należące do tej drugiej grupy są obecnie w centrum uwagi neurobiologii ze względu na ich specyficzną lokalizację w pewnych zespołach neuronów lub komórek glejowych. Ponadto sugeruje się, że w stanach patologicznych, którym towarzyszy podwyższone stężenie wolnych jonów wapnia w komórce, białka te mogą chronić komórki przed uszkodzeniem. W artykule tym zebrano informacje na temat właściwości, występowania oraz możliwej funkcji głównych białek

wiązących wapń występujących w układzie nerwowym (Tab. I).

## II. Kalmodulina i niektóre enzymy zależne od kalmoduliny

Kalmodulina występuje we wszystkich komórkach eukariotycznych, podczas gdy inne białka wiążące wapń występują tylko w tkankach lub specyficznych komórkach określonych organizmów. To powszechne występowanie kalmoduliny jest związane z jej wielofunkcyjnością [6-8]. Po związaniu jonów wapnia kalmodulina aktywuje wiele enzymów, m.in. kinazy i fosfatazy białkowe oraz oddziałuje z białkami strukturalnymi [9]. W nielicznych przypadkach kalmodulina może wiązać się z białkami w nieobecności jonów wapnia [10, 11]. Sugeruje się nawet, że niektóre procesy jak np. podziały komórkowe mogą być zależne od kalmoduliny bez wapnia [12]. Jednak, w układzie nerwowym, istotne funkcje pełni kalmodulina dopiero po związaniu z jonami wapnia. Poniżej omówiono trzy enzymy ważne dla funkcjonowania układu nerwowego, których aktywność jest regulowana przez kompleks kalmodulina-wapń.

### II-1. Kinaza II zależna od wapnia i kalmoduliny

Kinaza II zależna od wapnia i kalmoduliny występuje w dużych ilościach w tkance nerwowej [13, 14]. W niektórych częściach mózgu, np. hipokampie, który jest szczególnie ważny w procesach uczenia się i pamięci, kinaza II stanowi 2% wszystkich białek. Enzym ten występuje w komórce we frakcji rozpuszczalnej, a tak-

Tabela 1.

Niektóre własności białek wiążących wapń występujących w układzie nerwowym.

CaBP	Ciężar cząsteczkowy	liczba domen "EF-hand"		Występowanie
		na podstawie sekwencji	zdolnych do wiązania Ca <sup>+</sup>	
kalmodulina	16 700	4	4	wszystkie komórki Eukaryota
rekoweryna	23 000-26 000	4	3	siatkówka
kalbindyna	28 000	6	4	w wielu tkankach: nabłonku jelita, nerce, tkance nerwowej
kalretinina	29 000-31 000	6	4	tkanka nerwowa; inne tkanki (?)
parwalbumina	13 000	3	2	tkanka mięśniowa, komórki niemięśniowe w tym tkanka nerwowa
białka S-100	9 000-14 000	2	2	w wielu tkankach i komórkach
aneksyny	30 000-70 000	brak domen "EF-hand"; wiązanie wapnia przez inne struktury		w wielu tkankach i komórkach



że może być połączony z błoną komórkową, jądrową i elementami cytoszkieletu. Stosunek między ilością enzymu z frakcji rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej zależy od stanu funkcjonalnego komórki. I tak np. w czasie niedotlenienia kinaza II z frakcji rozpuszczalnej zanika bardzo szybko, podczas gdy enzym związany z błonami — wolno [15]. *In vitro* kinaza II fosforyluje różne białka jak np. synapsynę, MAP2, hydroksylazę tyrozynową, syntazę glikogenu, fosfolamban. Niektóre z tych białek wydają się być również substratami *in vivo*, a zmiany w stopniu ich ufosforylowania wpływają m.in. na syntezę i uwalnianie neurotransmiterów.

Kinaza II jest heteropolimerem składającym się zasadniczo z podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  o masach od 50 do 62 kDa. Każda z podjednostek zawiera domenę regulatorową i katalityczną. Domena regulatorowa kinazy przypominająca w swej strukturze substrat, pełni rolę autoinhibitora blokującego centrum aktywne enzymu. Po związaniu kalmoduliny domena regulatorowa ulega autofosforylacji, w wyniku czego centrum aktywne kinazy zostaje odsłonięte, a enzym jest zdolny fosforylować różne substraty. W podobny sposób działają też inne kinazy białkowe [16]. Ponadto, autofosforylacja domeny regulatorowej przekształca kinazę w formę niezależną od wapnia i kalmoduliny, co powoduje, że krótkotrwały wzrost stężenia jonów wapnia wywołuje długo trwającą aktywność enzymu. Również ograniczona proteoliza powoduje, że katalityczny fragment kinazy pozbawiony domeny autoinhibitorowej jest w pełni aktywny w nieobecności jonów wapnia i kalmoduliny. Autofosforylacja kinazy II i tworzenie form enzymu niezależnych od wapnia zachodzi w komórkach w hodowli i w skrawkach tkanki nerwowej [17].

Wysokie stężenie kinazy II w synapsach, szczególnie w zagęszczeniu postsynaptycznym (ang. *postsynaptic density*) przodomózgowia, gdzie enzym ten stanowi 20-50% wszystkich białek, sugeruje, że kinaza II odgrywa istotną rolę w regulacji procesów synaptycznych związanych z plastycznością CNS [18]. Plastyczność synaptyczna jest modyfikacją połączeń międzyneuronalnych w wyniku odpowiedzi na określony bodziec i może przybierać różne formy. Jedną z nich jest zjawisko długotrwałego wzmocnienia synaptycznego — LTP (ang. LTP od *long-term synaptic potentiation*) [19]. W większości synaps ośrodkowego układu nerwowego indukcja LTP zależy od receptorów NMDA (wrażliwych na kwas N-metylo-D-asparaginowy) połączonych z kanałami jonowymi. Co więcej, wiadomo, że indukcja LTP może być zahamowana poprzez obniżenie stężenia jonów wapnia lub przez wprowadzenie inhibitorów kalmoduliny do zagęszczenia postsynaptycznego.

Badania zapoczątkowane przez K a n d e l a i T o n e g a wę wskazują, iż kinaza II jest jednym z głównych czynników wpływających na procesy uczenia się i zapamiętywania [20, 21]. Wnioski takie wyciągnięto po przeprowadzeniu doświadczeń na myszach, którym

w rozwoju zarodkowym usunięto gen kodujący kinazę II. Zwierzęta takie po urodzeniu wyglądały normalnie, ale miały zaburzone reakcje związane z mechanizmem uczenia się i przestrzennej pamięci. Kontynuacja tego rodzaju badań nad kinazą II zależną od  $Ca^{2+}$  i kalmoduliny powinna w niedługim czasie dostarczyć nowych i przekonujących dowodów na to, że enzym ten jest szczególnie ważny w procesach związanych z plastycznością układu nerwowego.

## II-2. Kalcyneuryna

Kalcyneuryna to fosfataza zależna od wapnia i kalmoduliny [22-24]. Enzym ten jest heterodimerem składającym się z podjednostki A o masie 60 kDa i podjednostki B o masie 19 kDa. Podjednostka A wiąże kalmodulinę w obecności jonów wapnia i zawiera centrum aktywne, natomiast podjednostka B wiąże cztery jony wapnia podobnie jak kalmodulina i posiada nieokreśloną dotąd bliżej funkcję regulatorową. Kalcyneuryna, podobnie jak kinaza II, występuje w dużych ilościach w tkance nerwowej, np. w mózgu stanowi ponad 1% wszystkich białek. Występuje ona przede wszystkim w neuronach, zarówno we frakcji rozpuszczalnej, jak i nierozpuszczalnej. Kalcyneuryna jest fosfatazą serynowo-treoninową o wysokiej specyficzności substratowej. Enzym ten defosforyluje m.in. podjednostkę alfa kinazy fosforylasy, podjednostkę regulatorową kinazy A, białko MAP2, tau, kanał wapniowy wrażliwy na dihydropirydynę. Ostatnio wykazano, że aktywność kalcyneuryny jest hamowana przez kompleksy leków immunosupresyjnych z odpowiednimi białkami (np. przez kompleks cyklosporyny z cyklofiliną i FK506 z FKBP) [25]. Kompleksy te powodują tzw. efekt immunosupresyjny polegający na zahamowaniu wytwarzania limfocytów T [26, 27].

## II-3. Cyklaza adenylanowa typu I

Cyklaza adenylanowa typu I jest enzymem stymulowanym przez jony wapnia i kalmodulinę. Metodą hybrydyzacji *in situ* wykazano, że cyklaza adenylanowa typu I występuje w dużych ilościach w neuronach hipokampa mózgu szczura [28]. Sugeruje się, że aktywacja cyklazy zachodzi w odpowiedzi na wzrost stężenia wapnia wewnątrz komórki, a to z kolei powoduje wzrost stężenia cyklicznego AMP i aktywację kinazy białkowej A. Bezpośrednie dowody potwierdzające takie działanie uzyskano w doświadczeniach, w których do ludzkich komórek linii 293 wprowadzono gen kodujący cyklazę adenylanową typu I. Zaobserwowano, że stężenie cAMP w tych komórkach wzrastało po zastosowaniu jonoforu wapniowego i po podwyższeniu stężenia wapnia na zewnątrz komórki. Poziom cAMP w komórkach kontrolnych (komórkach linii 293 nie zawierających genu kodującego cyklazę adenylanową typu I) nie zmieniał się mimo wzrostu stężenia jonów wapnia. Ponadto wykazano, że

agoniści receptorów muskarynowych (np. karbachol, który powodował podwyższenie stężenia jonów wapnia) wywołują wzrost cAMP w komórkach 293 zawierających cyklazę adenylanową. Doświadczenia te potwierdzają, że *in vivo* cyklaza adenylanowa typu I jest stymulowana przez jony wapnia [29].

Udział cyklazy adenylanowej w procesach uczenia się i pamięci badano na przykładzie prostych organizmów. Stosunkowo najszerszej badano odruch chowania skrzela do jamy płaszczowej u ślimaka morskiego (*Aplysia*). Słaby bodziec dotykowy powiązany z następującym po nim szokiem elektrycznym powoduje, że po kilku próbach pojawia się odruch warunkowy, ale tylko wtedy, gdy bodziec bezwarunkowy następował ok. 0.5 s po bodźcu warunkowym. W połączeniach międzyneuronalnych powstaje wówczas tzw. wzmocnienie synaptyczne. Zjawisku temu towarzyszy znaczny wzrost ilości cAMP, który jest wynikiem zwiększonej aktywności cyklazy adenylanowej. Półsekundowa przerwa między bodźcami odpowiada czasowi, w którym dochodzi do syntezy cAMP [30, 31].

### III. Rekoweryna a aktywacja cyklazy guanylanowej

Rekoweryna jest białkiem wiążącym wapń występującym w siatkówce i prawdopodobnie determinującym wrażliwość cyklazy guanylanowej na wapń. Aktywność tej cyklazy i synteza cyklicznego GMP wzrasta, gdy stężenie jonów wapnia obniża się do 0.1  $\mu\text{M}$ . Tak więc w przeciwieństwie do kalmoduliny rekoweryna wydaje się aktywować cyklazę guanylanową w warunkach nietypowych, tj. przy niskich stężeniach jonów wapnia [32, 33]. Ostatnio sklonowano cDNA rekoweryny i wprowadzając go do genomu *E. coli* otrzymano znaczne ilości tego białka [34]. Dokonano także krystalizacji rekoweryny i określono strukturę trzeciorzędową tego białka. Wykazano, że składa się ono z dwu globularnych domen, z których każda zawiera dwie struktury "EF-hand" [35]. Najnowsze doniesienie o rekowerynie mówi, że białko to oddziałuje z błonami komórkowymi poprzez resztę kwasu tłuszczowego związanego kowalencyjnie z aminowym końcem białka [36].

Białkiem podobnym do rekoweryny zidentyfikowanym w siatkówce kurczaka jest wizynina i frekwenina (p26) [37, 38]. Frekwenina posiada trzy domeny "EF-hand", lecz tylko dwie z nich wydają się wiązać jony wapnia. W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że frekwenina z muszki owocowej (*Drosophila*) aktywuje cyklazę guanylanową w sposób zależny od jonów wapnia, podobnie jak rekoweryna. Badania immunologiczne z zastosowaniem przeciwciał na frekweninę wskazują na występowanie tego białka również w synapsach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Jednak funkcja frekweniny w synapsach nie jest wyjaśniona. Sugeruje się, że może ona brać udział w uwalnianiu neurotransmiterów z zakończeń ner-

wowych [39]. Jeszcze innym białkiem posiadającym wysoką homologię z rekoweryną (51%), występującym w dużych ilościach w mózgu jest neurokalcyna. Neurokalcyna ma masę 22 kDa i zawiera trzy domeny "EF-hand". Sugeruje się, że może ona pełnić podobną funkcję w CNS, jak rekoweryna i wizynina [40].

## IV. Białka wiążące wapń o mniej znanych funkcjach

### IV-1. Kalbindyna D-28K

Kalbindyna jest białkiem występującym w nabłonku jelita cienkiego oraz w wielu innych tkankach, a jej synteza w niektórych z nich wydaje się być regulowana przez witaminę D<sub>3</sub> (1,25-dihydroksywitaminę D<sub>3</sub>) [41]. W ostatnich latach dużo prac poświęcono występowaniu kalbindyny D-28K w komórkach układu nerwowego. Prowadzono też badania, w których porównywano występowanie kalbindyny D-28K w układzie nerwowym z występowaniem kalretininy i parwalbuminy [42-46].

W celu ilościowego oznaczenia poziomu kalbindyny D-28K, np. w tkankach szczura, stosowano wysoce czułą metodę immunologiczną pozwalającą na wykrycie 0.1 pg białka. Wykazano, że najwięcej kalbindyny występuje w nerce oraz tkance mózgowej. Ponadto zaobserwowano, że w czasie rozwoju embrionalnego szczura, w korze mózgowej, mózdzku oraz pniu mózgu 15-dniowych embrionów pojawiała się kalbindyna. Poziom tego białka wzrastał osiągając stały poziom w 4-5 tygodniu po urodzeniu. W późniejszym okresie zmiany w poziomie kalbindyny u szczura były niewielkie, podczas gdy stężenie tego białka w korze mózgowej człowieka znacznie malało wraz z wiekiem [47].

Wykazano, że neurony hipokampa zawierające kalbindynę D-28K są bardziej odporne na wzrost stężenia jonów wapnia, niż neurony nie mające tego białka [48, 49]. Np. podczas niedotlenienia, kiedy dochodzi do wzrostu stężenia jonów wapnia w komórce, kalbindyna zwiększa przeżywalność tych komórek, w których jest zlokalizowana [50]. Tym niemniej, w przewlekłych chorobach układu nerwowego takich jak choroba Alzheimera, Huntingtona czy Parkinsona ilość kalbindyny D-28K (czyli prawdopodobnie ilość komórek, które zawierają to białko) jest zmniejszona w objętych chorobą rejonach mózgu [51, 52].

### IV-2. Kalretinina

Kalretinina jest białkiem o wysokiej homologii z kalbindyną D-28K (58%). Po raz pierwszy gen kalretininy zidentyfikowano w siatkówce (ang. *retina*) kurczaka i stąd pochodzi nazwa tego białka. Występowanie tkankowe kalretininy jest inne niż kalbindyny pomimo dużego podobieństwa obu tych białek. Również w mózgu występuje ona w innych populac-

jach neuronów niż kalbindyna D-28K. Jest gęsto upakowana w komórkach zwojów czuciowych. W mózgu szczura, szczególnie w dużych ilościach kalretinina występuje w jądrze ślimakowym. Poza tym, zidentyfikowano ją w interneuronach kory mózgowej i hipokampa oraz w mózdzku i opuszkach węchowych [53-57].

Metodami immunochemicznymi badano lokalizację kalretininy w innych tkankach. Wykazano, że białko to występuje w komórkach splotu Auerbacha [58] oraz w komórkach śródmiąższowych jajnika szczura [59]. Ponadto wykazano obecność kalretininy w komórkach nowotworowych WiDr (linia komórek nowotworowych jelita grubego) [60]. Dla tych ostatnich komórek badano poziom kalretininy w różnych fazach cyklu komórkowego. Wykazano, że podczas mitozy komórek WiDr kalretinina znajduje się w cytoplazmie i wrzecionie mitotycznym. W cytoplazmie występuje tylko w fazach podziału komórkowego. Natomiast we wrzecionie mitotycznym kalretinina jest już obecna w prometafazie i we wszystkich kolejnych fazach mitozy.

#### IV-3. Parwalbumina

Parwalbuminę po raz pierwszy zidentyfikowano w mięśniach szkieletowych, a dopiero potem wyizolowano ją z komórek niemięśniowych, w tym z tkanki nerwowej [61]. W mózgu parwalbumina występuje m.in. w neuronach mózdzku, hipokampa, opuszek węchowych i niektórych rejonów podwzgórza. W mózdzku zlokalizowana jest w komórkach Purkinje'go oraz w komórkach gwiaździstych i koszyczkowych, natomiast w korze mózgowej w neuronach wszystkich warstw z wyjątkiem warstwy pierwszej. Wykazano, że w mózgu szczura dorosłego parwalbumina występuje w interneuronach zawierających GABA (kwas  $\gamma$ -aminomasłowy) [62].

W czasie rozwoju zarodkowego szczura, w niektórych częściach układu nerwowego, parwalbumina pojawia się w 13-tym dniu życia embrionu, a następnie jej poziom szybko wzrasta. W neuronach kory mózgowej i hipokampa zawierających GABA oraz w komórkach Purkinje'go mózdzku parwalbumina pojawia się dopiero po urodzeniu, a więc po różnicowaniu się komórek i utworzeniu połączeń międzyneuronalnych [63].

#### IV-4. Przypuszczalna rola kalbindyny D-28K, kalretininy i parwalbuminy w układzie nerwowym

Rola kalbindyny, kalretininy i parwalbuminy w układzie nerwowym nie jest jasna, jednak stwierdzono, że w neuronach hipokampa poziom tych białek koreluje z odpornością komórkową na uszkodzenia. Przypuszcza się więc, że białka te działają poprzez obniżenie stężenia jonów wapnia w cytoplazmie [51,

52]. W badaniach, które polegały na wprowadzeniu kalbindyny lub parwalbuminy do hodowanych neuronów i pomiarze stężenia wolnych jonów wapnia stwierdzono, że białka te rzeczywiście mogą buforować  $\text{Ca}^{2+}$  wewnątrz komórki [64].

Kalbindyna, kalretinina i parwalbumina zlokalizowane są w różnych subpopulacjach komórek w mózgu. Wysoki stopień homologii tych białek i ich różna lokalizacja w mózgu wskazują z jednej strony, iż mogą one pełnić podobne funkcje w różnych populacjach neuronów, np. buforować jony wapnia, z drugiej zaś strony sugerują możliwość zróżnicowanej funkcji każdego z tych białek. Dodatkowe informacje na ten temat może uda się uzyskać po zidentyfikowaniu białek wiążących się z kalbindyną, kalretiną i parwalbuminą. I tak np. sugeruje się możliwość oddziaływania kalbindyny D-28K i kanału wapniowego typu P w komórkach Purkinje'go [65].

Przeciwciała skierowane przeciwko kalbindynie, kalretininie i parwalbuminie, z uwagi na różną lokalizację tych białek mogą być stosowane jako znaczniki neuroanatomiczne [66, 67]. Białka te mają taką przewagę nad innymi znacznikami neuronalnymi, że są dobrze rozpuszczalne i widoczne nawet w cienkich wypustkach neuronów. Umożliwia to m.in. badanie kształtu komórek nerwowych i ich połączeń.

#### V. Rodzina białek S-100

Do rodziny białek S-100 zalicza się kilkanaście polipeptydów, które występują na ogół w określonym typie komórek [68]. Najlepiej poznane są białka: S-100 ( $\alpha$  i  $\beta$ ), kalbindyna D-9K, białko p11, kalcyklina. Monomer białka z rodziny S-100 zawiera dwie domeny „EF-hand” i może wiązać dwa jony wapnia. Większość białek S-100 ma zdolność do tworzenia dimerów, które mogą wiązać 4 jony wapnia. Geny kodujące białka S-100 są aktywowane tylko w określonej fazie cyklu komórkowego lub w przebiegu różnicowania. Niektóre białka z grupy S-100 znajdują się na zewnątrz komórek, co może świadczyć o ich funkcji pozakomórkowej.

Po raz pierwszy białko S-100 wyizolowano z tkanki nerwowej w 1965 roku [69]. Późniejsze badania wskazały, że białko to występuje w postaci trzech form S-100 $\alpha_0$ , S-100 $\alpha$  i S-100 $\beta$ , które składają się odpowiednio z podjednostek  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$  i  $\beta\beta$  [70]. W ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym białko S-100 $\beta$  występuje przede wszystkim w komórkach glejowych. Białko S-100 $\alpha$ , znajdujące w mózgu w małych ilościach (stanowi ok. 5% mieszaniny białek S-100 $\alpha$  i S-100 $\beta$ ), jest obecne w neuronach hipokampa oraz w neuronach obwodowego układu nerwowego [71]. Ponadto S-100 $\alpha$  występuje w znaczących ilościach w mięśniach szkieletowych, mięśniach sercowych i nerwach [72-74].

Dotychczas nie wyjaśniono, jaką funkcję pełnią białka S-100. Sugeruje się np., że mogą one regulować



procesy fosforylacji i defosforylacji białek mózgowych, oraz oddziaływać z systemem mikrotubulowym. W doświadczeniach, które polegały na zahamowaniu syntezy S-100 $\beta$  w komórkach glejaka C6 istotnie zaobserwowano znaczne zmniejszenie szybkości podziałów komórkowych, oraz zmianę w organizacji cytoszkieletu komórkowego [75]. W 1985 roku K l i g m a n i M a r s h a k pokazali, że homodimer białka S-100 $\beta$  może pełnić funkcję czynnika wydłużającego neuryty [76]. Wyniki te zostały potwierdzone przez v a n E l d i k i w s p. [77], którzy pokazali ponadto, że białko S-100 $\beta$  jest wydzielane przez komórki glejowe do pożywki i działa jako czynnik mitogeny. Nanomolowe stężenie białka S-100 $\beta$  w hodowli komórkowej stymulowało proliferację komórek glejaka C6 i pierwotnych astrocytów [78].

Podwyższony poziom białka S-100 $\beta$  obserwuje się w mózgu w różnych stanach patologicznych, takich jak choroba Downa i Alzheimer, a także w niektórych nowotworach [79, 80]. Wydaje się więc, że stosowanie przeciwciał specyficznych wobec białka S-100 $\beta$  może być wykorzystywane m.in. do identyfikacji różnych nowotworów układu nerwowego. Jak dotąd białko S-100 $\beta$  znaleziono tylko w nowotworach pochodzących z komórek glejowych, nie znaleziono w nowotworach wywodzących się z neuronów [81, 82].

Niewiele wiadomo na temat występowania i roli w układzie nerwowym innych białek z rodziny S-100. Badania prowadzone na komórkach PC12 (komórkach szczurzego guza chromochłonnego nadnerczy) pokazują, że pod wpływem NGF w komórkach tych pojawiają się trzy białka z rodziny S-100: 42A, 42C i kalcyklina [83-85]. W czasie różnicowania się tych komórek pod wpływem NGF poziom mRNA 42A wzrastał 25-krotnie, a mRNA 42C — 5-krotnie. Trzecie białko, kalcyklina, po raz pierwszy została wyizolowana z komórek raka Ehrlicha, a później wykazano, że występuje ona głównie w fibroblastach i komórkach nabłonkowych [86]. Badając komórki różnych linii nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma) T o n i n i i w s p. zaobserwowali wysoki poziom mRNA kalcykliny w komórkach typu S (podobnych do komórek nabłonkowych Schwanna), a znacznie niższy w komórkach typu N (embrionalnych komórkach nerwowych) [87]. Jednak po traktowaniu komórek typu N kwasem retinowym poziom kalcykliny kilkakrotnie wzrastał. Metodą Northerna wykazano też obecność mRNA kalcykliny w mózgu myszy [88], a badania immunohistochemiczne prowadzone na skrawkach mózgu szczura wskazują, że białko to występuje w neuronach [89].

## VI. Aneksyny — białka wiążące wapń i fosfolipidy

Aneksyny to białka o niskim powinowactwie względem jonów wapnia pełniące różnorodne funkcje w komórce. Wiązanie wapnia z tymi białkami znacznie wzrasta w obecności fosfolipidów, głównie fosfatydylo-

seryny [90, 91]. Białkom tym w przeszłości nadawano różne nazwy jak np. kalpaktyny, lipokortyny czy chromobidyny. Dopiero C r u m p t o n i D e d m a n w 1990 zaproponowali nazwę aneksyny [92]. Aneksyny nie zawierają domen „EF-hand”, a miejsca wiązania wapnia nie są w pełni zidentyfikowane. Struktura wiązania wapnia przewidywana na podstawie sekwencji aminokwasowej ma być domeną podobną do „EF-hand”, w której jon wapnia koordynowany jest przez karbonylowe atomy tlenu głównego łańcucha polipeptydowego [5]. Na podstawie badań krystalograficznych określono struktury III-rzędowe wielu aneksyn. Najnowsze badania sugerują też, że niektóre aneksyny mogą pełnić funkcję kanałów jonowych [93, 94].

Badania prowadzone w ciągu ostatnich lat wskazują, że niektóre aneksyny występują w tkance nerwowej i wykazują charakterystyczne rozmieszczenie zależne od typu komórek i ich stanu rozwoju. I tak np. stwierdzono, że u 10-dniowego szczura wysokie stężenie aneksyny II występuje głównie w komórkach Purkinje'go mózdzku. U szczurów 18-dniowych silną reakcją z przeciwciałem na aneksynę II wykazują komórki glejowe Bergmanna i astrocyty w substancji białej. W mózdzku szczura dorosłego aneksyna II występuje wyłącznie w wypustkach komórek glejowych Bergmanna i w wypustkach niektórych astrocytów warstwy ziarnistej i substancji białej [95]. Największe stężenie aneksyny IV w mózgu ssaków dorosłych zidentyfikowano w substancji białej w komórkach glejowych położonych poniżej warstwy komórek Purkinje'go [96]. Natomiast aneksyna V występuje głównie w komórkach glejowych mózdzku oraz w komórkach Bergmanna, astrocytach i oligodendrocytach kory mózgowej. Aneksynę V zidentyfikowano ponadto w komórkach Schwanna nerwu kulszowego [97]. W mózdzku ssaków stwierdzono także obecność aneksyny VI. Występuje ona głównie w komórkach Purkinje'go oraz w dendrytach i aksonach neuronów substancji białej i warstwy ziarnistej [96]. Inne badania prowadzone na komórkach linii PC12 pokazują, że po stymulacji tych komórek czynnikiem NGF zmienia się poziom aneksyny II i V. I tak, stężenie aneksyny II wzrasta 32 razy, zaś aneksyny V — 5 razy. Po usunięciu NGF stężenie tych białek powraca do wartości początkowej [98, 99]. Sugeruje się zatem, że przynajmniej niektóre aneksyny mogą odgrywać istotną rolę w różnicowaniu się komórek nerwowych.

## VII. Podsumowanie

Jony wapnia odgrywają istotną rolę w regulacji wielu procesów fizjologicznych komórki. W komórkach układu nerwowego biorą one udział m.in. w syntezie i uwalnianiu neurotransmiterów, mogą indukować LTP i uczestniczyć w procesach uczenia się i pamięci. W wielu przypadkach działanie jonów Ca<sup>2+</sup> zachodzi poprzez wiązanie się z określonymi białkami

wiązącymi wapń.

Niektóre białka wiążące wapń, jak kalmodulina i rekoweryna występujące w dużych ilościach w tkance nerwowej, modulują aktywność enzymów. Inne białka, jak kalbindyna, kalretinina i parwalbumina występujące w określonych populacjach neuronów w mózgu, mogą obniżać stężenie jonów wapnia wewnątrz komórki. Specyficzna lokalizacja w określonych populacjach komórek sprawia, że przeciwciała skierowane na kalbindynę, kalretininę, parwalbuminę mogą być wykorzystane jako markery do badań neuroanatomicznych [100, 101]. Również białka z rodziny S-100, aneksyny i czułe na wapń proteazy mogą być istotne dla funkcjonowania układu nerwowego [102-104].

Ważną cechą białek wiążących wapń jest ich dobra rozpuszczalność i występowanie nawet w cienkich wypustkach neuronów. Umożliwia to badanie kształtu komórek nerwowych i ich połączeń, co jest szczególnie istotne w śledzeniu rozwoju układu nerwowego i w monitorowaniu różnych stanów patologicznych [105-106]. Dalsze badania w dziedzinie białek wiążących wapń są jednak niezbędne dla pełniejszego wyjaśnienia i zrozumienia roli tych białek w układzie nerwowym.

#### Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować prof. J. Kuźnickiemu oraz dr W. Leśniak za cenne uwagi dotyczące przygotowywanego artykułu.

Artykuł otrzymano 15 marca 1993 r.

Zaakceptowano do druku 6 kwietnia 1993 r.

#### Piśmiennictwo

- Grabarek Z, Kuźnicki J (1980) *Post Biochem* **26**: 210-224
- Kuźnicki J (1987) *Post Biol Komórki* **14**: 121-129
- Smith VL, Kaetzel MA, Dedman JR (1990) *Cell Reg* **1**: 165-172
- Heizmann CW, Hunziker W (1990) W: *Intracellular Calcium Regulation*, red. Bronner F, Alan R Liss Inc str: 211-247
- Moss SE, Crumpton MJ, (1990), *TIBS*, **15**: 11-12
- Kuźnicki J, Drabikowski W, (1980) *Post Biochem*: **26**: 265-290
- Cohen P, Klee CB, (1988), "Calmodulin", tom V "Molecular Aspects of Cellular Regulation", Amsterdam, Elsevier
- Bachs O, Agell N, Carafoli E, (1992), *Biochim Biophys Acta*, **1113**: 259-270
- Leśniak W, (1989), *Post Biochem*, **35**, 63-88
- Glenney JR Jr, Weber K, (1980), *J Biol Chem*, **255**: 10551-10554
- Andreassen TJ, Luetje CW, Heideman W, Storm DR, (1983), *Biochemistry*, **22**: 4615-4618
- Davis TN, (1991), *Cell*, **65**, 949-959.
- Colbran RJ, Soderling TR, (1990), *Curr Top Cell Reg*, **31**: 181-221
- Schulman H, Hanson PI, Meyer T, (1992), *Cell Calcium*, **13**: 401-411
- Yamamoto H, Fukunaga K, Lee K, Soderling TR, (1992), *J Neurochem*, **58**: 1110-1117
- Filipek A, Soderling TR, (1993), *Mol Cell Biochem*, w druku
- Occor KA, Schulman H, (1991), *Neuron*, **6**: 907-914
- Siekevitz P, (1991), *Proc Natl Acad Sci, USA* **88**: 5374-5378
- Głazewski S, (1990), *Kosmos*, **39**: 265-276
- Barinaga M, (1992), *Science*, **257**: 162-163
- Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y, (1992), *Science*, **257**: 201-206
- Klee CB, Draetta GF, Hubbard MJ, (1987), *Adv Ezymol*, **61**: 149-200
- Hashimoto Y, Perrino BA, Soderling TR, (1990), *J Biol Chem*, **265**: 1924-1927
- Ueki K, Muramatsu T, Kincaid RL, (1992), *Biochem Biophys Res Comm*, **187**: 537-543
- Walsh CT, Zydowsky LD, McKeon FG, (1992), *J Biol Chem*, **267**: 13115-13118
- Liu J, Farmer JD, Lane WS, Freidman J, Weissman I, Schreiber SL, (1991), *Cell*, **66**: 807-815
- Liu J, Albers MW, Wandless TJ, Luan S, Alberg DG, Belshaw PJ, Cohen P, MacKintosh C, Klee CB, Schreiber SL, (1992), *Biochemistry*, **31**: 3896-3901
- Xia Z, Rsdal CD, Merchant KM, Dorsa DM, Storm DR, (1991), *Neuron*, **6**: 431-443
- Choi EU, Wong ST, Hinds TS, Storm DR, (1992), *J Biol Chem* **267**: 12440-12442
- Abrams TW, Kandel ER, (1988), *Trends Neurosci*, **11**: 128-135
- Yovell Y, Abrams TW, (1992), *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**: 6526-6530
- Dizhoor AM, Ray S, Kumar S, Niemi G, Spencer M, Brolley D, Walsh KA, Philipov PP, Hurley JB, Stryer L, (1991), *Science* **251**: 915-918
- Lambrecht H-G, Koch K-W, (1992), *Biochim Biophys Acta*, **1160**: 63-66
- S Ray, Zozulya S, Niemi GA, Flaherty KM, Brooley D, Dizhoor AM, McKay DB, Hurley J, Stryer L, (1992), *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**: 5705-5709
- Flaherty KM, Zozulya S, McKay DB, Stryer L, komunikat S37 w książce z 8 Międzynarodowego Sympozjum nt. Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease, (1992), Davos, Szwajcaria.
- Dizhoor AM, Chen C-K, Olshevskaya E, Sinelnikova VV, Phillopov P, Hurley JB, (1993), *Science*, **259**: 829-832
- Lambrecht HG, Koch KW, (1991), *EMBO J*, **10**: 793-798
- Polans AS, Buczyłko J, Crabb J, Palczewski K, (1991), *J Cell Biol* **112**: 981-989
- Lindemeier J, Ferrus A, Mallart A, Pongs O, komunikat MB19 w książce z 8 Międzynarodowego Sympozjum nt. Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease, (1992), Davos, Szwajcaria.
- Okazaki K, Watanabe M, Ando Y, Hagiwara M, Teresawa M, Hidaka H, (1992), *Biochem Biophys Res Comm*, **185**: 147-153
- Varghese S, Lee S, Huang Y-C, Christakos S, (1988) *J Biol Chem* **263**: 9776-9784
- Sloviter RS, (1989), *J Comp Neurol*, **280**: 183-196
- Celio MR, (1990), *Neuroscience* **35**: 375-475
- Van Brederode JFM, Helliesen MK, Hendrickson AE, (1991), *Neuroscience*, **44**: 157-171
- Morino-Wannier P, Fujita SC, Jones EG, (1992), *Exp Brain Res*, **88**: 422-432
- Ellis JH, Richards DE, Rogers JH, (1991), *Cell and Tissue Res*, **264**: 197-208
- Kurobe N, Inaguma Y, Shinohara H, Semba R, Inagaki T, Kato K, (1992), *J Neurochem*, **58**: 128-134
- Baimbridge KG, Moody I, Miller JJ, (1985), *Epilepsia*, **26**: 460-465
- Leranth C, Ribak C, (1991), *Exp Brain Res*, **85**: 129-136
- Rami A, Rabie A, Thomasset M, Kriegelstein J, (1992), *J Neurosci Res*, **31**: 89-95
- Mattson MP, Rychlik B, Chu Ch, Christakos S, (1991), *Neuron*, **6**: 41-51
- Iacopino A, Christakos S, German D, Sonsalla PK, Altra CA, (1992), *Mol Brain Res*, **13**: 251-261
- Rogers JH, (1987), *J Cell Biol*, **105**: 1343-1353
- Jacobowitz DM, Winsky L, (1991), *J Comp Neurol*, **304**: 198-218
- Arai R, Winsky L, Arai M, Jacobowitz DM, (1991),

- J Comp Neurol*, **310**: 21-44
56. Resibois A, Rogers JH, (1992), *Neuroscience*, **46**: 101-134
  57. Winsky L, Montpied P, Arai R, Martin BM, Jacobowitz DM, (1992), *Neuroscience*, **50**: 181-196
  58. Celio MR, Poncino A, Cantino D, (1992), *Boll Soc Ital Biol Sper*, **68**: 25-29
  59. Pohl V, Van Rampelbergh J, Mellaert S, Parmentier M, Pochet R, (1992), *Bioch Bioph Acta*, **1160**: 87-94
  60. Gotzos V, Schwaller B, Bustos-Castillo M, Celio MR, (1992), *Exp Cell Res*, **202**: 292-302
  61. Heizmann CW, Rohrenbeck J, Kamphuis W, (1989), w: Calcium binding proteins in normal and transformed cells, red. Pochet R, Lawson DEM, Heizmann CW, Plenum Publishing Corp, 57-66
  62. Nitsch R, Bergmann I, Kupperts K, Mueller G, Frotscher M, (1990), *Neurosci Lett*, **118**: 147-150
  63. Solbach S, Celio MR, (1991), *Anat Embryol Berl*, **184**: 103-124
  64. Chard PS, Bleakman D, Miller RJ, komunikat Py 53 w książce z 8 Międzynarodowego Sympozjum nt. Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease, (1992), Davos, Szwajcaria.
  65. Hillman D, Chen S, Aung TT, Cherksey B, Sugimori M, Llinas RR, (1991), *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**: 7076-7080
  66. Morris RJ, Beech JN, Heizmann CW (1988), *Neuroscience*, **27**: 571-596
  67. Hendrickson AE, Van Brederode JFM, Mulligan KA, Celio MR, (1991), *J Comp Neurol*, **307**: 626-646
  68. Kligman D, Hilt DC, (1988), *TIBS*, **13**: 437-443
  69. Moore BE, (1965), *Biochem Biophys Res Commun*, **19**: 739-744
  70. Baudier J, Glasser N, Gerard D, (1986), *J Biol Chem*, **261**: 8192-8212
  71. Isobe T, Takahashi K, Okuyama T, (1984), *J. Neurochem*, **43**: 1494-1496
  72. Kato K, Kimura S, (1985), *Biochim Biophys Acta*, **842**: 146-150
  73. Semba R, Kato K, Isobe T, Kashiwamata S, (1987), *Brain Res*, **401**: 9-13
  74. Haimoto H, Kato K, (1988), *Eur J Biochem*, **171**: 409-415
  75. Selinfreund RH, Barger SW, Welsh MJ, Van Eldik LJ, (1990), *J Cell Biol*, **111**: 2021-2028
  76. Kligman D, Marshak DR, (1985), *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**: 7136-7139
  77. Winningham-Major F, Staecker JL, Barger SW, Coats S, Van Eldik LJ, (1989), *J Cell Biol*, **109**: 3063-3071.
  78. Barger SW, Van Eldik LJ, (1992), *J Biol Chem*, **267**: 9689-9694
  79. Van Engelen BG, Lammers KJ, Gabreels FJ, Wevers RA, Van Geel WJ, Borm GF, (1992), *Clin Chem*, **38**: 813-816
  80. Kato K, Kurobe N, Suzuki F, Morishita R, Asano T, Sato T, Inagaki T, (1991), *J Mol Neurosci*, **3**: 95-99
  81. Van Eldik J, Jensen RA, Ehrenfried BA, Whetsell WO, (1986), *Histochem Cytochem* **34**: 977-982
  82. Vogetley KT, Bilzer T, Reifemberger G, Wechsler W, (1991), *Acta Neuropathol Berl*, **82**: 78-85
  83. Leonard DG B, Ziff EB, Greene LA, (1987), *Molec. Cell. Biol.*, **7**: 3156-3157
  84. Thompson MA, Ziff EB, (1989), *Neuron*, **2**: 1043-1053
  85. Masiakowski P, Shooter EM, (1988), *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**: 1277-1281
  86. Kuźnicki J, Kordowska J, Puzianowska M, Woźniczka BM, (1992), *Exp Cell Res*, **200**: 425-430
  87. Tonini GP, Casalaro A, Cara A, Di Martino D, (1991), *Cancer Res*, **51**: 1733-1737
  88. Guo X, Chambers AF, Parfett CLJ, Waterhouse P, Murphy LC, Reid RE, Craig AM, Edwards DR, Denhardt DT, (1990), *Cell Growth and Different.*, **1**: 333-338
  89. Filipek A, Puzianowska M, Cieślak B, Kuźnicki J, (1993), *NeuroRep*, **4**: 383-386
  90. Burgoyne RD, Geisow MJ, (1989), *Cell Calcium*, **10**: 1-10
  91. Bazzi MD, Nelsestuen GL, (1991), *Biochemistry*, **30**: 971-979
  92. Crumpton MJ, Dedman JR, (1990), *Nature* **345**: 212-212
  93. Huber R, Berendes R, Burger R, Schneider A, Karshikov M, Luecke A, Roemisch H, Paques E, (1992), *J Mol Biol*, **223**: 683-704
  94. Karshikov A, Berendes R, Burger A, Cavalie A, Lux HD, Huber R, (1992), *Eur Biophys J*, **20**: 337-344
  95. Burgoyne RD, Cambray-Deakin MA, Norman K-M (1989), *J Mol Neurosci*, **1**: 47-54
  96. Woolgar JA, Boustead CM, Walker JH, (1990), *J Neurochem*, **54**: 62-71
  97. Spreca A, Rambotti MG, Giambanco I, Pula G, Bianchi R, Ceccarelli P, Donato R, (1992), *J Cell Physiol*, **152**: 587-598
  98. Schaefer DD, Haigler HT, (1990), *J Cell Biol* **111**: 229-238
  99. Fox MT, Prentice DA, Hughes JP, (1991), *Biochem Biophys Res Commun*, **177**: 1188-1193
  100. Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH, (1992), *TINS*, **15**: 303-308
  101. Andressen C, Blumcke I, Celio MR, (1993), *Cell Tissue Res*, **271**: 181-208
  102. Donato R, (1991), *Cell Calcium*, **12**: 713-726
  103. Bandorowicz J, Pikuła S, (1993), *Acta Bioch Pol.*, w druku.
  104. Jakubiec-Puka A, (1993), *Post Biochem*, praca w przygotowaniu do druku.
  105. Heizmann CW, Braun K, (1992), *Trends Neurosci*, **15**: 259-264
  106. Kuźnicki J, Kordowska J, (1992), *Kosmos*, **41**: 105-121.

## 2nd JUBMB Conference on „Biochemistry of Cell Membranes”

Bari, Italy, 29 September — 3 October 1993

Info: Prof Sergio Papa, Istituto Policattedra di Biochimica e Chimica Medica, Piazza G Cesare, 70126 Bari, Italy

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



# Rola wazotocyny argininowej i melatoniny w fizjologicznych mechanizmach adaptacji ryb kostnoszkieletowych do zmian zasolenia środowiska

## Role of arginine vasotocin and melatonin in physiological adaptation mechanisms to salinity changes in *Teleostei*

EWA KULCZYKOWSKA\*

### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Wazotocyna argininowa a osmoregulacja u ryb
- III. Receptory wazotocyny argininowej
- IV. Wazotocyna argininowa i izotocyna wpływają na wiele funkcji organizmu
- V. Szyszynka jako przetrwownik informacji
- VI. Zależność funkcjonalna wazotocyna—melatonina?

### Contents:

- I. Introduction
- II. Arginine vasotocin and osmoregulation in fish
- III. Arginine vasotocin receptors
- IV. Arginine vasotocin and isotocin affect a wide variety of functions
- V. Pineal as a neuroendocrine transducer
- VI. Functional relationship vasotocin—melatonin?

Wykaz stosowanych skrótów: AVT— wazotocyna argininowa (arginine vasotocin); AVP — wazopresyna argininowa (arginine vasopressin); ACTH — hormon adrenokortykotropowy (adrenocorticotrophic hormone);  $V_1$ ,  $V_2$  — receptory wazopresyny (vasopressin receptors).

## I. Wprowadzenie

Sezonowe wędrówki ryb są zjawiskiem na ogół znanym, lecz biochemiczne i fizjologiczne podstawy mechanizmu takiego zachowania się zwierząt pozostają, jak dotąd, niezbadane. Jakie czynniki zewnętrzne i wewnętrzne stanowią impuls do rozpoczęcia wędrówki? Co stanowi synchronizator zachodzących prze-

mian w funkcjonowaniu organizmu? Jakie fizjologiczne mechanizmy adaptacyjne pozwalają organizmowi prawidłowo reagować na zmiany środowiska? Znalezienie pełnej odpowiedzi na te pytania nie jest dziś jeszcze możliwe i dlatego istotne wydaje się przybliżenie czytelnikowi tej tematyki i być może zachęcenie go do podjęcia badań w tym kierunku.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie udziału dwóch hormonów: wazotocyny argininowej i melatoniny w fizjologicznym procesie adaptacji ryb kostnoszkieletowych do zmian zasolenia środowiska. Zagadnienie to jest przedmiotem badań prowadzonych obecnie w Centrum Biologii Morza PAN w Gdyni.

Wazotocyna jest jednym z siedmiu zidentyfikowanych u ryb hormonów nerwowej części przysadki i wraz z izotocyną (ichtiotocyną) obecna jest u wszystkich ryb kostnoszkieletowych (*Teleostei*). Ich synteza zachodzi w jądrach podwzgórza (*nuclios preopticus*), skąd cząsteczki przesyłane są za pośrednictwem aksonów do tylnej części przysadki gdzie są magazynowane i stąd uwalniane. Pozostałe neurohormony tzn. oksytocyna, mezotocyna, glumitocyna, aspartocyna i walitocyna spotykane są u ryb innych rzędów (Tab. 1). Wszystkie są nonapeptydami i różnią się między sobą jednym, a czasem dwoma aminokwasami w sekwencji (Ryc. 1, Wzory I-VIII).

Melatonina jest hormonem syntetyzowanym z tryptofanu w szyszynce wszystkich kręgowców (Wzór IX). W procesie powstawania melatoniny bierze udział między innymi N-acetylotransferaza — enzym niezwykle ważny z punktu widzenia regulacji biosyntezy melatoniny.

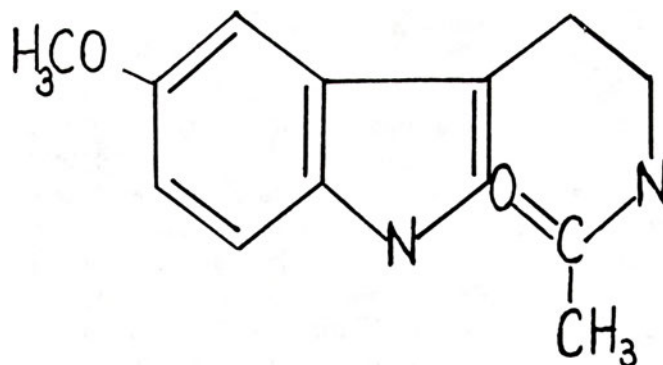
## II. Wazotocyna argininowa a osmoregulacja u ryb

Wazotocyna argininowa (Ryc. 1, Wzór II) występuje również u wyższych kręgowców (*Tetrapoda*) i podobnie jak wazopresyna (Ryc. 1, Wzór II) odgrywa ważną rolę

\* dr, Centrum Biologii Morza PAN, Gdynia ul. św. Wojciecha 5

Tabela 1.

Hormony nerwowej części przysadki zidentyfikowane u ryb różnych rzędów	
<b>Ryby spodouste</b> ( <i>Elasmobranchii</i> ) w tym: Żarłaczce ( <i>Selachii</i> )  Zrostogłowe ( <i>Holocephali</i> )	wazotocyna, glumitocyna, aspartocyna, walitocyna  wazotocyna, aspartocyna, oksytocyna
<b>Ryby kostnopromieniste</b> ( <i>Actinopterygii</i> ) w tym: Kostnoszkieletowe ( <i>Teleostei</i> ) Ramieniopłetwe ( <i>Branchiopterygii</i> ) Ganoïdy kostne ( <i>Holostei</i> ) Kostoluskie ( <i>Chondrostei</i> )	wazotocyna, izotocyna wazotocyna, izotocyna wazotocyna, izotocyna wazotocyna
<b>Ryby dwudyszne</b> ( <i>Dipnoi</i> )	wazotocyna, mezotocyna oksytocyna



Wzór IX Melatonina — hormon szyszynkowy kręgowców

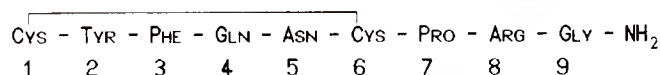
w utrzymaniu homeostazy płynów ustrojowych wywierając działanie naczyniowe i kanalikowe. Efekt polegający na obkurczeniu naczyń krwionośnych może prowadzić do wzrostu diurezy na skutek podwyższenia ciśnienia krwi, lub przeciwnie, do jej zahamowania w wyniku obkurczenia naczyń nerkowych i spadku filtracji kłębkowej. W wyniku bezpośredniego działania wazotocyny na kanalikuli nerkowe i tym samym zwiększenia reabsorpcji wody z kanalików dochodzi do zahamowania diurezy (efekt antydiuretyczny).

Od dawna wiadomo, że zmiany aktywności sekrecyjnej przysadki mogą być wywołane zmianami toniczności wody, w której przebywa ryba, lecz natura tego zjawiska jest nadal niejasna. Badania histologiczne demonstrują zmniejszenie zawartości neurosekretu w przysadce ryb podczas ich adaptacji do środowiska hipertonicznego [1, 2]. Udało się również wykazać zwiększoną ekspresję mRNA pro-wazotocyny w podwzgórzu pstrągów znajdujących się w wodzie słodkiej [3] i wzrost stężenia AVT w osoczu fląder i pstrągów przeniesionych z wody słonej do słodkiej oraz jego spadek po powrocie ryb do wody słonej [1, 4, 5]. Wyniki tych prac jednoznacznie wskazują na zwiększoną syntezę i sekrecję wazotocyny u pstrągów i fląder znajdujących się w wodzie słodkiej. Zaobserwowano ponadto korekcję między osmolarnością osocza, stężeniem jonów  $\text{Na}^+$  w osoczu, a stężeniem AVT w osoczu słonowodnych fląder i brak tych zależności u ryb słodkowodnych. Może to, jak się wydaje, wskazywać na zróżnicowanie roli wazotocyny u ryb żyjących w różnych środowiskach [1, 5].

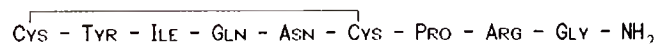
U węgorza europejskiego, przeciwnie niż u fląder i pstrągów, adaptacja do środowiska słonowodnego związana jest z wyższym poziomem wazotocyny i izotocyny w przysadce i osoczu krwi [6, 7]. Węgorze słodkowodne reagują zmniejszeniem filtracji kłębkowej i zahamowaniem diurezy na niskie, przypuszczalnie równe fizjologicznym, dawki AVT (0.001 ng/kg ciężaru ciała) zaś zwiększoną diurezą na wysokie dawki hormonów (100 ng/kg ciężaru ciała) [8, 9].

Ogólnie można stwierdzić, że wysokie stężenia AVT egzogenne, powodujące znaczne podwyższenie ciśnienia krwi, działają diuretycznie, zaś niższe stężenia wywierają efekt antydiuretyczny. Nie jest wykluczone, że wazotocyna u ryb działa bezpośrednio na kanalikuli

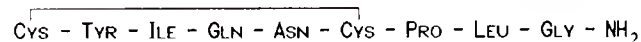
## 1. WAZOPRESYNA ARGININOWA



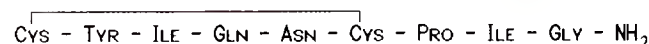
## 2. WAZOTOCYNA ARGININOWA



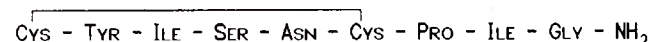
## 3. OKSYTOCyna



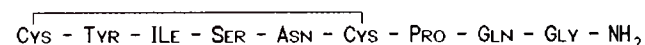
## 4. MEZOTOCYNA



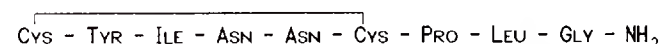
## 5. IZOTOCYNA



## 6. GLUMITOCYNA



## 7. ASPARTOCYNA



## 8. WALITOCYNA

Ryc. 1. Hormony nerwowej części przysadki mózgowej zidentyfikowane u ryb, wzory II-VIII. Dla porównania przedstawiono również budowę wazopresyny argininowej — hormonu nie występującego u niższych kręgowców, wzór I.

nerkowe zwiększając resorpcję płynu, a więc antydiuretycznie, co jednak przy wyższych jej stężeniach maskowane jest zwiększoną diurezą wynikającą z jednoczesnego wzrostu ciśnienia krwi i filtracji kłębkowej.

Warto również wspomnieć, że u stenohalicznego karpia nie obserwuje się zmian poziomu AVT w osoczu, co może wskazywać na brak efektów diuretycznych, jako reakcji na zmieniającą się osmolarność wody. Były to, co prawda, zmiany niewielkie ze względu na dużą wrażliwość karpia na zasolenie środowiska [5]. U ryb płucodysznych zaś niewielka już dawka AVT (0.1 ng/kg) wywołuje diurezę [10]. Dane te wskazują na duże zróżnicowanie odpowiedzi fizjologicznej ryb na zmiany środowiska i wydzielaną wazotocynę.

### III. Receptory wazotocyny argininowej

Kierując się kryteriami funkcjonalnymi i farmakologicznymi wyodrębniono dwa zasadnicze rodzaje receptorów wazopresyny:  $V_1$  i  $V_2$ . Receptory  $V_1$ , nazywane są naczyniowymi receptorami wazopresyny. Ich pobudzenie powoduje hydrolizę fosfatydyloinozytolu i mobilizację wewnątrzkomórkowego wapnia. Są one odpowiedzialne m.in. za zwężenie naczyń krwionośnych i w efekcie podwyższenie ciśnienia krwi. Natomiast pobudzenie tzw. kanalikowych receptorów wazopresyny,  $V_2$ , prowadzi do aktywacji wewnątrzkomórkowej cykazy adenylowej i podwyższenia poziomu cAMP w komórkach kanalików zbiorczych nerek ssaków i tym samym odpowiada za efekt antydiuretyczny.

Wyniki najnowszych badań wskazują na obecność receptorów typu  $V_1$  w tkankach ryb (podobnych do receptorów  $V_1$  specyficznych dla wazopresyny ssaków), natomiast pozostawiają nierozstrzygnięty problem obecności receptorów typu  $V_2$ . W naczyniach nerkowych najprawdopodobniej funkcjonują receptory typu  $V_1$ , gdyż syntetyczny antagonistą tych receptorów znosi efekt antydiuretyczny wywołany podaniem AVT u ryb, u których utrzymywane jest stałe ciśnienie krwi [11]. Jednocześnie udało się stwierdzić, że AVT powoduje zależną od dawki stymulację syntezy cAMP w izolowanych komórkach kanalików nerkowych pstrąga i zahamowanie diurezy, co może wskazywać na funkcjonowanie receptorów typu  $V_2$  [12]. Wskazano również, że wazotocyna i izotocyna bezpośrednio hamują aktywność cykazy adenylowej (w nieobecności jonów  $Ca^{2+}$ ) w błonie komórek nabłonkowych skrzelu i obniżają poziom cAMP w izolowanych hepatocytach pstrąga, wskazując tym samym na obecność nieznanych dotąd receptorów [13].

Wydaje się jednak, że próby klasyfikacji receptorów AVT u ryb są jeszcze przedwczesne. Można jedynie przypuszczać, że za efekt kanalikowy (antydiuretyczny) odpowiedzialne są receptory typu  $V_2$ , natomiast za efekt naczyniowy receptory typu  $V_1$ .

### IV. Wazotocyna argininowa i izotocyna wpływają na wiele funkcji organizmu

Rola fizjologiczna wazotocyny argininowej i izotocyny nie ogranicza się do udziału w osmoregulacji. Indukowanie stanu gotowości ryby do tarła, kurczenie jajowodów, zależne od podanej dawki AVT pobudzenie syntezy testosteronu  $T_2$  i regulacja aktywności gonadotropowej komórek przysadki, to tylko niektóre przykłady udziału tych hormonów w procesie reprodukcji [14, 15].

Znany jest także wpływ neurohormonów podwzgórzowych na wydzielanie ACTH i kortyzolu u ryb. Stymulowanie wydzielania ACTH przez wazotocynę i izotocynę przypomina ten sam efekt znany u ssaków, a wywołany przez wazopresynę [16].

Badania neuroanatomiczne z zastosowaniem najnowszych technik immunocytochemicznych wskazują, że włókna nerwowe zawierające cząsteczki wazotocyny i izotocyny docierają do różnych struktur mózgu i mogą odgrywać rolę neurotransmiterów i neuromodulatorów w centralnym układzie nerwowym ryb [17], przypominając tym samym działanie wazopresyny i wazotocyny u kręgowców wyższych [18, 19]. Jednym z prawdopodobnych miejsc działania wazotocyny jest szyszynka. Rozwinięte w latach 80-tych techniki badawcze pozwoliły potwierdzić obecność wazotocyny argininowej i wazopresyny w szyszynce u wyższych kręgowców [20]. Wazotocynę argininową wykryto także w szyszynce ryb [20, 21].

Jednym z ciekawszych, lecz nadal słabo poznanych efektem działania wazopresyny jest regulowanie sekrecji hormonów osi podwzgórze-przysadka [22-24] i syntezy melatoniny w szyszynce [25] i tym samym jej udział w przekazywaniu sygnałów związanych z funkcjonowaniem zegara biologicznego [26]. Wysoki poziom AVP w płynie mózgowo-rdzeniowym ssaków w ciągu dnia pokrywa się z niskim poziomem melatoniny, a niski poziom AVP w nocy odpowiada wysokiemu poziomowi melatoniny [27]. Również w jądrach podwzgórza, w bliskim sąsiedztwie skrzyżowania nerwów wzrokowych (*suprachiasmatic nucleus*), miejscu zegara biologicznego kręgowców, obserwuje się rytmiczne zmiany poziomu wazopresyny i mRNA wazopresyny (z minimum w nocy) [26, 28].

### V. Szyszynka jako przetwornik informacji

Szyszynka ryb zawierająca komórki fotoreceptorowe działa jednocześnie jako odbiornik i przetwornik informacji (*photoneuroendocrine, thermoendocrine transducer*), stanowi rodzaj łącznika organizmu ze środowiskiem [29-32]. Informacja w postaci fali świetlnej lub/i bodźca termicznego dociera do szyszynki, gdzie zostaje zamieniona w sygnał chemiczny (melatonina) i w impuls nerwowy docierający do centralnego układu nerwowego. Układ, złożony z komórek fotoreceptorowych syntetyzujących hormon melatoninę



i połączonych synapsami z neuronami, prowadzi swe aksony do różnych struktur mózgowych. Stwarza to możliwość pełnej koordynacji funkcjonowania organizmu, tak na drodze nerwowej jak i hormonalnej.

Na uwagę zasługuje zaobserwowana u pstrąga zależność między sygnałami nerwowymi i hormonalnymi wychodzącymi z szyszynki [33]. Wydaje się, że melatonina stanowi modulator sygnałów nerwowych, a ponadto regulator własnej syntezy i sekrecji, działający na zasadzie sprzężenia zwrotnego.

Biosynteza melatoniny w szyszynce przebiega rytmicznie u wszystkich kręgowców: poziom jej jest wysoki w nocy i niski w dzień. U ssaków wydzielanie melatoniny kierowane jest przez tzw. zegar biologiczny znajdujący się w podwzgórzu (*suprachiasmatic nucleus*) i podlega regulacji przez zmieniający się fotoperiod (zmiany długości dnia i nocy). Nocny szczyt syntezy hormonu może być sygnałem synchronizującym także dla innych rytmów okołodobowych. Zimą i jesienią, kiedy dni są krótsze, czas wzmożonej syntezy melatoniny jest dłuższy niż wiosną i latem, tak więc rytm ilości syntetyzowanej melatoniny stanowić może rodzaj kalendarza endokrynnego, pozwalającego na dostosowanie się organizmu do sezonowych zmian warunków środowiska [34-36].

Badania aktywności wydzielniczej izolowanej szyszynki pstrąga przeprowadzone w różnych warunkach fotoperiodu wskazują niewątpliwie na regulujący wpływ światła na syntezę melatoniny [37], lecz jak dotąd nie udało się jednoznacznie określić, czy rytm wydzielania melatoniny w szyszynce ryb jest nadawany przez samą szyszynkę. W warunkach utrzymującej się ciemności rytm okołodobowy wydzielania hormonu utrzymuje się w szyszynce szczupaka [30] i karasia [38], natomiast zanika w szyszynce pstrąga [37], co może wskazywać na różny charakter rytmu (endo- lub egzogeny) u różnych gatunków ryb.

## VI. Zależność funkcjonalna wazotocyna-melatonina?

Funkcjonalne zależności między nerwową częścią przysadki ryb oraz uwalnianymi stąd hormonami, wazotocyną i izotocyną, oraz szyszynką i jej hormonem melatoniną, nie były nigdy wcześniej przedmiotem rozważań. Wydaje się, że jest dość danych wskazujących na prawdopodobieństwo wyżej wspomnianych interakcji:

- dane o zależności wazopresyna-melatonina u ssaków;
- duże podobieństwo funkcjonowania mechanizmów sprzężeń zwrotnych u kręgowców wyższych i ryb, szczególnie w regulacji wydzielania hormonów uczestniczących w dostosowaniu organizmu do zmieniających się warunków środowiska;
- podobieństwo budowy cząsteczek wazotocyny i wazopresyny oraz podobieństwo struktury

receptorów tych hormonów;

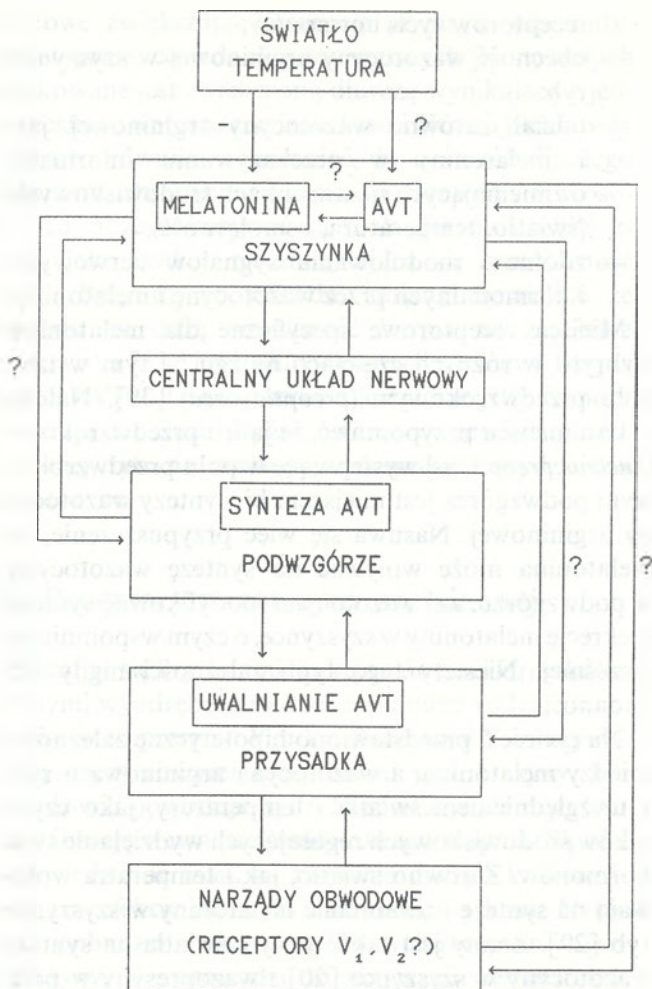
- obecność wazotocyny argininowej w szyszynce ryb;
- udział, zarówno wazotocyny argininowej, jak i melatoniny w przekazywaniu informacji o zmieniających się warunkach środowiskowych (światło, temperatura, osmolarność);
- zdolność modulowania sygnałów nerwowych i hormonalnych przez wazotocynę i melatoninę.

Miejsca receptorowe specyficzne dla melatoniny wykryto w różnych częściach mózgu, w tym w tzw. polu przedwzrokowym (*preoptic area*) [39]. Należy w tym miejscu przypomnieć, że jądro przedwzrokowe (*nucleus preopticus*) występujące w polu przedwzrokowym podwzgórza jest miejscem biosyntezy wazotocyny argininowej. Nasuwa się więc przypuszczenie, że melatonina może wpływać na syntezę wazotocyny w podwzgórzu, zaś wazotocyna modyfikować syntezę i sekrecję melatoniny w szyszynce, o czym wspomniano wcześniej. Niestety tego typu zależności nigdy nie badano.

Na rycinie 2 przedstawiono hipotetyczne zależności między melatoniną, a wazotocyną argininową u ryb, z uwzględnieniem światła i temperatury, jako czynników środowiskowych regulujących wydzielanie tych hormonów. Zarówno światło, jak i temperatura wpływają na syntezę i uwalnianie melatoniny w szyszynce ryb [29]. Znany jest także wpływ światła na syntezę wazotocyny w szyszynce [20] i wazopresyny w podwzgórzu [28] u ssaków. Nie wyklucza się, że synteza AVT u ryb jest również regulowana przez światło (czas naświetlenia). Bliskie położenie szyszynki, podwzgórza i przysadki, oraz anatomiczne połączenia między tymi strukturami umożliwiają wzajemną regulację syntezy i wydzielania wazotocyny i melatoniny. Wiadomo, że zredukowana forma wazotocyny argininowej hamuje rozkład N-acetylotransferazy — kluczowego enzymu uczestniczącego w biosyntezie melatoniny. Natomiast sama wazotocyna argininowa przyspiesza rozkład tego enzymu [20]. Tak więc, wysoki poziom wazotocyny może działać hamująco na syntezę melatoniny zaś niski poziom może pozwalać na uaktywnienie jej biosyntezy. Podobne zjawiska zaobserwowano u ssaków: wysoki poziom szyszynkowej wazotocyny w porze dziennej odpowiada niskiemu poziomowi melatoniny, a niski poziom AVT w porze nocnej, wysokiemu poziomowi melatoniny [20]. Jak widać, zależności te mogą być dość skomplikowane i wymagają przeprowadzenia kompleksowych badań.

Może, poznanie zależności funkcjonalnych między melatoniną i wazotocyną argininową oraz mechanizmów biochemicznych leżących u podstaw tych zależności, pozwoli lepiej zrozumieć niektóre przemiany obserwowane w organizmie ryb wędrujących. Dziś już wiadomo, że przemiany te następują z pewnym wyprzedzeniem w stosunku do zmieniających się warunków zewnętrznych (zasolenia, oświetlenia, temperatury), a więc mają charakter preadaptacyjny. Pozwala to





Ryc. 2. Hipotetyczne zależności między wydzielaniem wazotocyny argininowej (AVT) i melatoniny u ryb. Światło i temperatura regulują biosyntezę melatoniny w szyszynce. Melatonina i wazotocyna mogą wpływać wzajemnie na swoją biosyntezę i uwalnianie wewnątrz samej szyszynki i poza nią. Melatonina uwalniana wewnątrz samej szyszynki może wpływać na biosyntezę wazotocyny w podwzgórzu i jej uwalnianie w przysadce, a także modyfikować jej działanie w narządach obwodowych. Wazotocyna syntetyzowana w podwzgórzu i uwalniana w przysadce może regulować biosyntezę i wydzielanie melatoniny w szyszynce.

przypuszczać, że o podjęciu wędrówki i pojawieniu się adekwatnych mechanizmów adaptacyjnych decyduje czynnik genetyczny. Hormony zaś pełnią niezwykle ważną rolę synchronizując procesy życiowe ze zmieniającymi się warunkami środowiskowymi.

Artykuł otrzymano 7 grudnia 1992 r.  
Zaakceptowano do druku 26 marca 1993 r.

## Piśmiennictwo

1. Perrot MN, Carrick S, Balment RJ (1991) *Gen Comp Endocrinol* **83**: 68-74
2. Haruta K, Yamashita T, Kawashima S (1991) *Gen Comp Endocrinol* **83**: 327-336
3. Hyodo S, Urano A (1991) *J Comp Physiol B* **161**: 549-556
4. Warne JM, Balment RJ (1992) W: Abstracts 2nd International Symposium on Fish Endocrinology, str P101
5. Balment RJ, Warne JM, Tierney M, Hazon N (1992) W: Abstracts 2nd International Symposium on Fish Endocrinology, str L42

6. Holder FC (1968) *Gen Comp Endocrinol* **1**: 235-242
7. Holder FC (1970) *Experientia* **26**: 1199-2000
8. Henderson IW, Wales NAM (1974) *Endocr* **61**: 487-500
9. Babiker MM, Rankin JC (1978) *J Endocr* **76**: 347-358
10. Babiker M, Rankin JC (1979) *Gen Comp Endocrinol* **37**: 26-34
11. Pang PKT, Furspan PB, Sawyer WH (1983) *Amer Zool* **23**: 655-662
12. Sainsbury RJ, Balment RJ (1991) *J Endocr* **131** suppl: 123
13. Guibbolini ME, Lahlou B (1990) *Am J Physiol* **258**: R3-R9
14. Rodriguez M, Specker JL (1991) *Gen Comp Endocrinol* **83**: 249-257
15. Groves DJ, Batten TFC (1986) *Gen Comp Endocrinol* **62**: 315-326
16. Fryer JN, Leung E (1982) *Gen Comp Endocrinol* **48**: 425-431
17. Van den Dungen HM, Buijs RM, Pool CW, Terlouw M (1982) *J Comp Neurology* **212**: 146-157
18. Sanchez F, Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Aste N, Carretero J, Vazquez R (1991) *J Hirnforsch* **32**: 27-37
19. de Kloet ER, Joels M, Urban IJA (1990) W: de Wied D (red) *Neuropeptides Basics and Perspectives*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str 105-138
20. Binkley S (1988) W: Binkley S (red) *The Pineal Endocrine and Nonendocrine Function*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, str 175-184
21. Holder FC, Schroeder MD, Guerne JM, Vivien-Roels B (1979) *Gen Comp Endocrinol* **37**: 15-25
22. Zlokovic BV, Hyman S, McComb JG, Tang G, Rezai AR, Weiss MH (1991) *Am J Physiol* **260**: E633-E640
23. Meller WH, Lewis DA, Gehris TL, Kathol RG (1991) *Acta Endocrinologica* **125**: 378-384
24. Meeker RB, Michels KM, Hayward JN (1990) *Neurosci Letters* **114**: 225-230
25. Stehle J, Reuss S, Riemann R, Seidel A, Vollrath L (1991) *Neurosci Letters* **123**: 131-134
26. Yamase K, Takahashi S, Namura K, Haruta K, Kawashima S (1991) *Neurosci Letters* **130**: 255-258
27. Reppert SM, Schwartz WJ, Uhl GR (1987) *Trends Neurosci* **10**: 76-80
28. Burbach JPH, Wiegant VM (1990) W: de Wied (red) *Neuropeptides Basics and Perspectives*. Elsevier, North-Holland Amsterdam, str 45-103
29. Zachman A, Knijff SCM, Bolliet V, Ali MA (1991) *Neuroendocrinol Lett* **13**: 325-330
30. Falcon J, Collin J-P (1989) *Experientia* **45**: 909-913
31. Underwood H (1989) *Experientia* **45**: 914-921
32. Zachman A, Facon J, Knijff CM, Bolliet V, Ali MA (1992) *Gen Comp Endocrinol* **86**: 26-33
33. Meissl H, Martin C, Tabata M (1990) *J Comp Physiol A* **167**: 641-648
34. Skene DJ, Vivien-Roels, Pevet P (1991) *Gen Comp Endocrinol* **84**: 405-411
35. Hastings MH, Vance G, Maywood E (1989) *Experientia* **45**: 903-908
36. Morgan PJ, Williams LM (1989) *Experientia* **45**: 955-964
37. Gern WA, Greenhouse SS (1988) *Gen Comp Endocrinol* **71**: 163-174
38. Iigo M, Kezuka H, Aida K, Hanyu I (1991) *Gen Comp Endocrinol* **83**: 152-158
39. Ekström P, Vanecek J (1992) *Neuroendocrinology* **55**: 529-537

## IXth International Congress of Virology

Glasgow, UK, 8-13 August 1993

Info: CEP Consultants Ltd,

26-28 Albany Street, Edinburgh EHJ 3GH,  
Scotland, UK.



# Fenolowe metabolity wtórne jako sygnały roślin w oddziaływaniach międzygatunkowych

## Phenolic secondary metabolites as plant signals in interspecies interactions

PRZEMYSŁAW WOJTASZEK\*

### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Rola związków fenolowych w oddziaływaniach międzygatunkowych
  - II-1. Infekcja roślin wyższych przez bakterie z rodzaju *Agrobacterium*
  - II-2. Symbioza roślin strączkowych z bakteriami brodawkowymi
  - II-3. Pasożytnicze rośliny naczyniowe
  - II-4. Oddziaływania roślin wyższych z innymi organizmami
- III. Uwagi końcowe

### Contents:

- I. Introduction
- II. Role of phenolic compounds in interspecies interactions
  - II-1. Infection of higher plants by *Agrobacterium*
  - II-2. Symbiosis of legumes with nodule bacteria
  - II-3. Parasitic vascular plants
  - II-4. Interactions of higher plants with other organisms
- III. Concluding remarks

## I. Wprowadzenie

W trakcie rozwoju rośliny pewna część wytwarzanych przez nią substancji uwalniana jest do otoczenia, w sposób kontrolowany, tworząc specyficzny dla danego gatunku roślin „profil chemiczny”. Wśród wydzielanych substancji znajdują się również związki fenolowe — cząsteczki powstające na drodze przemian aminokwasów aromatycznych (głównie fenyloalaniny i, w mniejszym stopniu, tyrozyny), bądź ich bezpośrednich prekursorów. Dane zgromadzone do końca lat siedemdziesiątych wskazywały, że metabolity wtórne, zwłaszcza związki fenolowe, czy alkaloidy, funkcjonują głównie jako substancje zabezpieczające rośliny przed konkurencją ze strony innych roślin (allelopatia), przed roślinożercami oraz przed patogenami (odstraszanie i reakcje obronne). W latach osiemdziesiątych odkryto, iż pojawienie się niektórych związków fenolowych w otoczeniu roślin jest wykorzystywane przez inne organizmy zasiedlające fitosferę jako sygnał chemiczny wskazujący obecność odpowiedniego partnera oddziaływać [1].

\* dr, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Noskowskiego 12, 61-704 Poznań

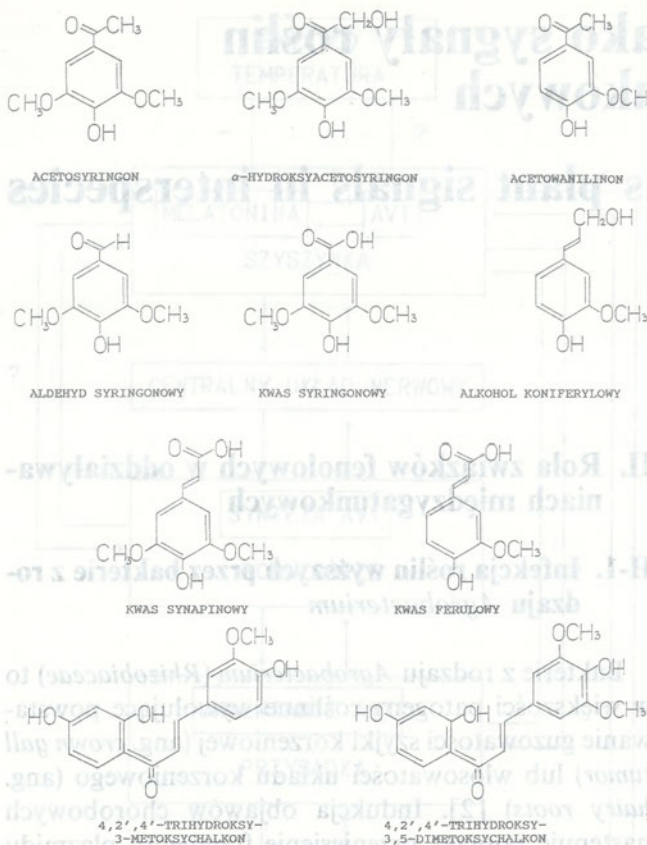
## II. Rola związków fenolowych w oddziaływaniach międzygatunkowych

### II-1. Infekcja roślin wyższych przez bakterie z rodzaju *Agrobacterium*

Bakterie z rodzaju *Agrobacterium* (*Rhizobiaceae*) to w większości patogeny roślinne wywołujące powstawanie guzowatości szczyki korzeniowej (ang. *crown gall tumor*) lub włosowatości układu korzeniowego (ang. *hairy roots*) [2]. Indukcja objawów chorobowych następuje poprzez przeniesienie fragmentu plazmidu (T-DNA) do komórek roślinnych i integrację T-DNA z genomem roślinnym [3]. Fragment T-DNA zawiera geny białek katalizujących syntezę związków o aktywności auksyn i cytokinin oraz geny enzymów biosyntezy opin [2]. Przeniesienie T-DNA do komórki roślinnej zależy od aktywności białek kodowanych przez tzw. region wirulentności (*vir*) na plazmidzie Ti oraz przynajmniej 4 różne regiony chromosomowego DNA [4]. Aktywacja genów regionu *vir*, a w konsekwencji przeniesienie T-DNA, ma miejsce tylko wtedy, gdy *Agrobacterium* rozpozna komórki roślinne podatne na infekcję.

Opracowanie techniki genów reporterowych [5] umożliwiło zbadanie aktywności *loci* regionu *vir*. Technika ta polega na łączeniu promotorów badanych genów z pozbawionym własnego promotora genem, którego produkt można łatwo oznaczyć ilościowo, np.  $\beta$ -galaktozydazę z *E. coli* (*lacZ*). Stąd też wprowadzenie układu Tn3-*lacZ* w odpowiednie miejsca regionu *vir* na plazmidzie Ti i uzyskanie połączeń typu *vir::lacZ* pozwoliło na zbadanie indukcji poszczególnych *loci* regionu przez związki chemiczne wydzielane przez rośliny [6]. Tą drogą zidentyfikowano cząsteczki sygnałowe specyficznym aktywnym transformację roślin: acetosyringon i  $\alpha$ -hydroksyacetosyringon (Ryc. 1) uwalniane z uszkodzonych komórek tytoniu *Nicotiana tabacum* [6]. Zidentyfikowane cząsteczki spełniały wszystkie warunki wymagane do tego, by aktywacja układu przeniesienia T-DNA następowała jedynie w obecności wrażliwych komórek roślinnych. Oba związki: 1) są wytwarzane w różnych tkankach roślin, 2) pojawiają się specyficznym w wydzielinach uszkodzonych komórek, 3) aktywują ekspresję wszystkich in-





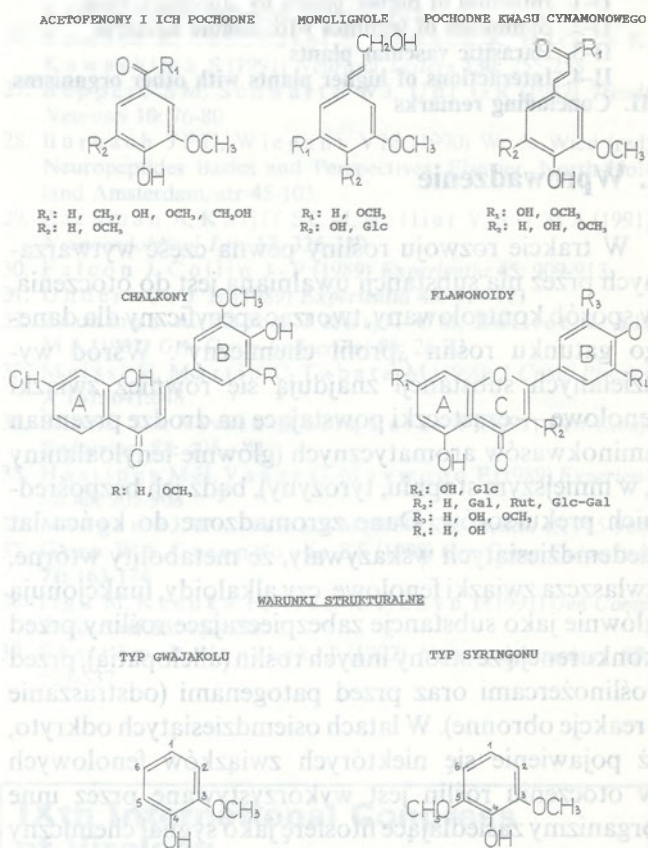
Ryc. 1. Związki fenolowe silnie aktywujące ekspresję genów *vir* *Agrobacterium tumefaciens*.

dukowalnych *loci* regionu *vir*, 4) ich wytwarzanie jest stymulowane przez uszkodzenie tkanki roślinnej, 5) wytwarzanie sygnałów następuje tylko w aktywnych metabolicznie komórkach [6]. Ponadto, przebadano wiele różnych związków fenolowych, podobnych strukturalnie lub niosących analogiczny „motyw strukturalny” w obrębie bardziej złożonej cząsteczki. Tylko niektóre z nich zostały wyizolowane ze źródeł naturalnych. Większość używano do badań w postaci chemicznie czystych związków. Wyróżniono ponad 30 związków aktywujących geny regionu *vir*. Jako silne induktory genów *vir* zidentyfikowano: acetosyringon,  $\alpha$ -hydroksyacetosyringon, acetowanilinon, aldehyd syringonowy, kwas syringonowy, alkohol koniferylowy, kwas synapinowy, kwas ferulowy oraz 4,2',4'-trihydrokso-3-metoksychalkon i 4,2',4'-trihydrokso-3,5-dimetoksychalkon (Ryc. 1).

Porównanie budowy cząsteczek sygnalnych umożliwiło wyróżnienie 6 klas strukturalnych: 1) acetofenony i ich pochodne, 2) monolignole, 3) pochodne kwasu cynamonowego, 4) chalkony, 5) flawonoidy i 6) inne związki niosące wspólny „motyw strukturalny” (Ryc. 2). Zidentyfikowano dwa elementy struktury chemicznej warunkujące aktywność induktorową: 1) obecność pierścienia benzenowego podstawionego wg dwóch typów — gwajakolu (4-hydrokso-3-metokso-) lub syringonu (4-hydrokso-3,5-dimetokso-) oraz 2) obecność grupy hydroksylowej w pozycji C4 (Ryc. 2). Grupa metoksylova w pozycji 3 jest niezbędna, natomiast większość silnych induktorów zawiera również iden-

tyczny podstawnik w pozycji 5. Grupa hydroksylowa przy C5 obniża aktywność induktora (kwas 5-hydroksyferulowy jest nieaktywny — [7]). Struktura podstawnika w pozycji 1 nie odgrywa tak istotnej roli, choć i tu występują pewne prawidłowości. Wyższej aktywności sprzyja obecność tlenu karbonylowego w odległości 1 lub 3 atomów węgla od pierścienia benzenowego. Wiązanie podwójne pomiędzy tlenem karbonylowym a pierścieniem również podwyższa aktywność induktora. Estry metylowe kwasów hydroksycynamonowych są bardziej efektywnymi induktorami genów *vir* niż wolne kwasy [7]. Większość związków monocyklicznych najsilniej aktywuje geny *vir* w stężeniach 200-500  $\mu$ M, choć np. acetosyringon swe maksimum osiąga już przy 10  $\mu$ M, a kwas ferulowy przy 50-100  $\mu$ M [8]. Dla związków oligocyklicznych (chalkony, flawonoidy) decydujące znaczenie ma układ podstawników pierścienia B (Ryc. 2). O ile jednak chalkony aktywują geny *vir* w stężeniach 10-50  $\mu$ M, a nawet wzbudzają słabą aktywność już przy 0.1  $\mu$ M [7], o tyle najaktywniejsze glikozydy flawonoidów indukują ekspresję genów *vir* dopiero w stężeniach rzędu 2-5 mM [9].

Indukcja genów *vir* przez związki fenolowe, szczególnie monocykliczne, ulega znacznemu wzmocnieniu w obecności monosacharydów z grupy aldoz lub ich kwasowych pochodnych [10]. Proces indukcji zależy także od kilku czynników środowiskowych: tempera-



Ryc. 2. Klasy strukturalne związków fenolowych działających jako induktory genów *vir* *Agrobacterium*. Wskazano podstawniki, których występowanie nie nosi aktywności induktorowej danego związku. Pokazano również typy budowy rdzenia cząsteczki aktywnej.



tury, pH i ciśnienia osmotycznego oraz obecności związków fosforu [8, 11].

Wyniki omówionych wyżej badań pozwoliły na zaproponowanie mechanizmu indukcji genów *vir Agrobacterium*. Uszkodzenie tkanek roślinnych powoduje rozerwanie ścian komórkowych i uwolnienie mono- i oligosacharydów, zarówno mechaniczne, jak i na drodze enzymatycznej przy udziale glikozydaz ścian komórkowych. Oligosacharydy mogą indukować syntezę fitoaleksyn i innych metabolitów wtórnych. Prawdopodobnie w ten sposób następuje synteza fenolowych induktorów genów *vir*. Możliwe też, że niektóre aktywatory *loci* regionu *vir* uwalniane są bezpośrednio ze ścian komórkowych. Chemotaksja *Agrobacterium* do miejsca zranienia następuje dzięki współdziałaniu białka ChvE — wiążącego specyficznie monosacharydy i białka VirA — receptora związków fenolowych. Po związaniu właściwego sygnału fenolowego (przy udziale białek p10 i p21 — [12]), histydynowa kinaza białek — VirA, fosforyluje białko VirG, które w tej postaci aktywuje pozostałe *loci* regionu *vir* [11].

Niewyjaśniona pozostaje kwestia powszechności występowania induktorów genów *vir* i korelacja z zasięgiem taksonomicznym roślin atakowanych przez *Agrobacterium*. Przyjmuje się [13], że *Agrobacterium* wywołuje nowotworzenie u roślin dwuliściennych i nagozależkowych, a nie poraża roślin jednoliściennych. Analiza GC-MS wydzielin uszkodzonych komórek roślin należących do różnych rodzin [14] wykazała, że acetosyringon i inne pochodne acetofenonu występują w zasadzie tylko w roślinach z rodziny *Solanaceae*. W innych roślinach stwierdzano przede wszystkim obecność kwasów hydroksycynamonowych i ich estrów metylowych. Związki te znajdowano jednak również u przedstawicieli jednoliściennych [14]. Proponuje się wobec tego, iż inne, dotąd nie poznane, czynniki odgrywają równie istotną rolę w transformacji komórek roślinnych. Duże znaczenie przypisuje się koordynacji czasowej infekcji *Agrobacterium* z cyklem rozwojowym komórek roślinnych, zwłaszcza z podziałami komórkowymi [3]. Sugeruje się także, iż istnieje związek pomiędzy fenolowymi sygnałami kontrolującymi podziały komórkowe roślin a sygnałami inicjującymi ekspresję genów *vir Agrobacterium* [1, 15].

## II-2. Symbioza roślin strączkowych z bakteriami brodawkowymi

Symbiozę roślin strączkowych i rizobiów (bakterii brodawkowych) można uznać za najlepiej poznany system oddziaływań roślin wyższych z innymi organizmami. Rośliny wchodzące w symbiozę to wyłącznie przedstawiciele rodziny *Leguminosae*. Jedynym znanym wyjątkiem jest rodzaj *Parasponia* (*Ulmaceae*; [16]). Z kolei rizobia zalicza się do trzech, filogenetycznie odległych, rodzajów: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* i *Azorhizobium* [16, 17]. Rośliny z danego gatunku

mogą być infekowane przez szczepy bakterii zaliczanych do różnych gatunków i odwrotnie, dany szczep bakterii może wytwarzać brodawki w symbiozie z roślinami z różnych gatunków [18, 19]. Dany szczep rizobiów może indukować tworzenie brodawek korzeniowych i/lub pędowych. Dokonują tego jedynie niektóre bakterie rizosfery oddziałujące z wrażliwymi komórkami korzenia rośliny. Pierwszym widocznym znakiem tych oddziaływań jest skręcanie się włóśników korzeniowych i indukcja podziałów merystematycznych komórek korzenia. Infekcja włóśników korzeniowych prowadzi do проникnięcia bakterii do tworzącej się brodawki przez nić infekcyjną. Możliwe są również inne drogi infekcji: pomiędzy komórkami epidermy korzenia (ang. *crack entry*) lub np. w miejscach tworzenia korzeni bocznych. Bakterie wnikać do komórek brodawki przekształcają się w bakteroidy — formy bakterii zdolne do wiązania N<sub>2</sub>. Tworzy się funkcjonalna brodawka, a wytworzony amoniak wykorzystywany jest przez roślinę jako źródło azotu.

Inicjacja symbiozy zależy od aktywności szeregu genów zarówno roślin (noduliny; [20]), jak i bakterii (geny *nod* i *nol*, *exo*; [21, 22]). Partnerzy symbiozy komunikują się ze sobą wymieniając sygnały aktywujące grupy genów symbiotycznych. Związki fenolowe (wydzielane przez nasiona i korzenie roślin) zidentyfikowano zarówno jako chemoatraktanty bakterii, jak i pierwsze sygnały inicjacji symbiozy indukujące ekspresję genów *nod* bakterii [22-24]. Te z kolei kodują enzymy katalizujące syntezę tzw. czynników Nod — morfogenów o rdzeniu opartym na oligomerach N-acetyloglukozaminy, odpowiednio modyfikowanych w zależności od szczepu bakterii. Czynniki Nod indukują skręcanie włóśników korzeniowych i podziały komórek kory korzenia i uznawane są za wyznacznik specyficzności symbiozy [18, 19, 22, 25].

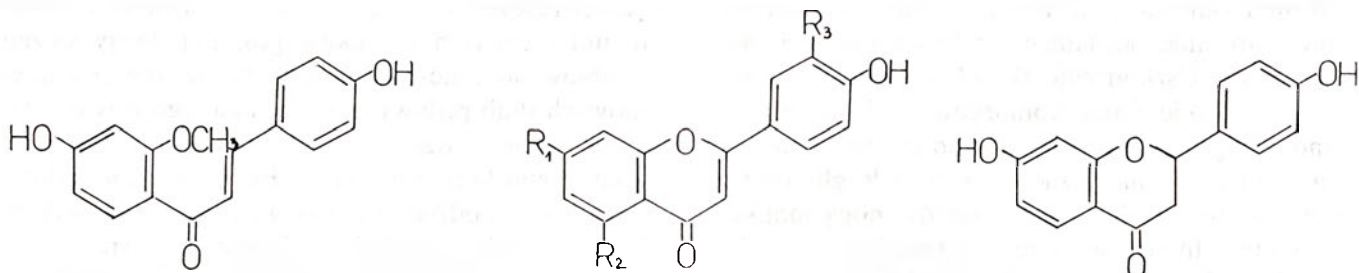
Chemotaksja rizobiów odgrywa istotną rolę na etapie kolonizacji korzeni przez bakterie. Rizobia reagują zarówno na obecność cukrów i aminokwasów, jak i sygnałów fenolowych. Prawdopodobnie istnieją odrębne szlaki indukcji chemotaksji dla obu grup związków [26]. Szybko rosnące bakterie *Rhizobium* reagują chemotaktycznie na flawonoidy — induktory genów *nod* [19, 26]. U *Bradyrhizobium*, izoflawony — silne aktywatory genów *nod* — nie wywołują odpowiedzi chemotaktycznej, natomiast słabe induktory genów *nod* (kwasy hydroksycynamonowe, alkohol koniferylowy) działają chemoatraktywnie [27].

Podobnie jak w przypadku *Agrobacterium* (Rozdz. II-1), system genów reporterowych (połączenia genowe typu *nod::lacZ*) umożliwił identyfikację flawonoidów indukujących ekspresję regulonu *nod* [24]. W połowie lat osiemdziesiątych prawie równocześnie pojawił się szereg prac opisujących indukcję ekspresji genów *nod* w obecności sygnałów fenolowych ze źródeł naturalnych (wydzieliny nasion i korzeni, ekstrakty korzeniowe) [28-33]. W wydzielinach korzeniowych i ekstraktach z korzeni roślin strefy umiarkowanej (koniczyna,

CHALKON

FLAWONY

FLAWANON



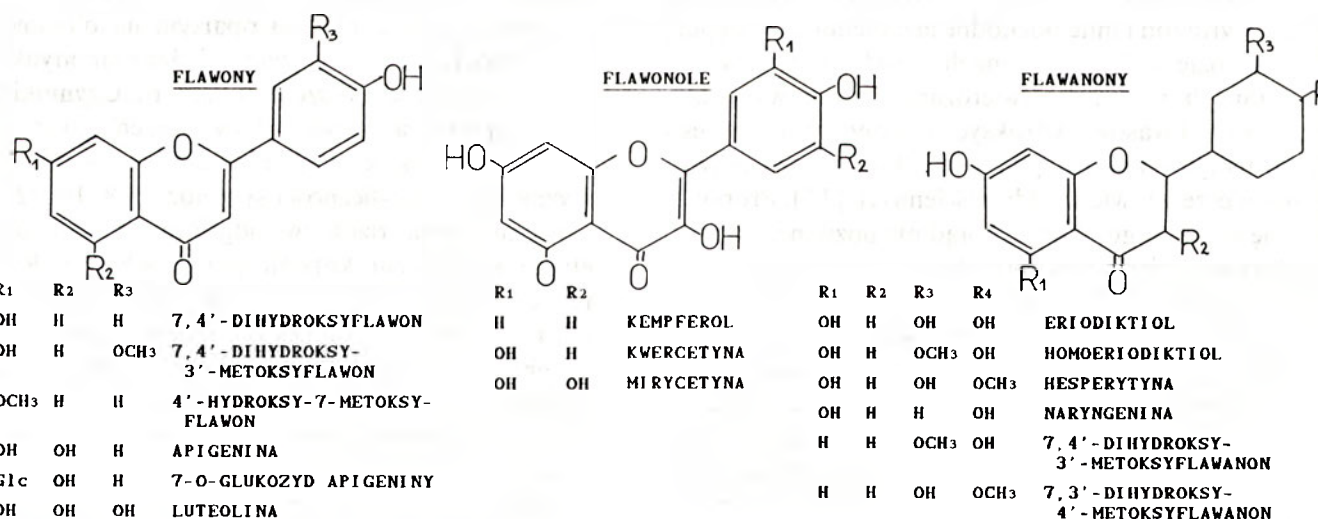
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>		
4, 4' - DIHYDROKSY-2' -METOKSYCHALKON	OH	OH	OH	LUTEOLINA	7, 4' - DIHYDROKSYFLAWANON
	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	CHRYZOERIOL	
	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	5-METOKSYLUTEOLINA	
	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	5, 3' - DIMETOKSYLUTEOLINA	
	Glc	OH	OH	7-O-GLUKOZYD LUTEOLINY	

Ryc. 3. Związki fenolowe zidentyfikowane jako aktywatory ekspresji genów *nod* w układzie symbiotycznym *Medicago sativa* (lucerna) — *Rhizobium meliloti*.

lucerna, groch, wyka), jako aktywatory genów *nod* *Rhizobium* zidentyfikowano głównie flawony, flawonony i chalkony (Ryc. 3, 4). Induktorem genów *nod* *Bradyrhizobium* były głównie izoflawony (Ryc. 5) wydzielane przez rośliny strefy tropikalnej, np. soję. Dzięki opracowaniu odpowiedniego testu agarowego wykazano, że wydzielanie aktywatorów ekspresji genów *nod* zachodzi w ściśle określonej strefie korzenia: pomiędzy jego wierzchołkiem i pierwszymi dojrzałymi

włosnikami [29, 34], czyli w strefie infekcji korzenia przez rizobia [19, 23, 24]. Udowodniono także istnienie „okna aktywacji”: tylko bakterie we wczesnej fazie wzrostu logarytmicznego reagowały na obecność flawonoidów *in vitro* [30].

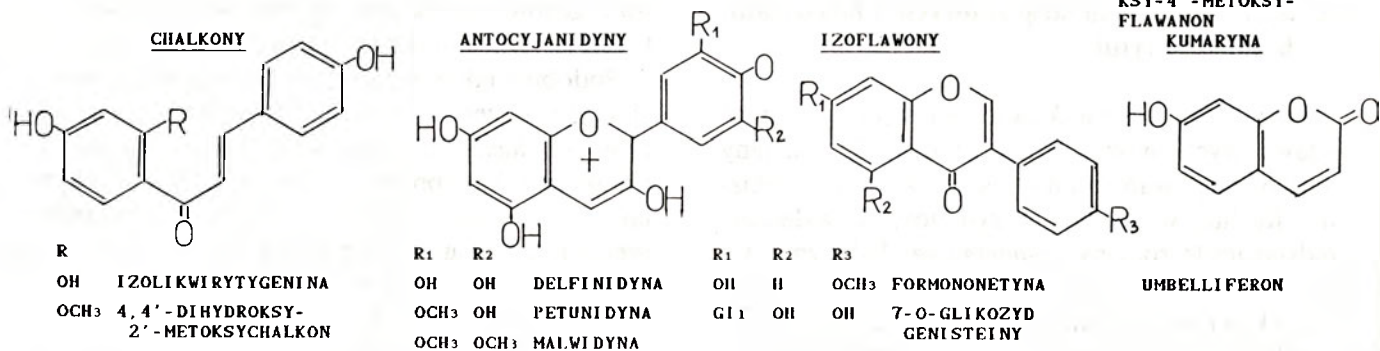
Badania połączeń genowych typu *nod*:*lacZ* wykazały, iż podstawowym elementem regulującym indukcję genów *nod* jest białko NodD. Aktywność pozostałych genów *nod*, zarówno wspólnych dla wszystkich



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	
OH	H	H	7, 4' - DIHYDROKSYFLAWON
OH	H	OCH <sub>3</sub>	7, 4' - DIHYDROKSY-3' -METOKSYFLAWON
OCH <sub>3</sub>	H	H	4' - HYDROKSY-7 -METOKSY-FLAWON
OH	OH	H	APIGENINA
Glc	OH	H	7-O-GLUKOZYD APIGENINY
OH	OH	OH	LUTEOLINA

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
H	H	KEMPFEROL
OH	H	KWERCETYNA
OH	OH	MIRYCETYNA

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
OH	H	OH	OH	ERIODIKTIOL
OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH	HOMOERIODIKTIOL
OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>	HESPERYTYNA
OH	H	H	OH	NARYNGENINA
H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	7, 4' - DIHYDROKSY-3' -METOKSYFLAWANON
H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	7, 3' - DIHYDROKSY-4' -METOKSYFLAWANON
OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	3, 5, 7, 3' - TETRAHYDRO-FLAWANON



R	
OH	IZOLIKWIRYTYGENINA
OCH <sub>3</sub>	4, 4' - DIHYDROKSY-2' -METOKSYCHALKON

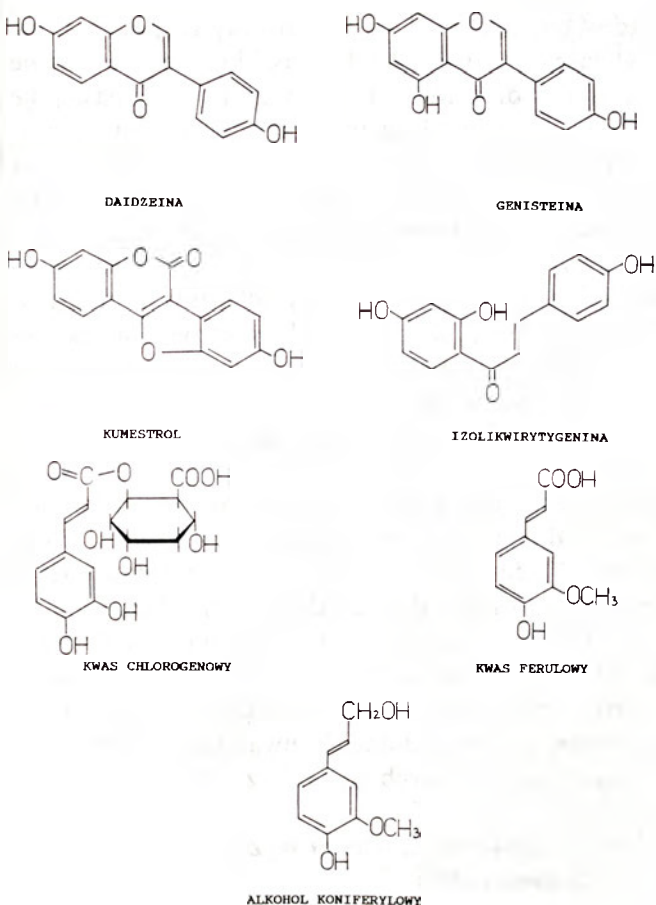
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
OH	OH	DELFINIDYNA
OCH <sub>3</sub>	OH	PETUNIDYNA
OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	MAIWI DYNA

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	
OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	FORMONONETYNA
Glc	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	7-O-GLIKOZYD GENISTEINY

UMBELLI FERON

Ryc. 4. Struktura fenolowych induktorów genów *nod* bakterii *Rhizobium trifolii* i *Rhizobium leguminosarum*.





Ryc. 5. Budowa sygnałów chemicznych aktywujących ekspresję genów *nod* *Bradyrhizobium japonicum*.

rizobiów (*nod ABC*), jak i specyficznych dla danego szczepu bakterii, zależy od aktywności białka NodD oraz od obecności związków fenolowych [22, 23]. Białko NodD, konstytutywnie wytwarzane w komórkach rizobiów, rozpoznaje związki fenolowe wydzielane przez rośliny stanowiąc wyznacznik specyficzności oddziaływań. Białko NodD *R. meliloti*, *R. leguminosarum*, czy *R. trifolii* reaguje jedynie na obecność kilku flawonoidów. Białko NodD szczepu *Rhizobium* NGR234 (infekującego rośliny z wielu różnych gatunków) ulega aktywacji w obecności szerokiego spektrum związków fenolowych. Z drugiej strony, dany związek fenolowy działa różnie na białka NodD z różnych szczepów bakterii, np. daidzeina (izoflawon) jest silnym induktorem genów *nod B. japonicum*, lecz nie aktywuje (a nawet działa hamująco) genów *nod R. leguminosarum*, czy *R. trifolii* [24].

Rośliny wydzielają do otoczenia wiele różnych związków fenolowych. Skład, tak ilościowy, jak i jakościowy mieszaniny zależy, między innymi, od gatunku rośliny i jej stadium rozwoju. Na przykład w układzie symbiotycznym *Medicago sativa* (lucerna) — *R. meliloti* stwierdzono wyraźne zróżnicowanie strukturalne induktorów genów *nod* w zależności od tego, czy zostały one wydzielone przez pęczniące nasiona, czy też przez korzenie młodych siewek. Flawonoidy wydzielone przez korzenie nie posiadały grupy hydroksylowej w pozycji C5 [35], natomiast związki uwolnione z nasion zawierały podstawnik hydroksylowy lub

metoksylowy w tej pozycji (Ryc. 3; [28, 36]). Wykazano też, że wydzielanie flawonoidów indukujących geny *nod* jest wynikiem ich równoczesnej syntezy w korzeniu, przy czym wydzielanie to jest procesem aktywnym, a nie biernym wymyciem flawonoidów z komórek epidermy [37]. Flawonoidy mogą być wydzielane do otoczenia w postaci aglikonów lub glikozydów (mniej aktywne, ale lepiej rozpuszczają się w roztworach wodnych). Aglikony mogą być uwalniane z odpowiednich glikozydów przez glikozydazy, tak pochodzenia bakteryjnego, jak i roślinnego, co zwiększa ilość czynnego aktywatora genów *nod* [38]. Jest to tym bardziej istotne, iż ilość wydzielanego induktora może być czynnikiem ograniczającym tworzenie brodawek [39]. Chociaż induktorami genów *nod* są głównie związki oligocykliczne (flawonoidy, chalkony), wykazano również, iż monocykliczne związki aromatyczne, takie jak: alkohol koniferylowy, kwas chlorogenowy, czy kwas ferulowy (Ryc. 5), słabo aktywują geny *nod B. japonicum* [27].

Regulujące działanie flawonoidów prawdopodobnie nie ogranicza się tylko do etapu rozpoznania rośliny-gospodarza przez bakterie. Wyniki badań układu *Vicia sativa* subsp. *nigra* (wyka) — *R. leguminosarum* wykazały, że infekcja roślin przez bakterie wywołuje wzmożone wydzielanie aktywatorów genów *nod*, przy czym zmianie ulega nie tyle ilość wydzielanych flawonoidów, lecz skład mieszaniny związków fenolowych [40]. Zjawiskiem często obserwowanym w badaniach aktywacji genów *nod* było wzajemne oddziaływanie związków fenolowych o różnej aktywności. Stwierdzono, że induktory wydzielane przez nasiona i/lub korzenie lucerny mogą współdziałać synergicznie w aktywacji genów *nod R. meliloti* [36]. Z kolei aktywność izoflawonów indukujących geny *nod B. japonicum* może być hamowana przez flawony, flawanony lub flawonole o podobnym układzie podstawników w pozycjach C5, C7 i/lub C4' [41].

Inicjacja symbiozy przez odpowiednie aktywatory zależy od wielu czynników. Intensywność wydzielania flawonoidów, jak i ich akumulacji w korzeniach zależy od formy i stężenia azotu w otoczeniu [42]. Azot może być również czynnikiem regulującym aktywność genów *nod* bakterii [43, 44]. Wydzielanie flawonoidów zależy od pH otoczenia oraz stężenia jonów dwuwartościowych, szczególnie Ca [45]. Podobne zależności wykazuje ekspresja genów *nod* [46].

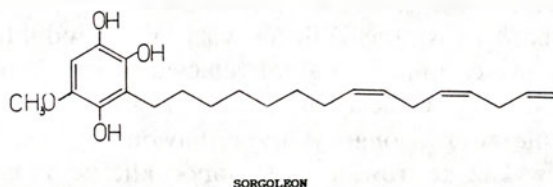
### II-3. Pasożytnicze rośliny naczyniowe

Rośliny pasożytnicze (ponad 3000 gatunków) można znaleźć pośród roślin okrytonasiennych z 20 rodzin. Wszystkie rośliny pasożytnicze charakteryzuje zdolność do wytwarzania zróżnicowanej anatomicznie i morfologicznie, lecz identycznej funkcjonalnie, struktury zwanej haustorium (ssawka) umożliwiającej korzystanie z zasobów rośliny-gospodarza. Początkowe stadia rozwoju roślin pasożytniczych z rodzin *Scrop-*

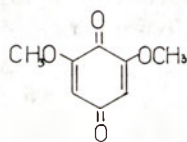
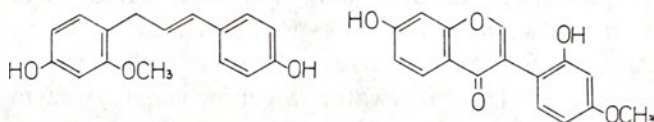
hulariaceae, Orobanchaceae, Balanophoraceae, Rafflesiaceae, Hydnoraceae, i Lennonaceae regulowane są przez sygnały chemiczne roślin-gospodarzy. Pierwszy sygnał indukuje kiełkowanie nasion pasożyta. Wytworzenie funkcjonującego haustorium następuje tylko w obecności drugiego sygnału chemicznego produkowanego przez roślinę-gospodarza [1, 47, 48].

Hydrochinon o złożonej budowie — sorgoleon-358 (Ryc. 6) był pierwszym zidentyfikowanym sygnałem

STYMULATOR KIEŁKOWANIA NASION



INDUKTORY TWORZENIA HAUSTORIUM



Ryc. 6. Fenolowe sygnały molekularne warunkujące rozwój siewek roślin pasożytniczych: ich kiełkowanie oraz wytworzenie haustorium.

kiełkowania nasion pasożyta [49]. Wykryto go w wydzielinach korzeniowych sorgo — rośliny-gospodarza dla *Striga asiatica* — obok szeregu podobnych związków różniących się od formy 358 długością i/lub ilością wiązań podwójnych podstawnika alkilowego. W testach *in vitro* wykazano, że sorgoleon-358 wydzielany jest na całej długości korzenia sorgo. Hydrochinon jest cząsteczką niestabilną i w warunkach autooksydacji przechodzi w nieaktywny chinon. Powoduje to, iż wokół korzeni sorgo tworzy się zrównoważony gradient stężenia aktywnego stymulatora kiełkowania nasion pasożyta. W efekcie nasiona *Striga* kiełkują jedynie w pobliżu korzenia (do 5 mm) [1, 49].

Związki fenolowe nie są jedynymi sygnałami kiełkowania nasion roślin pasożytniczych. Z bawełny, rośliny-pułapki (w jej obecności nasiona *Striga* kiełkują, ale nie tworzą haustoriów), wyizolowano silny induktor seskwiterpenoidowy — strygotol [47].

Pasożyty fakultatywne (np. *Agalinis purpurea*), ros-

nąc w oddaleniu od korzeni rośliny-gospodarza, nie wytwarzają ssawek. W obecności korzeni lub jedynie wydzielin korzeniowych rośliny-gospodarza następuje błyskawiczna indukcja tworzenia haustoriów. Z traganu, wydzieliny *Astragalus* ssp, wyizolowano dwa stymulatory tworzenia haustorium u *Agalinis* (Ryc. 6). Ksenognozyna A zidentyfikowano jako cynamylofenol [50], a ksenognozyna B jako 2'-hydroksyformononetynę [51]. Badania syntetycznych analogów ksenognozyny A wykazały, iż krytycznymi dla aktywności biologicznej elementami struktury są: 1) grupa metoksylova fenolu w pozycji *meta* oraz 2) obecność propenowego wiązania podwójnego [51].

*Striga asiatica* (pasożyt obligatoryjny) ma silnie ograniczone możliwości rozwoju. Po wykiełkowaniu, siewki zdolne są do wytworzenia ssawek przez około 5 dni [1]. Sygnał indukujący tworzenie haustorium zidentyfikowano jako 2,6-dimetoksy-4-benzochinon (2,6-DMBQ — Ryc. 6; [52]). Związku tego nie wyizolowano jednak z wydzielin korzeniowych, a z powierzchni korzenia. Przypuszcza się, że pasożyt wydziela do otoczenia enzymy zdolne do uwalniania induktorów ze ścian komórkowych gospodarza [1].

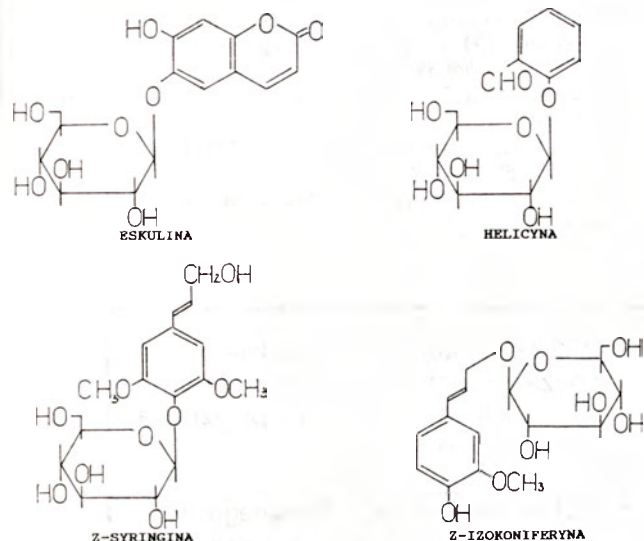
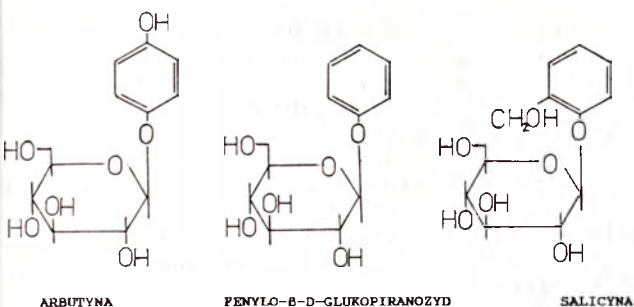
## II-4. Oddziaływania roślin wyższych z innymi organizmami

Większość szczepów *Pseudomonas syringae* — patogena wielu roślin jedno- i dwuliściennych, wytwarza fitotoksynę — syringomycynę, która wywołuje objawy nekrotyczne u roślin zakłócając transport jonów przez błony. Kluczową rolę w syntezie toksyny odgrywa białko kodowane przez gen *syrB*. Wykazano, że kontrola ekspresji tego genu zachodzi przy synergicznej współpracy glikozydów fenolowych i sacharydów. Jako aktywne sygnały fenolowe zidentyfikowano arbutynę, fenylo-β-D-glukopiranozyd oraz salicynę. Słabymi induktorami okazały się również eskulina i helicyna (Ryc. 7). Aktywność sygnałów fenolowych, podobnie jak u *Agrobacterium* (Rozdz. II-1) ulegała wzmocnieniu w obecności cukrów takich jak D-fruktoza, D-mannoza i sacharoza [53].

Przedstawiciele rodziny *Xylariaceae* — grzybów zasiedlających tkanki roślin bez wywoływania objawów chorobowych — rozpoznają roślinę-gospodarza również dzięki obecności związków fenolowych. Początkowe etapy infekcji roślin przez askospory *Xylariaceae* następują na drodze złożonej sekwencji zdarzeń określanej mianem eklozji. Proces ten indukowany jest przez glikozylowane monolignole: Z-syringinę i Z-izokoniferynę (Ryc. 7; [54]). Związki te, w odróżnieniu od konformerów E (*trans*) związanych w polimerach lignin, występują w korze drzew w postaci monomerów, a więc jako łatwo dostępne sygnały molekularne.

Większość roślin okryto- i nagonasiennych, paproci oraz mszaków żyje w związku z grzybami endomikoryzy pęcherzykowo-arbuskularnej (ang. *vesicular-arbus-*





Ryc. 7. Glikozydy fenolowe indukujące ekspresję genu *syxB* *Pseudomonas syringae* (silne induktory: arbutyna, fenyl- $\beta$ -D-glukopiranozyd, salicyna; słabe induktory: eskulina, helicyna) oraz sygnały fenolowe rozpoznawane przez askospory grzybów z rodziny Xylariaceae (Z-syringina, Z-izokoniferyna).

*ular mycorrhizae* = VAM). W 1991 roku ukazały się prace z dwóch różnych laboratoriów, w których opisano stymulację rozwoju grzyba przez flawonoidy z wydzielin korzeniowych koniczyny i lucerny [55-57]. Wyniki te jednakże częściowo zaprzeczają sobie, gdyż izoflawon — formononetyna — hamujący kiełkowanie spor w testach *in vitro* [55], uznany został, obok biochaniny A, za stymulator wzrostu strzępek i rozwoju procesu infekcyjnego [56, 57].

### III. Uwagi końcowe

Przedstawiony przegląd pokazuje, iż stan zaawansowania badań nad poszczególnymi układami oddziałujących ze sobą organizmów jest bardzo zróżnicowany: od pierwszych obserwacji fizjologicznych (mikoryza VAM) poprzez obserwacje cytologiczne (rośliny pasożytnicze) do badań wykorzystujących techniki biologii molekularnej (oddziaływania roślin z *Agrobacterium* czy *Rhizobium*). Szczególnie wyniki tych ostatnich badań wykazały, że pojawienie się fenolowych sygnałów chemicznych w otoczeniu rośliny może być odebrane i rozpoznane przez organizmy fitosfery. Co więcej, wydzielane przez rośliny związki

fenolowe mogą precyzować, zarówno w czasie, jak i przestrzeni, zależności pomiędzy oddziałującymi ze sobą organizmami. W efekcie, fenolowe cząsteczki sygnałowe wywołują, poprzez aktywację szeregu genów „odbiorcy”, specyficzną reakcję prowadzącą do nawiązania kontaktu i utworzenia mniej lub bardziej trwałych połączeń.

Artykuł otrzymano 19 października 1992 r.  
Zaakceptowano do druku 18 lutego 1993 r.

### Piśmiennictwo

- Lynn DG, Chang M (1990) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**: 497-526
- Hooykaas PJJ (1989) W: Hopwood DA, Chater KF (red) *Genetics of Bacterial Diversity*. Academic Press, Londyn San Diego Nowy Jork Berkeley Boston Sydney Toronto
- Binns AN (1990) *Physiol Plant* **79**: 135-139
- Zambryski P, Tempe J, Schell J (1989) *Cell* **56**: 193-201
- Stachel SE, An G, Flores C, Nester EW (1985) *EMBO J* **4**: 891-898
- Stachel SE, Messens E, Van Montagu M, Zambryski P (1985) *Nature (Lond)* **318**: 624-629
- Spencer PA, Towers GHN (1988) *Phytochemistry* **27**: 2781-2785
- Melchers LS, Regensburg-Tuink AJG, Schilperoort RA, Hooykaas PJJ (1989) *Mol Microbiol* **3**: 969-977
- Zerback R, Dressler K, Hess D (1989) *Plant Sci* **62**: 83-91
- Ankenbauer RG, Nester EW (1990) *J Bacteriol* **172**: 6442-6446
- Winans SC (1992) *Microbiol Rev* **56**: 12-31
- Lee K, Dudley MW, Hess KM, Lynn DG, Joerger RD, Binns AN (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 8666-8670
- De Cleene M, De Ley J (1976) *Bot Rev* **43**: 389-466
- Spencer PA, Towers GHN (1991) *Phytochemistry* **30**: 2933-2937
- Hess KM, Dudley MW, Lynn DG, Joerger RD, Binns AN (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7854-7858
- Sprent JI (1989) *New Phytol* **111**: 129-153
- Young JPW, Johnston AWB (1989) *Trends Ecol Evolut* **4**: 341-349
- Fisher RF, Long SR (1992) *Nature (Lond)* **357**: 655-660
- Dénarié J, Debelle F, Rosenberg C (1992) *Annu Rev Microbiol* **46**: 497-531
- Verma DPS, Hu C-A, Zhang M (1992) *Physiol Plant* **85**: 253-265
- Martinez E, Romero D, Palacios D (1990) *Crit Rev Plant Sci* **9**: 59-93
- Kondorosi A, Kondorosi E, John M, Schmidt J, Schell J (1991) W: Setlow JK (red) *Genetic Engineering* t. 13. Plenum Press, Nowy Jork, str. 115-136
- Long SR (1989) *Cell* **56**: 203-214
- Rolfe BG (1988) *BioFactors* **1**: 3-10
- Hirsch AM (1992) *New Phytol* **122**: 211-237
- Caetano-Anollés G, Crist-Estes DK, Bauer WD (1988) *J Bacteriol* **170**: 3164-3169
- Kape R, Parniske M, Werner D (1991) *Appl Environ Microbiol* **57**: 316-319
- Peters NK, Frost JW, Long SR (1986) *Science* **233**: 977-980
- Redmond JW, Batley M, Djordjevic MA, Innes RW, Kuempel PL, Rolfe BG (1986) *Nature (Lond)* **323**: 632-635
- Djordjevic MA, Redmond JW, Batley M, Rolfe BG (1987) *EMBO J* **6**: 1173-1179
- Firmin JL, Wilson KE, Rossen L, Johnston AWB (1986) *Nature (Lond)* **324**: 90-92
- Zaat SAJ, Wijffelman CA, Spaik HP, Van Brussel AAN, Okker RJH, Lugtenberg BJJ (1987) *J Bacteriol* **169**: 198-204



33. Kosslak RM, Bookland R, Barkei J, Paaren HE, Appelbaum ER (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7428-7432
34. Peters NK, Long SR (1988) *Plant Physiol* **88**: 396-400
35. Maxwell CA, Hartwig UA, Joseph CM, Phillips DA (1989) *Plant Physiol* **91**: 842-847
36. Hartwig UA, Maxwell CA, Joseph CM, Phillips DA (1990) *Plant Physiol* **92**: 116-122
37. Maxwell CA, Phillips DA (1990) *Plant Physiol* **93**: 1552-1558
38. Hartwig UA, Phillips DA (1991) *Plant Physiol* **95**: 804-807
39. Kapulnik Y, Joseph CM, Phillips DA (1987) *Plant Physiol* **84**: 1193-1196
40. Van Brussel AAN, Recourt K, Pees E, Spaink HP, Tak T, Wijffelman CA, Kijne JW, Lugtenberg BJJ (1990) *J Bacteriol* **172**: 5394-5401
41. Kosslak RM, Joshi RS, Bowen BA, Paaren HE, Appelbaum ER (1990) *Appl Environ Microbiol* **56**: 1333-1341
42. Cho M-J, Harper JE (1991) *Plant Physiol* **95**: 435-442
43. Dusha I, Bakos A, Kondorosi A, De Bruijn FJ, Schell J (1989) *Mol Gen Genet* **219**: 89-96
44. Wang S-P, Stacey G (1990) *Mol Gen Genet* **223**: 329-331
45. Richardson AE, Djordjevic MA, Rolfe BG, Simpson J (1988) *Plant Soil* **109**: 37-47
46. Richardson AE, Simpson RJ, Djordjevic MA, Rolfe BG (1988) *Appl Environ Microbiol* **54**: 2541-2548
47. Stewart GR, Press MC (1990) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**: 127-151
48. Visser JH (1989) *Naturwissenschaften* **76**: 253-261
49. Chang M, Netzly DH, Butler LG, Lynn DG (1986) *J Am Chem Soc* **108**: 7858-7860
50. Lynn DG, Steffens JC, Kamat VS, Graden DW, Shabanowitz J, Riopel JL (1981) *J Am Chem Soc* **103**: 1868-1870
51. Steffens JC, Lynn DG, Kamat VS, Riopel JL (1982) *Ann Bot* **50**: 1-7
52. Chang M, Lynn DG (1986) *J Chem Ecol* **12**: 561-579
53. Mo Y-Y, Gross DC (1991) *J Bacteriol* **173**: 5784-5792
54. Chapela IH, Petrini O, Hagmann L (1991) *Physiol Mol Plant Pathol* **39**: 289-298
55. Tsai SM, Phillips DA (1991) *Appl Environ Microbiol* **57**: 1485-1488
56. Nair MG, Safir GR, Siqueira JO (1991) *Appl Environ Microbiol* **57**: 434-439
57. Siqueira JO, Safir GR, Nair MG (1991) *New Phytol* **118**: 87-93

## Polskie Towarzystwo Biochemiczne ogłasza konkurs na najlepszy wykład akademicki

### Regulamin nagrody

1. Intencją nagrody jest popularyzacja biochemii i biologii molekularnej oraz pozyskanie materiałów dydaktycznych.
2. Warunkiem wzięcia udziału w Konkursie jest przygotowanie wykładu na wybrany temat uwzględniający najnowsze osiągnięcia w tej dziedzinie oraz ilustrujących go materiałów w postaci maszynopisu, rysunków i kompletu przezroczy. Termin nadsyłania materiałów mija 30.04.1993 r.
3. Przewidziana jest Nagroda Główna w wysokości **3 milionów złotych** (w 1993 r.) oraz dwa wyróżnienia. Środki finansowe na Nagrodę zapewnia Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.
4. Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zorganizuje sesję, na której zostaną wygłoszone konkursowe wykłady. Maksymalny czas wystąpienia 2 × 45 minut.
5. Członkowie Zarządu Głównego tworzą Komisję Konkursową. Oceniają oni prezentację, wartość merytoryczną i dydaktyczną wykładów przyznając od 0 do 10 punktów. Komisja obraduje niejawnie, a protokół z obrad i inne materiały pozostają w dokumentacji Towarzystwa. Nagrodę uzyska osoba, która otrzyma największą liczbę punktów. Nazwisko zwycięzcy Konkursu zostanie podane do wiadomości Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w „Postępach Biochemii” oraz w „Listach”.
6. Materiały konkursowe: maszynopis wykładu, rysunki, przezrocza i programy komputerowe stają się własnością Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i będą rozpowszechniane w placówkach naukowych i dydaktycznych jako wykłady autorskie nagrodzonych osób, rekomendowane przez Oddziały Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Wymagana jest pisemna zgoda na przekazanie materiałów na własność Towarzystwa. Towarzystwo zastrzega sobie prawo do zakupu materiałów nienagrodzonych.
7. Niniejsza wersja regulaminu została uchwalona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w dniu 5 listopada 1990 roku i wchodzi w życie z dniem uchwalenia.

W 1993 roku sesja odbędzie się na początku czerwca. Nagroda Główna i wyróżnienia zostaną przyznane w dniu Konkursu.

# 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, deklaruje też gotowość konsultowania tekstu z Autorami.

Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznacznie z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „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 wskazań szczegółowych:**

**TEKST:** Maszynopis powinien być napisany jednostronnie czcionką wielkości standartowej, z podwójną interlinią, z lewym marginesem ok. 4 cm

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

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii” w 1993 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:**  
340 000 zł.

**Prenumerata krajowa indywidualna:**  
160 000 zł, (50% zniżki dla członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego).

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

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

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

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

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

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

**ILUSTRACJE:** Ryciny winny być gotowe do reprodukcji. Fotografie czarno-białe (kontrastowe), powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub kalce technicznej. Wskazane jest, aby ryciny były dwukrotnie większe od przyszłej reprodukcji, tj. w skali 2:1. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmie wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: tabele i ryciny noszą cyfry arabskie, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołówkiem preferowane miejsce umieszczenia tabeli, 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 „góradół” (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

Pokwitowanie dla wpłacającego	Odcinek dla posiadacza rachunku	Odcinek dla poczty lub banku
zł .....	zł .....	zł .....
słownie .....	słownie .....	słownie .....
wpłacający .....	wpłacający .....	wpłacający .....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym	imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym	imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek	na rachunek	na rachunek
Polskie Towarzystwo Biochemiczne	Polskie Towarzystwo Biochemiczne	Polskie Towarzystwo Biochemiczne
00-227 Warszawa, ul. Freta 16	00-227 Warszawa, ul. Freta 16	00-227 Warszawa, ul. Freta 16
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie	P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie	P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
37 00 44-1225-139-11	37 00 44-1225-139-11	37 00 44-1225-139-11
stempel	stempel	stempel
.....	.....	.....
podpis przyjmującego	podpis przyjmującego	podpis przyjmującego



tury, pH i ciśnienia osmotycznego oraz obecności związków fosforu [8, 11].

Wyniki omówionych wyżej badań pozwoliły na zaproponowanie mechanizmu indukcji genów *vir Agrobacterium*. Uszkodzenie tkanek roślinnych powoduje rozerwanie ścian komórkowych i uwolnienie mono- i oligosacharydów, zarówno mechaniczne, jak i na drodze enzymatycznej przy udziale glikozydaz ścian komórkowych. Oligosacharydy mogą indukować syntezę fitoaleksyn i innych metabolitów wtórnych. Prawdopodobnie w ten sposób następuje synteza fenolowych induktorów genów *vir*. Możliwe też, że niektóre aktywatory *loci* regionu *vir* uwalniane są bezpośrednio ze ścian komórkowych. Chemotaksja *Agrobacterium* do miejsca zranienia następuje dzięki współdziałaniu białka ChvE — wiążącego specyficznie monosacharydy i białka VirA — receptora związków fenolowych. Po związaniu właściwego sygnału fenolowego (przy udziale białek p10 i p21 — [12]), histydynowa kinaza białek — VirA, fosforyluje białko VirG, które w tej postaci aktywuje pozostałe *loci* regionu *vir* [11].

Niewyjaśniona pozostaje kwestia powszechności występowania induktorów genów *vir* i korelacja z zasięgiem taksonomicznym roślin atakowanych przez *Agrobacterium*. Przyjmuje się [13], że *Agrobacterium* wywołuje nowotworzenie u roślin dwuliściennych i nagozależkowych, a nie poraża roślin jednoliściennych. Analiza GC-MS wydzielin uszkodzonych komórek roślin należących do różnych rodzin [14] wykazała, że acetosyringon i inne pochodne acetofenonu występują w zasadzie tylko w roślinach z rodziny *Solanaceae*. W innych roślinach stwierdzano przede wszystkim obecność kwasów hydroksycynamonowych i ich estrów metylowych. Związki te znajdowano jednak również u przedstawicieli jednoliściennych [14]. Proponuje się wobec tego, iż inne, dotąd nie poznane, czynniki odgrywają równie istotną rolę w transformacji komórek roślinnych. Duże znaczenie przypisuje się koordynacji czasowej infekcji *Agrobacterium* z cyklem rozwojowym komórek roślinnych, zwłaszcza z podziałami komórkowymi [3]. Sugeruje się także, iż istnieje związek pomiędzy fenolowymi sygnałami kontrolującymi podziały komórkowe roślin a sygnałami inicjującymi ekspresję genów *vir Agrobacterium* [1, 15].

## II-2. Symbioza roślin strączkowych z bakteriami brodawkowymi

Symbiozę roślin strączkowych i rizobiów (bakterii brodawkowych) można uznać za najlepiej poznany system oddziaływań roślin wyższych z innymi organizmami. Rośliny wchodzące w symbiozę to wyłącznie przedstawiciele rodziny *Leguminosae*. Jedynym znanym wyjątkiem jest rodzaj *Parasponia* (*Ulmaceae*; [16]). Z kolei rizobia zalicza się do trzech, filogenetycznie odległych, rodzajów: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* i *Azorhizobium* [16, 17]. Rośliny z danego gatunku

mogą być infekowane przez szczepy bakterii zaliczanych do różnych gatunków i odwrotnie, dany szczep bakterii może wytwarzać brodawki w symbiozie z roślinami z różnych gatunków [18, 19]. Dany szczep rizobiów może indukować tworzenie brodawek korzeniowych i/lub pędowych. Dokonują tego jedynie niektóre bakterie rizosfery oddziałujące z wrażliwymi komórkami korzenia rośliny. Pierwszym widocznym znakiem tych oddziaływań jest skręcanie się włóśników korzeniowych i indukcja podziałów merystematycznych komórek korzenia. Infekcja włóśników korzeniowych prowadzi do wniknięcia bakterii do tworzącej się brodawki przez nić infekcyjną. Możliwe są również inne drogi infekcji: pomiędzy komórkami epidermy korzenia (ang. *crack entry*) lub np. w miejscach tworzenia korzeni bocznych. Bakterie wnikające do komórek brodawki przekształcają się w bakteroidy — formy bakterii zdolne do wiązania N<sub>2</sub>. Tworzy się funkcjonalna brodawka, a wytworzony amoniak wykorzystywany jest przez roślinę jako źródło azotu.

Inicjacja symbiozy zależy od aktywności szeregu genów zarówno roślin (noduliny; [20]), jak i bakterii (geny *nod* i *nol*, *exo*; [21, 22]). Partnerzy symbiozy komunikują się ze sobą wymieniając sygnały aktywujące grupy genów symbiotycznych. Związki fenolowe (wydzielane przez nasiona i korzenie roślin) zidentyfikowano zarówno jako chemoatraktanty bakterii, jak i pierwsze sygnały inicjacji symbiozy indukujące ekspresję genów *nod* bakterii [22-24]. Te z kolei kodują enzymy katalizujące syntezę tzw. czynników Nod — morfogenów o rdzeniu opartym na oligomerach N-acetyloglukozaminy, odpowiednio modyfikowanych w zależności od szczepu bakterii. Czynniki Nod indukują skręcanie włóśników korzeniowych i podziały komórek kory korzenia i uznawane są za wyznacznik specyficzności symbiozy [18, 19, 22, 25].

Chemotaksja rizobiów odgrywa istotną rolę na etapie kolonizacji korzeni przez bakterie. Rizobia reagują zarówno na obecność cukrów i aminokwasów, jak i sygnałów fenolowych. Prawdopodobnie istnieją odrębne szlaki indukcji chemotaksji dla obu grup związków [26]. Szybko rosnące bakterie *Rhizobium* reagują chemotaktycznie na flawonoidy — induktory genów *nod* [19, 26]. U *Bradyrhizobium*, izoflawony — silne aktywatory genów *nod* — nie wywołują odpowiedzi chemotaktycznej, natomiast słabe induktory genów *nod* (kwasy hydroksycynamonowe, alkohol koniferylowy) działają chemoatraktywnie [27].

Podobnie jak w przypadku *Agrobacterium* (Rozdz. II-1), system genów reporterowych (połączenia genowe typu *nod::lacZ*) umożliwił identyfikację flawonoidów indukujących ekspresję regulonu *nod* [24]. W połowie lat osiemdziesiątych prawie równocześnie pojawił się szereg prac opisujących indukcję ekspresji genów *nod* w obecności sygnałów fenolowych ze źródeł naturalnych (wydzieliny nasion i korzeni, ekstrakty korzeniowe) [28-33]. W wydzielinach korzeniowych i ekstraktach z korzeni roślin strefy umiarkowanej (koniczyna,



