

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

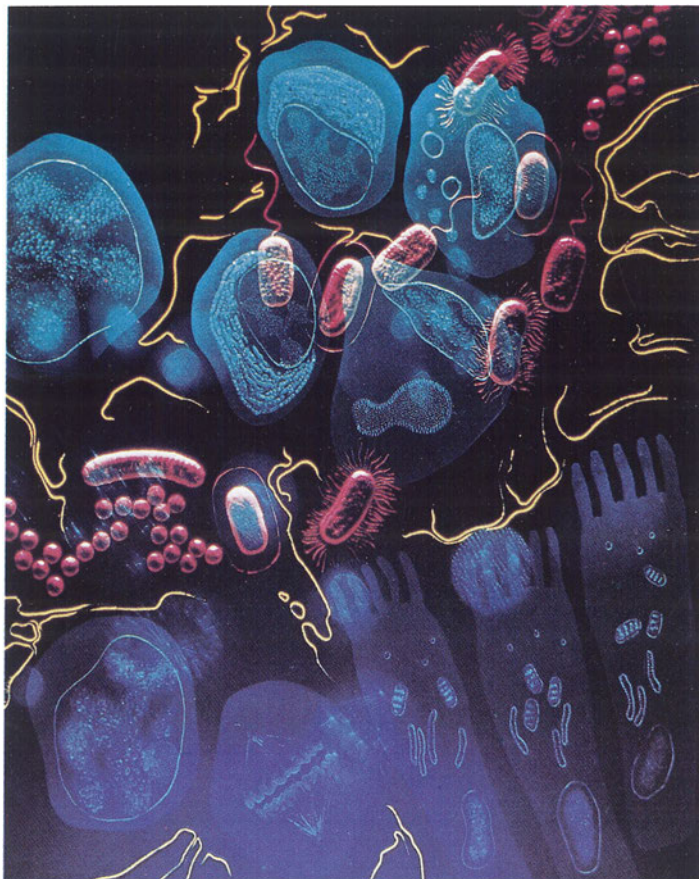
# POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN  
0032-5422

## Advances in Biochemistry

TOM 41, NR 4 1995

Czy znamy już gen śmierci? . . . . .	210
Gen SRY w determinacji płci . . . . .	212
Diagnostyka molekularna . . . . .	220
Terapia genowa — wektory i strategie . . . . .	230
Markery molekularne . . . . .	237
Cykliczna przemiana rodników tlenowych . . . . .	243
Domeny błonowe . . . . .	247
RNaza L . . . . .	257
Syntetazy aminoacylo-tRNA . . . . .	266
Fosfatazy fosfoproteinowe . . . . .	276
Regulacja $[Ca^{2+}]$ . . . . .	283



*Odczynniki biochemiczne z następujących działów:*

- \* Przeciwciała monoklonalne
- \* Antybiotyki - substancje do badania *in vitro*
  - \* Enzymy i koenzymy
  - \* Cytokiny
- \* Genetyka molekularna
  - PCR
  - DNA
  - Plazmidy
  - Enzymy restrykcyjne
  - Primery i linkersy
  - Wzorce ciężaru DNA
  - Nukleotydy
- \* Czynniki wzrostu
- \* Hormony
- \* Lecytyny
- \* Mitogeny
- \* Fitodiagnostyka
- \* Proteazy

*Zestawy diagnostyczne:*

- \* PCR
- \* Bioluminescencja/Chemiluminescencja
- \* Zestawy ELISA (nieizotopowe metody badania wzrostu i śmierci komórek)
- \* Analizy żywności
- \* Fitodiagnostyka

**Przedstawiciel i wyłączny dystrybutor w Polsce:**

Hand-Prod Sp z o.o.  
ul. Ulrychowska 26  
01-113 WARSZAWA  
tel/fax +48 22 374235  
fax +48 26 626303

### WYDAWCA

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

Drukarnia Naukowo-Techniczna  
Mińska 65  
03-828 Warszawa

### REDAKCJA

Editorial Board  
REDAKTOR NACZELNY  
Editor in chief  
ZOFIA ZIELIŃSKA

tel. 31-24-03  
REDAKTORZY  
Editors  
GRAŻYNA PALAMARCZYK  
tel. 658-47-02  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
tel. 659-70-72 w. 3234  
ANNA SZAKIEL  
tel. 23-20-46  
JOLANTA GRZYBOWSKA  
tel. 13-05-15

### RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue  
JERZY BAL  
(Warszawa)  
JOLANTA BARAŃSKA  
(Warszawa)  
TADEUSZ BILIŃSKI  
(Zamość)  
ANNA INGLOT  
(Wrocław)  
TERESA JAKUBOWICZ  
(Lublin)  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
(Warszawa)  
HALINA KRZANOWSKA  
(Kraków)  
WIESŁAWA LEŚNIAK  
(Warszawa)  
BOHDAN LEWARTOWSKI  
(Warszawa)  
IRENA SZUMIEL  
(Warszawa)  
LECH WOJTCZAK  
(Warszawa)

### ADRES REDAKCJI

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

### Czy znamy już gen śmierci?

Do we already know the death gene?

EWA SIKORA . . . . . 210

### Gen SRY — pierwotny „włacznik” determinacji płci u człowieka?

SRY-gene — a primary „switch” in human sex determination?

KAROLINA MICHALCZYK-JANITZ, MICHAŁ WITT, JADWIGA JARUZELSKA . . . . . 212

### Diagnostyka molekularna: amplifikacja sekwencji czy wzmacnianie sygnału?

Molecular diagnostics: sequence or signal amplification?

RYSZARD SŁOMSKI, JOLANTA KWIATKOWSKA . . . . . 220

### Terapia genowa — wektory i strategie

Gene therapy — vectors and strategies

ŁUKASZ HUMINIECKI . . . . . 230

### Markery molekularne w genetyce i hodowli roślin

Molecular markers in plant genetics and plant breeding

WALDEMAR MARCZEWSKI . . . . . 237

### Czy przemiany rodników tlenowych w organizmie przebiegają cyklicznie?

Does oxygen — radical metabolic — cycle exist in the organism?

ROMAN GONDKO . . . . . 243

### Domeny w błonach biologicznych i ich znaczenie fizjologiczne

Domains in biological membranes and their physiological significance

JOANNA BANDOROWICZ-PIKUŁA . . . . . 247

### Rola allosterycznej RNazy L w indukowanym przez interferon układzie obronnym komórki

The role of allosteric RNase L in interferon-induced defence system of the cell

ANDRZEJ WIERZBICKI . . . . . 257

### Struktura i funkcja syntetaz aminoacylo-tRNA

Structure and function of aminoacyl-tRNA synthetases

MIROŚŁAWA SIATECKA, JAN BARCISZEWSKI . . . . . 266

### Serynowo/treoninowe fosfatazy fosfoproteinowe w tkance mózgowej

Serine/treonine phosphoprotein phosphatases in brain tissue

LUDMIŁA ŻYLIŃSKA, LILLA LACHOWICZ . . . . . 276

### Regulacja wewnątrzkomórkowego stężenia Ca<sup>2+</sup> w komórkach niepobudliwych

Regulation of intercellular Ca<sup>2+</sup> concentration in nonexcitable cells

BARBARA NIEWCZAS . . . . . 283

## Czy znamy już gen śmierci?

### Do we already know the death gene?

EWA SIKORA\*

Hipoteza apoptozy, czyli genetycznego programowania śmierci komórek, po wielu latach lekceważenia, zyskała należne miejsce we współczesnej biologii molekularnej. Początkowy sceptycyzm zniknął. Zastąpiła go fascynacja znacząco przyczyniając się do poznania mechanizmów tego biologicznego zjawiska. Podobnie jak podziały komórek, apoptoza jest zjawiskiem fizjologicznym, niezbędnym do utrzymania homeostazy organizmu i jako taka jest procesem genetycznie kontrolowanym<sup>1</sup>. Co więcej, uważa się, że obydwa procesy, zarówno śmierć programowana, jak i cykl podziałowy komórek, na pewnym etapie mają te same wspólne mechanizmy regulacji (poprzez geny wczesnej odpowiedzi komórkowej, takie jak *c-myc*, *c-fos* i *c-jun*, niektóre cykliny i cyklino-zależne kinazy oraz geny supresorowe nowotworu, *p53* i *Rb*) [1,2]. Rozwiązanie zagadki apoptozy przyczyni się z pewnością do lepszego zrozumienia mechanizmów onkogenezy, a tym samym do zracjonalizowania metod zwalczania choroby nowotworowej. Można się bowiem spodziewać, że komórka nowotworowa to taka komórka, która uciekła nie tylko spod kontroli podziałów, ale na pewnym etapie transformacji nowotworowej wymknęła się także spod kontroli śmierci.

Jednakże, chociaż każdy tydzień przynosi nowe ekscytujące doniesienia, musimy jeszcze trochę poczekać na możliwość uporządkowania wszystkich fragmentów tej biologicznej układanki. Badania mechanizmów apoptozy zdają się obecnie koncentrować na obserwacji, że wiele różnych czynników stymulujących różne szlaki przekazywania sygnału komórkowego indukuje apoptozę. Inaczej, chciałoby się spytać, czy pomimo różnic w przekazywaniu sygnałów zależnych od stanu fizjologicznego komórki, takich jak dostępność substratu i czynników wzrostowych, wpływ sąsiadujących komórek jak również etapu cyklu komórkowego, stopnia zróżnicowania i ekspresji genów indukujących i hamujących apoptozę, działa w niej uniwersalny „wykonawca” programu śmierci. I cho-

ciaż zdecydowana większość badaczy podejmująca zagadnienie apoptozy zastrzega się, że nie ma genu(ów) śmierci, to jednak daje się wyczuć mimowolne ukierunkowanie badań prowadzonych w najróżniejszych układach doświadczalnych w celu odkrycia wspólnych mechanizmów śmierci. Bardzo obiecujące pod tym względem wydają się być proteazy cysteinowe z rodziny tzw. ICE/CED-3.

Gen *ced-3* zidentyfikowano po raz pierwszy u nicienia *Caenorhabditis elegans*. Mutacje tego genu powodowały zaburzenia apoptozy komórek ginących podczas morfogenezy tego nicienia [3]. Późniejsze sklonowanie i zsekwencjonowanie genu *ced-3* wykazało homologię jego produktu białkowego z cysteinową proteazą występującą w tkankach ssaków, zwaną ICE [4]. ICE (*interleukin-1- $\beta$ -converting enzyme*) katalizuje reakcję konwersji prointerleukiny 1 $\beta$  do jej aktywnej formy, IL-1 $\beta$ , poprzez proteolityczne rozszczepienie w miejscu reszty asparaginianowej [5]. Cytokina IL-1 $\beta$  odgrywa zasadniczą rolę w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych i chociaż, jako taka, nie ma nic wspólnego z apoptozą, to jednak wprowadzenie genu *ice* do szczurzych fibroblastów indukowało w nich śmierć programowaną [6]. Jednakże, ostatnie badania myszy z amputowanym genem *ice* (tzw. knockout) wykazały występowanie procesu apoptozy w traktowanych deksametazonem lub promieniami gamma tymocytach [7]. Zachodzi więc podejrzenie, że ICE oraz cztery znane ludzkie proteazy cysteinowe rodziny ICE-/CED-3 (ICE<sub>rel</sub>-II, ICE<sub>rel</sub>-III, Nedd-2/ICH-1 i CPP-32) mogą wywoływać apoptozę w sposób niespecyficzny. Wiadomo bowiem, że inne proteazy takie jak np. tripsyna, chymotrypsyna, proteinaza K, czy granzym B również indukują apoptozę. Stwierdzono jednak, że specyficzny inhibitor proteazy ICE, którym jest produkt białkowy genu wirusa ospy bydłowej *CrmaA*, hamował apoptozę indukowaną przez różne czynniki w różnych komórkach, co wska-

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

<sup>1</sup> W *Postęпах Biochemii* ukazały się dotychczas dwa artykuły autorki poruszające zagadnienie apoptozy w tomie 39, str. 212-220 i tomie 40, str. 150-160.

zuje na specyficzną rolę tej proteazy w apoptozie. Wykazano to: w neuronach kurczenia indukowanych do śmierci poprzez pozbawienie ich czynnika wzrostu nerwu, w limfocytach ludzkich poprzez aktywację receptora Fas lub receptora czynnika nekrozy nowotworu (TNF), których rola w przekazywaniu sygnału do śmierci jest dobrze znana, w szczurzych fibroblastach hodowanych bez surowicy [8 i odsyłacze tamże]. Ponadto, aktywacja receptora Fas nie wywoływała apoptozy w tymocytach myszy z amputowanym genem *ice* [7]. Tak więc możliwość specyficznego udziału w apoptozie proteaz z rodziny ICE/CED-3 wydaje się być wciąż bardzo aktualna i otwarta. Tym bardziej, że wyniki doświadczeń przedstawione ostatnio w dwóch artykułach i opublikowanych w *Cell* i *Nature* [8 i 9] wskazują na proteazę z rodziny CED-3/ICE jako bezpośrednio zaangażowaną w procesie śmierci komórkowej, oraz na jej substrat, który autorzy jednej z tych prac [8] podnieśli do rangi „substratu śmierci”. Mowa tutaj o proteazie, której substratem jest enzym poli(ADP-rybozo)polimeraza, w skrócie PARP.

PARP jest białkiem jądrowym, związanym strukturalnie z chromatyną, wymagającym do swej enzymatycznej aktywności obecności naciętego DNA. Ponadto, aktywność tego enzymu wzrasta proporcjonalnie do uszkodzeń DNA. Uważa się, że enzym ten na równi z innymi, uczestniczy w reperacji i replikacji DNA, a także w transpozycji genów, do której niezbędny jest rozpad i ponowne łączenie łańcuchów DNA [10]. Szczegółowa rola PARP w apoptozie nie jest dotąd opisana, aczkolwiek pojawianie się jednego z produktów jego hydrolizy, o masie cząsteczkowej 85 kDa, opisano jako jeden z pierwszych symptomów apoptozy indukowanej przez leki przeciwnowotworowe w komórkach wielu linii nowotworowych, czy w tymocytach traktowanych glukokortykoidami [11]. Enzym o aktywności proteazy hydrolizującej PARP został ostatnio zidentyfikowany niezależnie przez duże grupy badaczy [8,9]. Jest to proenzym kodowany przez gen z rodziny *ice/ced-3*, który wcześniej został opisany pod nazwą CPP-32 [12]. Dopiero proteolityczne rozszczepienie proenzymu uwalnia aktywną podjednostkę katalizującą hydrolizę PARP. Nieaktywny proenzym został nazwany przez jednych badaczy *apopainą* [9], a przez innych został ochrzczone imieniem hinduskiego Boga Śmierci Jama (ang. *Yama*) [8]. Ponieważ rozpad PARP wydaje się być biochemicznym znacznikiem apoptozy, proteaza katalizująca ten proces może odgrywać zasadniczą rolę w apoptozie komórek ssących podobnie jak to ma miejsce w przypadku CED-3 w *C.elegans*. Należałoby jednak sprawdzić, czy komórki zwierząt z amputowanym genem *apopain/yama* nie są zdolne do śmierci programowanej. Pozostaje również do wyjaśnienia znaczenie innych enzymów z tej rodziny (choćby samego ICE), których substratem nie jest PARP. Ponieważ jednak aktywna forma enzymu *apopain/yama* powstaje poprzez proteolityczne rozszczepienie nieaktywnego pro-

enzymu, nie wykluczone, że jest to właśnie zadanie dla proteaz CED-3/ICE.

W świetle przedstawionych danych apoptoza zaczyna się jawić jako proces proteolitycznej kaskady, na końcu której różne sygnały zbiegają się na aktywacji, być może, jednej proteazy (*apopain/yama*?) katalizującej rozpad PARP, a być może także innych, dotychczas nie znanych „substratów śmierci”. Nadal jednak nie wiemy w jaki sposób „substrat śmierci” dokonuje swojego dzieła. Na razie można jedynie spekulować na ten temat. Jednym z bardziej charakterystycznych i powszechnych zjawisk apoptozy jest fragmentacja DNA katalizowana przez endonukleazy, których genów dotychczas nie sklonowano. A może fragment PARP, 85 kDa, aktywuje endonukleazy? Nie wykluczone również, że niehydrolizowany PARP wręcz blokuje aktywność endonukleaz. Te i inne pytania muszą na razie zostać bez odpowiedzi.

Artykuł otrzymano 24 sierpnia 1995 r.  
Zaakceptowano do druku 14 września 1995 r.

## Piśmiennictwo

1. Pandey S, Wang, E (1995) *J Cell Biochem* 58: 135-150
2. Meikrantz W, Schlegel, R (1995) *J Cell Biochem* 58: 160-174
3. Ellis HM, Hortwiz HR (1986) *Cell* 44: 817-829
4. Yuan J-Y, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Hortwiz HR (1993) *Cell* 75: 641-652
5. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Ness KV, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizaro LA, Hubner K, Black RA (1992) *Science* 256: 97-100
6. Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J-Y (1993) *Cell* 75: 653-660
7. Kuida K, Lippke J, Ku G, Harding MW, Livingston DJ Su, MS-S, Flavell RA (1995) *Science*, 267: 2000-2003
8. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyer S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM (1995) *Cell* 81: 801-809
9. Nicholson D, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gerau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik Y. A., Munday NA, Sayyaparaju MR, Smulson ME, Yamin T-T, Yu VL, Miller DK (1995) *Nature (Lond)* 376: 37-43
10. Ding R, Pommier Y, Kang V, Smulson M. (1991) *J Biol Chem* 267: 12804-12812
11. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG (1993) *Cancer Res* 53: 3976-3985
12. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. (1994) *J Biol Chem* 269: 30761-30764

**W. Mejsbaum-Katzenellenbogen's Seminars 3.**  
**Liposomes in Biology and Medicine**  
Wrocław, Poland, June 3-5 1996  
Info: Prof. Arkadiusz Kozubek  
University of Wrocław, Inst. Biochemistry,  
Department of Genetic Biochemistry,  
ul. Przybyszewskiego 63/77,  
PL-51-148 Wrocław, Poland  
Fax (48) +71 252-930

# Gen SRY — pierwotny „włącznik” determinacji płci u człowieka?\*

## SRY gen — primary „switch” in human sex determination?

KAROLINA MICHALCZAK-JANITZ<sup>1</sup>,  
MICHAŁ WITT<sup>2</sup>,  
JADWIGA JARUZELSKA<sup>3</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Mapowanie genu kodującego czynnik determinacji płci
- III. Transgen Sry powoduje „odwrócenie płci” u myszy
- IV. Struktura genu SRY
- V. Ekspresja genu SRY
  - V-1. Ekspresja genu SRY w pierwotnej gonadzie
  - V-2. Ekspresja genu SRY w dojrzałym jądrze
- VI. Mutacje genu SRY i ich wpływ na różnicowanie płci
- VII. Właściwości białka SRY
- VIII. Ekspresja zmutowanego białka SRY w układzie *in vitro*
- IX. Evolucja genu SRY
- X. Podsumowanie

**Wykaz stosowanych skrótów:** TDF — czynnik determinujący powstanie jądra u człowieka; PAR — region pseudoautosomalny; ZFY — region chromosomu Y kodujący domniemany czynnik determinacji płci o strukturze palców cynkowych; SRY — region determinacji płci na chromosomie Y u człowieka; Sry — region determinacji płci na chromosomie Y u myszy; kD — kilodalton; białka HMG — białka o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej; TCF-1 — czynnik transkrypcyjny specyficzny dla limfocytów T; LEF-1 — specyficzny limfoidalny czynnik wzmacniający; białka Mc — białka odpowiedzialne za rozmnażanie płciowe drożdży; Stel 1 — czynnik niepłodności u drożdży; CAT — acetylotransferaza chloramfenikolu; NGF — czynnik wzrostu nerwu; EGF — czynnik wzrostu naskórka; LTR — długie sekwencje zasad powtarzające się terminalnie; WT1 — czynnik odpowiedzialny za wystąpienie guza Wilmsa; PCR — reakcja łańcuchowa polimerazy; RT-PCR — odwrotna reakcja łańcuchowa polimerazy; AMH — hormon antymüllerowski; SOX — sekwencja homologiczna z konserwatywnym regionem genu determinacji płci; DSS — czynnik warunkujący odwrócenie płci, wrażliwy na efekt dawki.

\* Artykuł napisany w ramach realizacji projektu badawczego KBN Nr 405319101

<sup>1</sup> Mgr, <sup>2</sup> dr hab., <sup>3</sup> dr Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

### Contents:

- I. Introduction
- II. Mapping of the sex determining factor gene
- III. Sry transgene causes „sex reversal” in mouse
- IV. Structure of the SRY gene
- V. Expression of SRY
  - V-1. Expression of SRY in a primary gonad
  - V-2. Expression of SRY in mature testis
- VI. Mutations of SRY gene and their influence on sexual differentiation
- VII. Characteristics of SRY protein
- VIII. Expression *in vitro* of mutant SRY gene
- IX. Evolution of SRY gene
- X. Conclusions

### I. Wstęp

Badania różnicowania płci, a szczególnie badanie mechanizmu jej genetycznej determinacji są kluczowe dla genetyki człowieka nie tylko ze względów poznawczych, lecz również ze względów praktycznych. Występowanie bowiem dość częstych i niejednorodnych pod względem objawów przypadków patologicznych oraz ich diagnozowanie i leczenie, na obecnym etapie wiedzy, stanowią trudny problem medyczny. Różnicowanie płci to złożony proces, w którym arbitralnie wyróżnia się kilka etapów: genetyczna determinacja płci, powstanie wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych oraz dojrzewanie płciowe. Pojęcie genetycznej determinacji płci oznacza mechanizm odpowiedzialny za różnicowanie bipotencjalnej gonady pierwotnej w gonadę męską (jądro) lub żeńską (jajnik). Zakładano, że charakter różnicowania zależy od specyficznego sygnału, którym jest obecność czynnika determinującego rozwój jądra (ang. *testis determining factor* — TDF). Sygnał ten pojawia się na przełomie szóstego i siódmego tygodnia życia zarodka o kariotypie męskim (XY). Po jego zadziałaniu pierwotna gonada różnicuje się w jądro. W przypadku zarodka o kariotypie żeńskim XX, w którym TDF nie wy-

stępuje, gonada rozwija się w jajnik. Początek różnicowania się jajnika następuje jednak dopiero między jedenastym a dwunastym tygodniem życia płodowego. Drugi etap różnicowania płci to powstanie wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych. W przypadku płodu męskiego proces ten uwarunkowany jest wpływem hormonów wydzielanych przez płodowe jądro, natomiast w przypadku płodu żeńskiego rozwój wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych wydaje się zachodzić niezależnie od różnicowania jajnika; także w przypadku patologii charakteryzujących się brakiem gonady następuje różnicowanie płci typu żeńskiego [1]. Trzeci etap to okres dojrzewania płciowego, w którym pojawiają się cechy płciowe wtórne. Ukształtowana ostatecznie płć fenotypowa wyznaczona jest przez różnice w budowie zewnętrznych narządów płciowych oraz różnice we wtórnych cechach płciowych [2]. Prawidłowy rozwój cech płciowych zależy jest od wielu genów, występujących w chromosomie Y, X oraz w autosomach. Geny te zapewniają syntezę czynników, hormonów, białek receptorowych w odpowiedniej ilości i sekwencji czasowej.

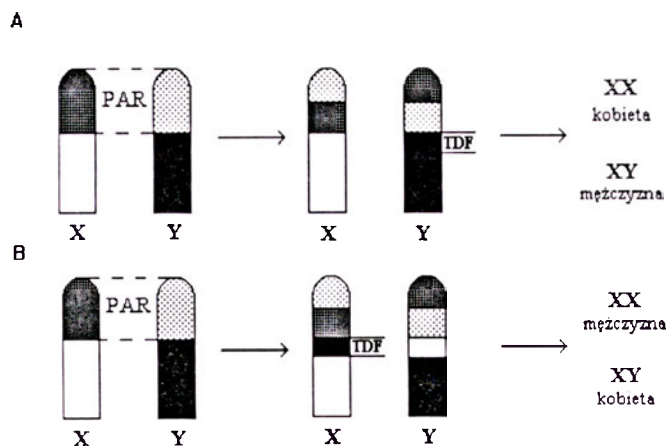
## II. Mapowanie genu kodującego czynnik determinacji płci

Molekularne badania mechanizmu determinacji płci skupiały się w ostatnich latach na próbie sklonowania i charakterystyki genu kodującego czynnik TDF. Zakłada się, że czynnik ten jest aktywny w bardzo krótkim przedziale czasowym na wczesnym etapie rozwoju zarodkowego i działa jako „włącznik” uruchamiający kaskadę reakcji prowadzących do powstania fenotypu męskiego.

Podjęto próby zlokalizowania genu TDF w ludzkim chromosomie. Był to klasyczny przykład strategii zwanej klonowaniem pozycyjnym, dawniej określanej jako odwrotna genetyka (ang. *reverse genetics*). Strategię tę stosuje się w poszukiwaniu genu odpowiedzialnego za chorobę, gdy produkt genu i jego funkcja nie są znane. Pomocne w lokalizacji genu TDF okazały się przypadki pacjentów z aberracjami liczby i struktury chromosomów płci. Wskazywały one, że niezależnie od liczby chromosomów X, obecność chromosomu Y determinowała fenotyp męski. Stąd wyciągnięto wniosek, że gen TDF zlokalizowany jest w chromosomie Y [3,4]. Ludzkie chromosomy płci X i Y, w odróżnieniu od autosomów, nie stanowią pary chromosomów homologicznych. Jednak w obrębie krótkich ramion chromosomu Y oraz X występuje niewielki region homologiczny, zwany przez to regionem pseudoautosomowym (ang. *pseudoautosomal region*-PAR) (Ryc. 1) [5]. W procesie spermatogenezy podczas mejozy dochodzi w tym regionie do rekombinacji typu *crossing-over* pomiędzy chromosomami X i Y [6,7] (Ryc. 1A).

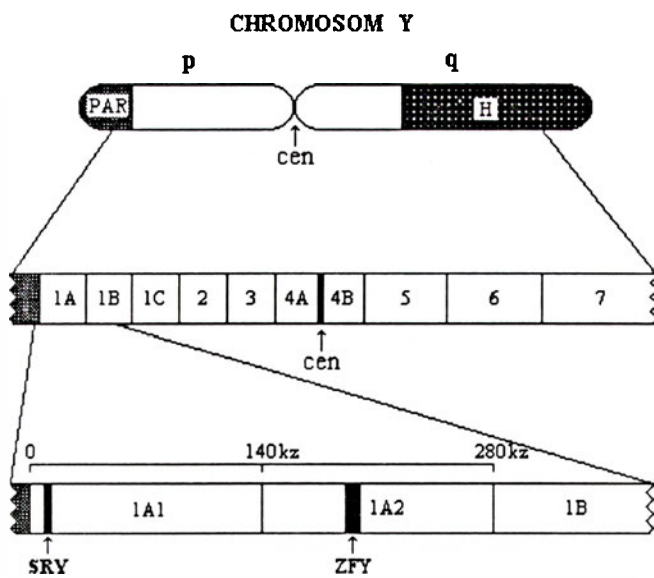
Zaobserwowana patologia rekombinacji mejotycznej w regionie pseudoautosomowym była dalszą wska-

zówką dla lokalizacji TDF w obrębie chromosomu Y. Stwierdzono mianowicie, że u niektórych bezpłodnych mężczyzn występować może kariotyp 46,XX, natomiast u niektórych kobiet z pierwotnym brakiem miesiączki zdarza się kariotyp 46,XY. Zastosowanie technik cytogenetycznych i molekularnych doprowadziło do stwierdzenia, że podłożem obydwu patologii była nieprawidłowa rekombinacja w regionie pseudoautosomowym [8-10]. Zaburzenie to polegało na tym, że fragment chromosomu Y przylegający do regionu pseudoautosomowego był przeniesiony na chromosom X (Ryc. 1B). To nieprawidłowe przegrupowanie DNA jest przyczyną niezgodności płci genetycznej z płcią fenotypową (mężczyźni o kariotypie 46,XX i kobiety o kariotypie 46,XY), określanej jako „odwrócenie płci” (ang. *sex reversal*). Powyższe odkrycie wskazywało, że *locus* TDF występuje w przeniesionym fragmencie chromosomu Y w pobliżu regionu pseudoautosomowego, więc szukano tutaj *locus* TDF. Pomocne w tym zakresie okazało się mapowanie delecyjne chromosomu Y. Technika ta polega na hybrydyzacji DNA, pochodzącego od pacjentów o różnym zakresie delecji chromosomu Y określonych cytogenetycznie, ze specyficznymi sondami komplementarnymi do *loci* chromosomu Y. Korzyści mapowania delecyjnego są dwojakie: umożliwia ono dokładniejszą ocenę zakresu delecji oraz uszeregowanie *loci* chromosomu Y [11]. Mapowanie delecyjne doprowadziło do wyróżnienia w chromosomie Y siedmiu interwałów delecyjnych [12]; w niektórych dodatkowo wyróżniono podinterwały [13-15] (Ryc. 2). Mapowanie delecyjne regionu sąsiadującego z regionem PAR wykonywano przy użyciu DNA mężczyzn o kariotypie 46,XX, u których cytogenetycznie stwierdzono różnej długości fragmen-



Rys. 1 Rekombinacja mejotyczna (*crossing over*) pomiędzy chromosomami X i Y.

A — prawidłowy *crossing over* w obrębie regionu pseudoautosomowego, prowadzący do powstania kobiety o kariotypie 46,XX oraz mężczyzny o kariotypie 46,XY. B — Nieprawidłowy *crossing over* w obrębie regionu pseudoautosomowego, polegający na przeniesieniu fragmentu z *locus* TDF na chromosom X. Rekombinacja taka jest podłożem patologii tak zwanej odwróconej płci: *locus* TDF na chromosomie X warunkuje fenotyp męski (mężczyźni o kariotypie 46,XX), a delecja *locus* TDF na chromosomie Y warunkuje fenotyp żeński (kobiety o kariotypie 46,XY).



Ryc. 2 Etapy mapowania genu SRY w obrębie chromosomu Y. p — krótkie ramię chromosomu Y; q — długie ramię chromosomu Y; cen — centromer; PAR — region pseudoautosomowy; H — region heterochromatyny; 1-7 — interwały delecyjne; 1A-1C oraz 4A i 4B — podinterwały delecyjne; SRY — region determinacji płci występujący w chromosomie Y u człowieka; ZFY — region chromosomu Y człowieka kodujący białko o strukturze palców cynkowych.

ty krótkiego ramienia chromosomu Y. W ten sposób w podinterwale 1A2 określono najmniejszy region chromosomu Y, wystarczający do powstania fenotypu męskiego u osoby o kariotypie żeńskim (46,XX). W regionie tym, obejmującym 140 kb zidentyfikowano gen ZFY (ang. *zinc finger Y*), któremu przypisano funkcję TDF [16] (Ryc. 2). Wykazano, że gen ZFY występuje u wszystkich wyższych ssaków. Stwierdzono także, iż gen ten koduje białko zawierające 13 domen o strukturze palców cynkowych, wykazujące znaczny konserwatyzm ewolucyjny. Występowanie struktury palców cynkowych sugerowało, że białko ZFY jest czynnikiem transkrypcyjnym, który poprzez wiązanie z DNA mógłby inicjować procesy różnicowania płci w kierunku męskim [16]. Wykazano ponadto, że homologiczne geny u myszy (*Zfy-1*, *Zfy-2*) występują w regionie Sxr chromosomu Y, którego udział w determinacji płci został już wcześniej opisany [17,18]. Jednak dalsze badania podważyły rolę ZFY jako TDF. Stwierdzono mianowicie, że u człowieka sekwencje wykazujące homologię z genem ZFY występują również w chromosomie X (*locus ZFX*) [16,19]; natomiast u torbaczki występują one w autosomach [20]. Ponadto, ekspresja genu *Zfy-1* w zarodku mysim ma miejsce w komórkach gametogenicznych, które nie biorą udziału w różnicowaniu jądra [21]. Opisano także cztery przypadki mężczyzn o kariotypie 46,XX u których fragment chromosomu Y o długości 35 kb, pochodzący z podinterwala 1A2, przeniesiony na X (translokacja), nie zawierał *locus ZFY* [22]. Krótko potem, we fragmencie tym zidentyfikowano nowy gen nazywany SRY (ang. *sex-determining region Y*) (Ryc. 2). Gen SRY, podobnie jak gen ZFY, występuje u wszyst-

kich ssaków wyższych, jednak wyłącznie w chromosomie Y [23]. Wykazano ponadto, że w przypadku mutantów myszy z delecją homologu tego genu (*Sry*) [24], nie dochodziło do różnicowania się pierwotnej gonady w jądro [25]

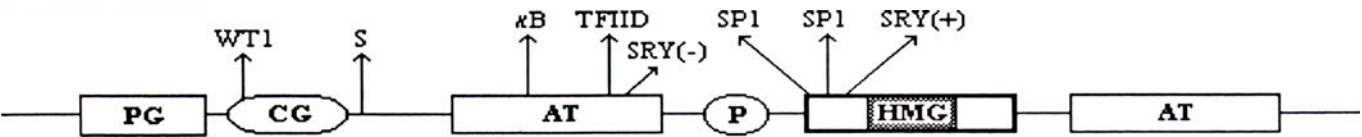
### III. Transgen Sry powoduje „odwrócenie płci” u myszy

Najbardziej spektakularnym doświadczeniem, stanowiącym bezpośredni dowód na to, że gen *Sry* jest czynnikiem determinującym płć męską, było uzyskanie myszy transgenicznej pod względem genu *Sry*. Fragment genomowego DNA myszy o długości 14 kb, zawierający gen *Sry* oraz jego sekwencje regulatorowe, wprowadzono do zapłodnionej komórki jajowej o kariotypie 46,XX. W 25% przypadków uzyskanych w ten sposób myszy transgenicznych występował fenotyp męski o prawidłowej strukturze histologicznej jąder, pozbawionych jednak komórek gametogenicznych. Doświadczenie to wskazywało, że gen SRY jest wystarczającym czynnikiem w determinacji różnicowania gonady. Sugerowano, że zaburzenie ekspresji genu *Sry* było przyczyną tego, że w niektórych myszach transgenicznych „odwrócenie płci” nie wystąpiło. Próby uzyskania myszy transgenicznych zawierających ludzki gen SRY nie powiodły się. Być może w transfekowanym fragmencie DNA zawierającym gen SRY nie było wszystkich regionów regulatorowych niezbędnych dla jego prawidłowej ekspresji. Można przypuszczać, że różnice w budowie genów SRY i *Sry* warunkują ich odmienną interakcję z białkami regulatorowymi i genami docelowymi. Możliwe również, że w komórkach mysich dochodzi do zahamowania lub nieprawidłowej translacji transkryptu genu SRY, albo powstałe białko SRY nie jest stabilne i ulega degradacji [26].

### IV. Struktura genu SRY

Gen SRY nie zawiera intronów i koduje białko o wielkości 204 aminokwasów i masie 23.9 kD [23,27] (Ryc. 3). W środkowej części jego cząsteczki występuje motyw o długości 80 aminokwasów, homologiczny z odpowiedzialnym za wiązanie się z DNA motywem białek HMG (ang. *high mobility group*). Motyw HMG jest typowy dla wielu białek regulujących transkrypcję i różnicowanie [28,29]. Występowanie pojedynczej domeny HMG i specyficzność tkankowa wskazują na ścisłe pokrewieństwo białka SRY z kilkoma czynnikami transkrypcyjnymi. Należy do nich czynnik transkrypcyjny występujący w limfocytach T tj. TCF-1 (ang. *T lymphocyte-specific transcription factor*), LEF-1 (ang. *lymphoid-specific enhancer factor*) [30,31], regulatorowe białko Mc odpowiedzialne za rozmnażanie płciowe drożdży [32] oraz czynnik niepłodności drożdży *Ste11* (ang. *yeast sterility factor*) [33]. Obecność w transfekowanych komórkach mysich dwóch transkryptów genu SRY o długości około 1.1 kb wskazuje na





Ryc. 3 Struktura locus SRY

HMG — konserwatywny region HMG genu SRY; AT — regiony bogate w pary AT; P — region promotorowy; CG — region o wysokiej zawartości par CG; PG — pseudogen genu SRY. Zaznaczono miejsca wiązania się czynników transkrypcyjnych (SP1, TFIID, WT1), wzmacniaczy transkrypcji  $\kappa$ B; sekwencje osłabiające transkrypcję S (ang. *silencers*) oraz miejsca wiązania się białka SRY [SRY(+), SRY(-)] występujących w przeciwniej orientacji.

występowanie dwóch miejsc inicjacji transkrypcji [27]. Wykazano, że promotor genu SRY zawarty jest w regionie 310 pz bezpośrednio sąsiadującym z genem struktury. Jest zaskakujące, że promotor genu SRY wykazuje cechy charakterystyczne dla promotorów genów o ekspresji konstytutywnej: brak regionu TATA, znaczna liczba par G-C (60%) a ponadto dwa miejsca wiązania czynnika Sp1 [34]. W regionie 5' bardziej oddalonym od miejsca inicjacji transkrypcji zidentyfikowano motyw TATAAA zgodny z motywem TATA wiążącym czynnik transkrypcyjny TFIID. W regionie tym jest również obecny motyw GGGGACTTCC homologiczny z sekwencją wzmacniacza (ang. *enhancer*)  $\kappa$ B promotorów genów kodujących łańcuch ciężki immunoglobulin, lekki łańcuch  $\kappa$ , promotora LTR wirusa HIV oraz promotora genu kodującego łańcuch  $\alpha$  receptora interleukiny 2. W regionie flankującym 5' zidentyfikowano ponadto sekwencje osłabiające transkrypcję (ang. *silencers*) (Ryc. 3) [27]. Obecność dwóch regionów AACAAAG opisanych jako miejsca wiązania białka SRY (SRY1+ i SRY-) sugeruje, że białko to wiąże się z własnym promotorem (Ryc. 3) [27,35,36]. W regionie flankującym 5' występuje ponadto sekwencja CGCCCCGC (Ryc. 3), opisana jako miejsce wiązania białek zawierających palce cynkowe, np. białka WT1 (czynnik odpowiedzialny za wystąpienie guza Wilmsa). Jest interesujące, że delecje i mutacje punktowe genu WT1 powodują nieprawidłowości w rozwoju gonad oraz zewnętrznych narządów płciowych, u osób z chromosomami płci XY. Białko WT1 jest przypuszczalnie represorem transkrypcji i przynajmniej u myszy ulega ekspresji w listwie płciowej. Być może niektóre białka zawierające palce cynkowe, w sposób bezpośredni aktywują lub hamują transkrypcję ludzkiego genu SRY [37].

Brak intronów w genie SRY może wskazywać na to, że gen SRY jest retropozonem powstałym poprzez przepisanie transkryptu genu przodka na DNA i wbudowanie do genomu. Wskazywałaby na to również obecność dwóch bloków bogatych w pary A-T w regionie flankującym 5' i 3'. W obydwu blokach A-T oraz pomiędzy nimi występują liczne powtórzenia tandemowe (ang. *tandem repeats*), odwrócone powtórzenia (ang. *inverted repeats*), powtarzalne sekwencje o odwrotnej orientacji (ang. *complementary inverted repeats*) oraz struktury szpilki do włosów (ang. *hairpin*). Niektóre z nich występują w sąsiedztwie transpononów biorąc udział w ich przemieszczaniu w obrębie genomu

[praca przegląd. 38]. W regionie 3' cDNA genu SRY zidentyfikowano przypuszczalny sygnał poliadenylacji AATAAA oraz pięć sekwencji powtórzonych, przypominających sygnały poliadenylacji w bloku A-T 3'. Podobnie w bloku A-T 5' występuje pięć odwróconych powtórzeń komplementarnych. Ta szczególna organizacja flankujących gen SRY wspiera twierdzenie, że bloki A-T mogły brać udział w transpozycji genu SRY [27] (Ryc. 3).

## V. Ekspresja genu SRY

### V-1. Ekspresja genu SRY w pierwotnej gonadzie

Ekspresja genu SRY u ssaków ma miejsce w pierwotnej, nieodróżnianej gonadzie. Gonada ssaków składa się z komórek gametogenicznych, oraz komórek somatycznych trzech typów. Komórki somatyczne gonady to komórki podporowe (komórki Sertoliego u samca i komórki pęcherzykowe u samicy), komórki steroidogenne (komórki Leydiga u samca i komórki osłonki pęcherzyka u samicy) i wreszcie komórki tkanki łącznej. Dokładny moment, w którym Sry determinuje rozwój gonady męskiej nie jest znany. Stwierdzono, że Sry ulega ekspresji w okresie od 10.5 do 12.5 dnia po zapłodnieniu, w którym dochodzi do charakterystycznego uszeregowania pierwotnych komórek Sertoliego w sznury płciowe (ang. *genital cords*) [39]. Ekspresja Sry występuje być może już wcześniej, ale wykrycie transkryptów było trudne, ponieważ izolowano je z całych embrionów. Potwierdzeniem przypuszczenia wcześniejszej ekspresji Sry było doniesienie, w którym transkrypty Sry wykryto w mysim zarodku w stadium preimplentacyjnym, co świadczy, że inicjacja determinacji płci zachodzi przed rozpoczęciem różnicowania się gonady w jądro [40]. Nieznany jest również dokładny okres w którym proces determinacji płci zostaje zakończony. Poprzez analizę RNA pochodzącego z gonad przy pomocy techniki RT-PCR wykazano jedynie, że w 13.5 dnia po zapłodnieniu transkrypty Sry nie są już wykrywalne [39].

Dla poznania kaskady procesów związanych z determinacją i różnicowaniem płci istotne było wyjaśnienie, w których komórkach pierwotnej gonady Sry ulega ekspresji. Obecność transkryptów Sry w listwie płciowej w okresie od 10.5 do 12.5 dnia po zapłodnieniu sugeruje, że głównym miejscem transkrypcji tego genu są prekursorzy komórek Sertoliego. Potwier-

dzenie tej hipotezy przyniosły badania przeprowadzone u myszy homozygotycznych pod względem mutacji w *locus* W (ang. *white spotting*) [39]. Charakterystyczną cechą tych myszy jest brak w nich komórek gametogenicznych w prawidłowo rozwijającym się jądrze. Stwierdzenie w nich ekspresji genu *Sry* wykluczyło udział prekursorów komórek gametogenicznych w procesie wykształcania się jądra.

## V-2. Ekspresja genu *SRY* w dojrzałym jądrze

Zaskakujące było odkrycie, że zarówno ekspresja mysiego *Sry* jak i ludzkiego *SRY* ma miejsce ponownie w jądrze osobnika dorosłego [23,24]. Co więcej, ekspresja *Sry* u myszy jest znacznie silniejsza w jądrze niż w pierwotnej gonadzie. Ta ponowna ekspresja genu *Sry* jest obserwowana u myszy pomiędzy dwudziestym pierwszym a dwudziestym ósmym dniem po urodzeniu. Stwierdzono to głównie w komórkach gametogenicznych [39], a w znacznie mniejszym stopniu w komórkach Sertoliego [41]. Sugeruje się, że w dojrzałym jądrze gen *Sry* może uczestniczyć w regulacji procesu spermatogenezy.

Stwierdzono, że u myszy ponad 89% transkryptów genu *Sry* występowało w formie kolistej. Zatem u myszy transkrypt *Sry* w pierwotnej gonadzie i w jądrze osobnika dorosłego różnią się znacznie. Koliste transkrypty wykrywano wyłącznie w cytoplazmie, natomiast w jądrze komórkowym niewielką ilość formy liniowej reprezentującej być może niedojrzałą postać transkryptów genu *Sry*. Nie wykryto aktywności translacyjnej kolistych transkryptów. Analiza sekwencyjna klonu genomowego *Sry* wykazała obecność ramki odczytu obejmującej 2.7 kZ, zawierającej region HMG, a po jej obydwu stronach występowanie długich odwróconych sekwencji powtórzonych (ang. *large inverted repeat*). Można założyć, że sekwencje te odgrywają rolę w generowaniu kolistych transkryptów. Znaczenie kolistych transkryptów w jądrach myszy nie jest ostatecznie wyjaśnione. Można założyć, że poprzez brak aktywności translacyjnej mogłyby one stanowić element regulacyjny w ekspresji genu *Sry*. [42,43]. Wykazano, że w jądrze dorosłego mężczyzny brak kolistych transkryptów genu *SRY* [37]. Może to wynikać z faktu, że w *locus* *SRY* człowieka powtórzone sekwencje odwrócone nie występują.

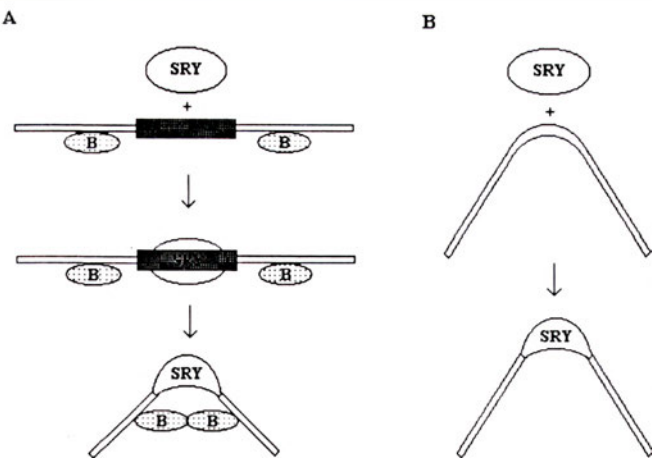
## VI. Mutacje genu *SRY* oraz ich wpływ na różnicowanie płci

Mutacje genu *SRY* powodują „odwrócenie płci” i przez to stanowią jeden z najważniejszych dowodów, że gen *SRY* koduje czynnik TDF. Zidentyfikowano dotąd 23 mutacje genu *SRY* [44-57]. Mutacje te hamują różnicowanie gonady męskiej, czego skutkiem jest jej wczesna degeneracja w okresie zarodkowym, prowadząca do całkowitej dysgenезji (ang. *complete gonadal dysgenesis*). Ten skrajny typ dysgenезji (nie-

prawidłowego rozwoju gonad) polega na występowaniu w miejscu gonad pasm łącznotkankowych. Płeć fenotypowa jest w tym przypadku żeńska. W genie *SRY* wykazywano najczęściej mutacje zmiany sensu. Inne, to mutacje nonsensowe i mutacje zmiany fazy odczytu. Wszystkie znane mutacje, z wyjątkiem jednej, występowały w konserwatywnym regionie HMG. Chociaż większość wykrytych mutacji genu *SRY* powstała *de novo*, opisano kilku pacjentów, którzy odziedziczyli je od swoich ojców. Przypadki te wskazują, że ten sam zmutowany allel genu *SRY* u jednej osoby (ojciec) nie powoduje zaburzeń, natomiast u innej (dziecko) prowadzi do patologii. Fenotyp osób ze zmutowanym genem *SRY*, jest albo żeński z towarzyszącą mu dysgenезją gonad, albo męski i prawidłowy (brak zaburzeń w różnicowaniu płci). Wyjątkiem od tej reguły był jeden przypadek obojactwa [58]. U tego pacjenta mutacja genu *SRY* mogła wystąpić w stadium postzygotycznym wczesnego etapu rozwoju, co mogło prowadzić do mozaicyzmu w obrębie gonady. Stwierdzono, że tylko u około 15% kobiet o kariotypie 46, XY występuje mutacja genu *SRY*. Mogłoby to oznaczać, że u pozostałych pacjentek mutacja występuje w regionie regulatorowym genu *SRY* lub w innym genie odpowiedzialnym za determinację płci.

## VII. Właściwości białka *SRY*

Obecność konserwatywnego motywu HMG w genie *SRY* wskazywała na możliwość wiązania się białka *SRY* z DNA. Badania białka *SRY* techniką opóźnienia migracji w żelu (ang. *gel retardation*) potwierdziły te przypuszczenia. Badania kompleksów *SRY*/AACAAAG uzyskanych w układzie *in vitro* wskazywały, że białko *SRY* wykazuje powinowactwo tylko do podwójnoniciowego DNA [36]. Stwierdzono, że białko *SRY* może się wiązać z DNA w różny sposób, jak to przedstawiono na rycinie 4. Pierwszy z nich to możliwość specyficznego wiązania białka *SRY* z bogatą w pary A-T sekwencją AACAAAG (Ryc. 4A). Interakcja białka *SRY* z DNA następuje w mniejszym rowku DNA i powoduje wygięcie cząsteczki DNA o około 83° [56, 60]. Wykazano, że czynniki transkrypcyjne TCF-1 $\alpha$ , LEF-1 i Stel 1 z rodziny białek zawierających HMG rozpoznają tę samą co białko *SRY* sekwencję DNA. Jest to zaskakujące, ponieważ białka te cechuje niewielkie podobieństwo strukturalne z motywem HMG genu *SRY* i biorą udział w regulacji transkrypcji genów o innej specyficzności tkankowej niż gen *SRY*. Sugerowano, że właściwość białka *SRY* zginania helisy DNA może prowadzić do utworzenia stabilnego specyficznego kompleksu nukleoproteinowego, umożliwiającego wzajemne oddziaływanie wchodzących w jego skład białek. Możliwe jest także (Ryc. 4B) niespecyficzne oddziaływanie białka *SRY* z fragmentami DNA o nieregularnej strukturze, przypominającej literę X (ang. *four-way junctions*) [59]. Oddziaływanie



Ryc. 4 Oddziaływanie białka SRY z DNA. Modyfikacja z Ferrari i wsp. [59].

A — Białko SRY wiąże się w specyficzny sposób z sekwencją ACAAAG w DNA (zaciemniony prostokąt), co prowadzi do wygięcia DNA i białka SRY. Umożliwia to interakcje czynników transkrypcyjnych (białka B) i utworzenie stabilnego kompleksu rybonukleoproteinowego. B — Białko SRY może rozpoznawać niespecyficzne sekwencje DNA o nieregularnej strukturze.

innych białek HMG z DNA o takiej strukturze ma miejsce w takich procesach, jak naprawa i rekombinacja DNA oraz tworzenie nukleosomów [61].

Poznanie sekwencji regionu DNA wykazującego powinowactwo do białka SRY było cenną wskazówką w poszukiwaniach genów współdziałających z białkiem SRY w różnicowaniu jądra. W badaniach *in vitro* wykazano, że białko odpowiadające regionowi HMG białka SRY specyficznie rozpoznawało promotor ludzkiego genu kodującego hormon antymüllerowski (AMH — *anti-Müllerian hormone*) oraz ludzkiego genu kodującego aromatazę P450. AMH jest odpowiedzialny za regresję żeńskich przewodów (ang. *Müllerian ducts*) w pierwotnej gonadzie różnicującej się w jądro. Z kolei aromataza P450 katalizuje przekształcenie testosteronu w estradiol i jej aktywność jest zahamowana w zarodku męskim. Białko SRY mogłoby zatem aktywować transkrypcję genu kodującego AMH i jednocześnie hamować transkrypcję genu aromatazy P450 [62]. Sugestie dotyczące oddziaływania białka SRY z innymi genami tylko na podstawie ich obecności w sąsiedztwie motywu ACAAAG winny być traktowane z należytą ostrożnością. Wprawdzie liczba kopii tego motywu nie została określona, można się jednak spodziewać, że jest ona stosunkowo wysoka w ludzkim genomie. Stwierdzono niedawno, że w linii embrionalnych komórek jądra wykazujących ekspresję genu SRY dochodziło do inicjacji transkrypcji AMH, natomiast w komórkach transfekowanych zmutowanym klonem SRY aktywacji transkrypcji AMH nie obserwowano. W badaniach tych wykazano ponadto, że w aktywacji transkrypcji AMH przez SRY uczestniczy dodatkowy niezidentyfikowany dotąd czynnik, wiążący się bezpośrednio z promotorem genu AMH [63]. Badania te są poparciem hipotezy, że białko SRY aktywuje transkrypcję AMH.

## VIII. Ekspresja zmutowanego białka SRY w układzie *in vitro*

W przeciwieństwie do mutacji nonsensownych oraz powodujących zmianę ramki odczytu, wpływ mutacji zmiany sensu na zaburzenie funkcji białka SRY nie jest oczywisty. Pamiętać należy, że substytucja aminokwasu nie musi prowadzić do dysfunkcji białka. Opracowanie układu doświadczalnego ekspresji mutacji genu SRY *in vitro* umożliwiło rozwiązanie tego problemu, pozwalając na analizę funkcjonalną zmutowanego białka SRY. W tym układzie doświadczalnym zmutowane białko izolowano z komórek *Escherichia coli* po transfekcji zrekombinowanym plazmidem SRY. Po oczyszczeniu, białko poddawano ocenie pod względem zdolności wiązania się z docelową sekwencją DNA (AACAAAG) przy zastosowaniu techniki opóźnienia migracji w żelu [35, 36, 54, 57]. Metoda ta pozwoliła wykazać utratę lub zmniejszenie zdolności wiązania zmutowanego białka SRY ze specyficzną sekwencją w DNA.

Bardzo interesujące okazały się wyniki ekspresji *in vitro* w czterech przypadkach rodzinnych mutacji genu SRY. W dwóch z nich, mutacje genu SRY wykryto u dwóch kobiet o kariotypie 46, XY oraz u ich ojców [36]. W pierwszym przypadku wykazano zredukowane powinowactwo białka SRY do DNA, natomiast w drugim stwierdzono całkowity brak powinowactwa zmutowanego białka do DNA. W pozostałych dwóch przypadkach rodzinnej mutacji genu SRY, mutacje występowały zarówno u ojców jak i zdrowych członków rodziny. W pierwszym przypadku (mutacja występowała u ojca i braci pacjentki) stwierdzono, że właściwości wiązania zmutowanego białka do DNA były takie same jak białka prawidłowego [50]. Natomiast w drugim przypadku (mutacja występowała u ojca i sióstr pacjentki) wykazano zredukowaną aktywność białka SRY [57]. Pomijając możliwość metodycznego błędu w badaniach *in vitro*, powyższe kontrowersyjne wyniki tłumaczy się odmiennym tłem genetycznym i środowiskowym poszczególnych osobników. Istnieje również możliwość wystąpienia u ojca pacjentki mozaicyzmu (prawidłowa kopia genu SRY i zmutowana wersja genu SRY). Należy pamiętać, że zastosowany układ ekspresji (oddziaływanie białka SRY z fragmentem DNA ACAAAG) był zbyt zawężony. Stwierdzono bowiem niedawno, że również motyw AACAAATG wykazuje wysokie powinowactwo do białka SRY [64].

## IX. Ewolucja genu SRY

Jednym z istotnych kryteriów, które brano pod uwagę w ocenie czy dany gen koduje czynnik TDF, była jego ewolucyjna konserwatywność. Gen SRY cechy tej nie posiada. Poza konserwatywnym regionem HMG, gen SRY człowieka, myszy i torbaczy nie

wykazuje homologii [65]. Badania porównawcze sekwencji genu SRY u naczelnych wykazały, że jedynie region HMG jest konserwatywny [66]. Co więcej, stosunkowo wysoka liczba różnic nukleotydów występuje na poziomie sekwencji aminokwasowej. Zidentyfikowano ponadto rodzinę genów występujących w autosomach i chromosomie X zawierających region HMG, wykazujący pod względem sekwencji aminokwasowej ponad 60% podobieństwa do HMG genu SRY i stąd ich nazwa: geny SOX (*SRY-box*) [24, 67]. Powstaje zatem pytanie, czy geny SOX i SRY pochodzą od jednego genu przodka. Dywergencja genu SRY i pełnienie przez niego funkcji czynnika determinującego płęć mogło poprzedzać i inicjować różnicowanie chromosomów płci X i Y. Albo też, pełnienie tej funkcji mogło być konsekwencją dywergencji chromosomu X i Y, zainicjowanej przez poprzednio występujące geny determinacji płci, których funkcję przejął gen SRY.

## X. Podsumowanie

Badania molekularnego podłoża determinacji płci opisane w niniejszym przeglądzie dostarczyły wystarczających dowodów na to, by przyjąć, że gen SRY koduje czynnik determinujący rozwój gonady męskiej. Najważniejsze z nich to: i/ekspresja genu SRY w pierwotnej, nieodróżnianej gonadzie w okresie poprzedzającym formowanie się jąder, ii/ „odwrócenie płci” u myszy transgenicznej pod względem genu Sry oraz „odwrócenie płci” u pacjentek 46, XY, z mutacją genu SRY. W świetle dotychczasowych badań nie wiadomo nadal, czy gen SRY stanowi pierwotny oraz jedyny element inicjujący ten proces. Istnieją przesłanki, że inne geny występujące w autosomach i w chromosomie X mają istotne znaczenie w determinacji płci. Świadczy o tym m.in. fakt, że u znacznej liczby fenotypowych kobiet o kariotypie 46, XY gen SRY jest prawidłowy. U części tych kobiet wykazano duplikację w krótkim ramieniu chromosomu X w hipotetycznym *locus* DSS (*dosage sensitive sex reversal*) [68]. W innych przypadkach „odwrócenia płci” wykazano delecję w krótkim ramieniu chromosomu 9 [69], a w jeszcze innych delecję w długim ramieniu chromosomu 10 [70] lub translokację w obrębie długiego ramienia chromosomu 17 [71]. Klonowanie pozycyjne tych regionów zapewne przyczyni się do identyfikacji nowych genów zaangażowanych w determinację i różnicowanie się płci. Zastosowanie dotychczasowej wiedzy na temat determinacji płci ma miejsce w diagnostyce klinicznej oraz prognozowaniu leczenia. Przykładem tego jest wykrywanie genu SRY poprzez PCR oraz ocena aberracji chromosomu Y u pacjentów z nieprawidłowościami rozwoju płciowego [72, 73]. Opisano również próby prenatalnego określenia płci zarodka poprzez detekcję genu SRY w chorobach sprzężonych z chromosomem X [74]. Należy oczekiwać, że w krótkim czasie zakres zastosowań w medycynie wiedzy na

temat molekularnego mechanizmu determinacji płci znacznie się poszerzy.

Artykuł otrzymano 1 czerwca 1995 r.

Zaakceptowano do druku 11 września 1995 r.

## Piśmiennictwo

- Jost A, Vigier B, Prepin J, Perchellet JP (1973) *Rec Prog Horm Res* **29**: 1-41
- Szarras-Czapnik M, Romer TE (1993) W: Romer TE (red) Zaburzenia hormonalne u dzieci i młodzieży. Omnitech Pres, str. 140-161
- Jacobs PA, Strong JA (1959) *Nature (lond)* **183**: 302-303
- Ford CE, Polani PE, Briggs JH, Biskop PMF (1959) *Nature (lond)* **183**: 1030-1032
- Burgoyne PS (1982) *Hum Genet* **61**: 85-90
- Gabriel-Ropez O, Rimpler Y, Ratomponirina C, Petit C, Levilliers J, Croquette MF, Couturier J (1990) *Cytogenet Cell Genet* **54**: 38-42
- Rouyer F, Simmler MC, Vergnaud G, Johnsson C, Levilliers J, Petit C, Weissenbach J (1986) *Cold Spr Harb Symp Quan Biol* **LI**: 221-228
- Ferguson-Smith MA (1966) *Lancet* **II**: 475-476
- Magenis RE, Webb MJ, McKean RS, Tomar D, Allen LJ, Kammer H, Van Dyke, Lovrien E (1982) *Hum Genet* **62**: 271-276
- Magenis RE, Tochen ML, Holahan KP, Carey T, Allen L, Brown MG (1984) *J Pediat* **105**: 916-919
- Kotecki M, Jaruzelska J, Skowrońska M, Fichna P (1991) *Hum Genet* **87**: 234-236
- Vergnaud P, Page DC, Simmler MC, Brown L, Rouyer F, Noel B, Botstein D, de la Chapelle A, Weissenbach J (1986) *Am J Hum Genet* **34**: 109-124
- Affara NA, Ferguson-Smith MA, Magenis RE, Tolmie JL, Boyd E, Cooke A, Jamieson D, Kwok K, Mitchell M, Snadden L (1987) *Nucleic Acid Res* **15**: 7325-7342
- Ferguson-Smith MA, Affara NA, Magenis RE (1987) *Development* **101**: 41-50
- Müller U (1987) *Development* **101**: 51-58
- Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EML, Mardon G, Polack J, McGillivray B, Chapelle A (1987) *Cell* **51**: 1091-1104
- Mardon G, Mosher R, Distèche CM, Nishioka YU, McLaren A, Page DC (1989) *Science* **243**: 78-80
- Nagamine CM, Chan K, Kozak CA, Low Y-F (1989) *Science* **243**: 80-83
- Schneider-Gädickie A, Beer-Romeo P, Brown LG, Nussbaum R, Page DC (1989) *Cell* **57**: 1247-1258
- Sinclair AH, Poster JW, Spencer JA, Page DC, Palmer M, Goodfellow PN, Marshall-Graves JA (1988) *Nature (Lond)* **336**: 780-783
- Koopman P, Gubbay J, Collignon J, Lovell-Badge R (1989) *Nature (Lond)* **342**: 940-942
- Palmer MS, Sinclair AH, Berta P, Ellis N, Goodfellow PN, Abbas NE, Fellous M (1989) *Nature (Lond)* **342**: 937-939
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1990) *Nature (Lond)* **346**: 240-244
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow PN, Lovell-Badge R (1990) *Nature (Lond)* **346**: 245-250
- Gubbay J, Vivian N, Economou A, Jackson DI, Goodfellow PN, Lovell-Badge R (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7953-7957
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1991) *Nature (Lond)* **351**: 117-121
- Su H, Lau Y-F (1993) *Am J Hum Genet* **52**: 24-38
- Goodwin GH, Sanders C, Johns EW (1973) *Eur J Biochem* **38**: 14-19

29. Jantzen HM, Admon A, Bell SP, Tjian R (1990) *Nature (Lond)* **344**: 830-836
30. Waterman ML, Fischer WH, Jones KA (1991) *Genes Dev* **5**: 656-669
31. Travis A, Amsterdam A, Belanger C, Groschedl R (1991) *Genes Dev* **5**: 880-894
32. Kelly M, Burke J, Smith M, Klar A, Beach D (1988) *EMBO* **7**: 1537-1547
33. Sugimoto A, Iino Y, Maeda T, Watanabe Y, Yamamoto M (1991) *Genes Dev* **5**: 90-99
34. Vilain E, Fellous M, McElreavey K (1992) *Methods in Molecular and Cellular Biology* **3**: 128-134
35. Nasrin N, Buggs C, Kong XF, Carnazza J, Goebel M, Alexander-Bridges M (1991) *Nature (Lond)* **354**: 317-320
36. Harley VR, Jackson DI, Hextall PJ, Hawkins JR, Berkovitz GD, Sockanathan S, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1992) *Science* **255**: 453-456
37. Behlke MA, Jonathan SB, Beer-Romero P, Page DC (1993) *Genomics* **17**: 736-739
38. Wirth-Dzięciołowska E (1994) *Post Biol Kom* **23**: 263-274
39. Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R (1990) *Nature (Lond)* **348**: 450-452
40. Zwingman T, Erickson RP, Boyer T, Ao A (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 814-817
41. Rossi P, Dolci P, Albanesi C, Grimaldi P, Geremia R (1993) *Mol Reprod Dev* **43**: 369-373
42. Capel B, Swain A, Nicolis S, Hacker A, Walter M, Koopman P, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1993) *Cell* **73**: 1019-1030
43. Zwingman T, Fujimoto H, Lai L, Boyer T, Ao A, Stanley JRD, Blencher SR, Erickson RP (1994) *Mol Reprod Dev* **37**: 370-381
44. Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M (1990) *Nature (Lond)* **348**: 448-450
45. Jäger RJ, Anvert M, Hall K, Scherer G (1990) *Nature (Lond)* **348**: 452-454
46. McElreavy KD, Vilain E, Boucekkine C, Vidaud M, Jakubert F, Richaud F, Fellous M (1992) *Genomics* **13**: 838-840
47. Hawkins JR, Taylor A, Berta P, Lavilliers J, Van der Auwera B, Goodfellow PN (1992) *Hum Genet* **88**: 471-474
48. Hawkins JR, Taylor A, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith KD, Berkovitz GD (1992) *Am J Hum Genet* **51**: 979-984
49. Müller J, Schwartz M, Skakkebaek NE (1992) *J Clin Endocrinol Metab* **75**: 331-333
50. Jäger RJ, Harley VR, Pfeiffer RA, Goodfellow PN, Scherer G (1992) *Hum Genet* **90**: 350-355
51. McElreavy K, Vilain E, Abbas N, Costa JM, Souleyreau N, Kucheria K, Boucekkine C, Thibaud E, Brauner R, Flamant F, Fellous M (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1106-11020
52. Zeng Y, Ren Z, Zhang M, Huang Y, Zeng F, Huang S (1993) *J Med Genet* **30**: 655-657
53. Affara NA, Chalmers IL, Ferguson-Smith MA (1993) *Hum Mol Genet* **2**: 785-789
54. Poulat F, Soullier S, Grozè C, Heitz F, Calas B, Berta P (1994) *Hum Mut* **3**: 200-204
55. Iida T, Nakahori Y, Komaki R, Mori E, Hayashi N, Tsutsumi O, Taketani Y, Nakagome Y (1994) *Hum Mol Genet* **3**: 1437-1438
56. Tajima T, Nakae J, Shinohara N, Fujieda K (1994) *Hum Mol Genet* **3**: 1187-1189
57. Schmitt-Ney M, Thiele H, Kaltwakßer P, Bardoni B, Cisternino M, Scherer G (1995) *Am J Hum Genet* **56**: 862-869
58. Braun A, Kammerer S, Cleve H, Lohrs U, Schwarzh HP, Kuhnle U (1993) *Am J Hum Genet* **52**: 578-585
59. Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME (1992) *EMBO* **11**: 4497-4506
60. van de Wetering M, Clevers H (1992) *EMBO* **11**: 3039-3044
61. Groschedl R, Giese K, Pagel J (1994) *TIG* **10**: 94-100
62. Haaq CM, King CY, Donahoe PK, Weiss MA (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1097-1101
63. Haaq CM, King CY, Ukiyama E, Falsafi S, Haaq TN, Donahoe PK, Weiss MA (1994) *Science* **266**: 1494-1500
64. Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1994) *Nucleic Acids Res* **22**: 1500-1501
65. Foster JW, Brennan FE, Hampikian GK, Goodfellow PN, Sinclair AH, Lovell-Badge R, Selwood L, Renfree MB, Cooper DW, Graves JAM (1992) *Nature (Lond)* **359**: 531-533
66. Whitfield LS, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1993) *Nature (Lond)* **364**: 713-715
67. Denny P, Swift S, Brand N, Dabhad N, Barton P, Ashworth A (1992) *Nucleic Acids Res* **20**: 2887
68. Arn P, Chen H, Tuck-Muller CM, Mankinen C, Watchel G, Li S, Schen CC, Watchel SS (1994) *Hum Genet* **93**: 389-393
69. Bennett CP, Docherty Z, Robb SA, Ramani P, Hawkins JR, Grant D (1993) *J Mol Genet* **30**: 518-520
70. Wilkie AOM, Campbell FM, Daubeney P, Grant DB, Daniels RJ, Mullarkey M, Affara NA, Fichett M, Huson SM (1993) *Hum Mol Genet* **3**: 1463-1467
71. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held B, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G (1994) *Cell* **79**: 1111-1120
72. Witt M, Michalczak K, Latos-Bieleńska A, Jaruzelska J, Kuczora I, Lopez M (1993) *J Med Genet* **30**: 304-307
73. Witt M, Jaruzelska J (1994) *Post Biol Kom* **21**: 121-132
74. Cui K-H, Warnes GM, Jeffrey R, Matthews C (1994) *Lancet* **343**: 79-82



## 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”.

# Diagnostyka molekularna: amplifikacja sekwencji czy wzmacnianie sygnału?

## Molecular diagnostics: sequence or signal amplification?

RYSZARD SŁOMSKI<sup>1</sup>  
JOLANTA KWIATKOWSKA<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Rynek badań kwasów nukleinowych
- III. Amplifikacja DNA
  - III-1. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)
  - III-2. Reakcja łańcuchowa ligazy (LCR)
  - III-3. Reakcja łańcuchowa polimerazy i ligazy (P/LCR)
- IV. Amplifikacja RNA
- V. Amplifikacja sygnału
- VI. Perspektywy rozwoju diagnostyki molekularnej opartej o amplifikację sekwencji i sygnału

**Wykaz stosowanych skrótów:** ASA — amplifikacja DNA ze starterami o specyficzności dla allelu; ASO — sonda molekularna, oligonukleotyd o specyficzności dla allelu; bDNA — sonda molekularna, rozgałęziony DNA do amplifikacji sygnału; CFTR — gen białka CFTR pełniącego funkcję kanału chlorkowego, mutacje genu CFTR prowadzą do mukowiscydozy; CML — przewlekła białaczka mieloblastyczna; CMV — cytomegalowirus; CPR — cykliczna reakcja sondy molekularnej; DG — gradient czynnika denaturującego; DMD — gen dystrofiny, mutacje genu DMD prowadzą do wystąpienia dystrofii mięśniowej Duchenne'a; ELISA — immunoenzymatyczna metoda detekcji; HBC — wirus C zapalenia wątroby; HBV — wirus B zapalenia wątroby; HD — heterodupleksy; HIV — wirus niedoboru odporności immunologicznej człowieka; HLA — antygeny zgodności tkankowej; LCR — reakcja łańcuchowa ligazy; MCC — metoda chemiczna wykrywania niesparowań w DNA; MTB — *Mycobacterium tuberculosis*; NASBA — amplifikacja kwasów nukleinowych; PCR — reakcja łańcuchowa polimerazy; RCR — reakcja łańcuchowa naprawy; RFLP — polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych; RIA — metoda radioimmunologiczna; SSCP — polimorfizm konformacji pojedynczoniciowych DNA; STD — choroby przenoszone drogą płciową.

<sup>1</sup> Prof. dr hab., Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, Katedra Biochemii i Biotechnologii A.R. ul. Wołyńska 35 60-637 Poznań, Laboratorium Genetyki Molekularnej, ul. Szeherazady 100, 60-195 Poznań

<sup>2</sup> dr, Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

### Contents:

- I. Introduction
- II. Market of nucleic acids analysis
- III. Amplification of DNA
  - III-1. Polymerase chain reaction (PCR)
  - III-2. Ligase chain reaction (LCR)
  - III-3. Polymerase and ligase chain reaction (P/LCR)
- IV. Amplification of RNA
- V. Signal amplification
- VI. Perspectives of further development of molecular diagnostics based on sequence and signal amplification

### I. Wstęp

Opracowane w minionej dekadzie metody badań owocują obecnie coraz szerszym wprowadzaniem analiz DNA do badań diagnostycznych. Można przyjąć, że lata 90-te przejdą do historii jako okres rozpowszechnienia diagnostyki molekularnej. Badania DNA dołączyły w ten sposób do zaakceptowanych technik diagnostycznych, które do tej pory polegały głównie na reakcjach immunochemicznych antygeny z przeciwciałem. W tabeli 1 przedstawiono rozwój analitycznych technik diagnostycznych na tle najważniejszych wydarzeń w badaniach DNA. Przede wszystkim zauważyć można znaczne opóźnienie w powszechnym wdrożeniu analizy DNA w porównaniu do innych

**Tabela 1.**

Rzówń badań diagnostycznych na tle ważniejszych osiągnięć w badaniach DNA.

Test diagnostyczny	Badania molekularne DNA
Precypitacja białek	1945
	1953
Test aglutynacji	1965
	1968
RIA	1970
	1972
	1975
	1977
	1977
	1978
ELISA	1983
	1985
DNA	1985
	1990

technik np. techniki ELISA, którą prawie natychmiast wdrożono w badaniach rutynowych. Opóźnienie wynika nie tyle z kosztów wykonywania analiz DNA, chociaż i te odgrywają ważną rolę, lecz przede wszystkim z silnej pozycji testów immunochemicznych na rynku diagnostycznym. Udział badań DNA na rynku diagnostycznym w 1994 r. nie przekroczył jeszcze 10% [1].

Pierwsze badania diagnostyczne z zastosowaniem analizy DNA zostały przeprowadzone w 1978 r. przez Kana i Dozy'ego [2] i niezależnie przez Orkina i wsp. [3]. Kan i Dozy w swoich badaniach zastosowali analizę restrykcyjną DNA dla miejsca mutacji prowadzonej do wystąpienia anemii sierpowatej oraz jako sondę molekularną fragment genu  $\beta$  globiny człowieka. Okazało się, że tą metodą, zwaną obecnie analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) można było rozróżnić osoby chore od heterozygot (nosicieli choroby) i osób zdrowych. Z kolei Orkin do wykrycia tej samej mutacji w 6 kodonie  $\beta$  globiny, w którym doszło do tranzykcji A $\rightarrow$ T zastosował hybrydyzację z dwoma wariantami oligonukleotydowej sondy molekularnej umożliwiającymi rozróżnienie alleli prawidłowych od zmutowanych. Ta technika diagnostyczna została określona jako ASO i podobnie jak technika RFLP umożliwiała wykrywanie nosicielstwa choroby. Zarówno Kan i Dozy jak i Orkin i wsp. stosowali w swych badaniach sondy molekularne znakowane  $^{32}\text{P}$ . W badaniach zachodziło zatem wzmocnienie sygnału sondy molekularnej poprzez zastosowanie radioizotopu do wykrywania charakterystycznych prążków hybrydacyjnych, z tym, że badanie RFLP posiadało zdecydowanie większą czułość, gdyż do sondy molekularnej wbudować można było więcej  $^{32}\text{P}$ - $\alpha\text{NTP}$  niż w przypadku badania ASO, w którym najczęściej znakowany był koniec 5' oligomeru  $^{32}\text{P}$ - $\gamma\text{NTP}$ , a wprowadzenie większej liczby znakowanych nukleotydów do sondy oligonukleotydowej (najczęściej 19 nukleotydowej) prowadziło do jej szybkiej radiolizy. Nic dziwnego zatem, że badanie typu RFLP uległo w latach 80-tych rozpowszechnieniu i dominowało nad badaniami ASO. Prace przeglądowe omawiające te aspekty zostały zamieszczone na łamach *Postępów Biochemii* [4, 5] i *Biotechnologii* [6, 7]. Rynek badań diagnostycznych ograniczony był jednak głównie do chorób genetycznych. Obecny rynek badań DNA ulega rozszerzeniu i obejmuje coraz więcej zastosowań (Tab. 2).

Szersze zastosowanie technologii badań DNA w diagnostyce molekularnej rozpoczęło się po wprowadzeniu metody amplifikacji DNA *in vitro* przez Saiki i wsp. w 1985 r. [8]. Uzyskali oni ponad 200.000-krotną amplifikację fragmentu genu  $\beta$  globiny stosując parę starterów (primerów) komplementarnych do fragmentu tego genu i flankujących region amplifikacji oraz fragment Klenowa polimerazy z *Escherichia coli*. Zaledwie rok później amplifikacja DNA zmieniła się w reakcję łańcuchową polimerazy (PCR), której odkrywcą był Mullis [9]. Technika PCR jest

**Tabela 2.**

Możliwości zastosowania analizy DNA w diagnostyce molekularnej.

1. Badania bezpośrednio dotyczące człowieka
Choroby infekcyjne
Wirusy
STD
MTB
HIV
Pasożyty
Genetyka
Wady wrodzone
Predyspozycje
Prognozowanie
Choroby nowotworowe
Diagnostyka
Monitorowanie
Prognozowanie
Predyspozycja
Identyfikacja
Badanie ojcostwa
Kryminalistyka
Transplantologia
2. Badania pośrednio związane z człowiekiem
Produkcja żywności
Choroby zwierząt
Biotechnologia
3. Badania naukowe

bez wątpienia jedną z najważniejszych technik biologii molekularnej i umożliwiła gwałtowny rozwój diagnostyki molekularnej ostatnich 10 lat (Tab. 3). Duże firmy farmaceutyczne o ugruntowanej pozycji na rynku diagnostycznym bardzo szybko zauważyły potencjał tej techniki i zaczęły stopniowo wprowadzać na rynek zestawy diagnostyczne do badań DNA. Można zadać pytanie czy amplifikacja sekwencji, bo z nią mamy do czynienia w technice PCR powtórzy rewolucję kliniczną, która nastąpiła po wprowadzeniu przeciwciał monoklonalnych. Główne zainteresowanie firm farmaceutycznych zwróciło się na choroby trudne do jednoznacznego diagnozowania. Wszyscy potentaci diagnostyczni zwrócili się do badań w kierunku chorób zakaźnych, natomiast zainteresowania chorobami genetycznymi przesunęły się na dalszy plan. Krok ten uczyniono głównie dlatego aby wykazać znaczenie kliniczne wyników badań DNA, oszacować koszty analizy chorób zakaźnych a dopiero w drugim etapie przesunąć zainteresowania w kierunku badań nowotworów i chorób genetycznych. Zakłada się, że około 300 mln dolarów w skali roku przeznaczonych jest właśnie na ten cel. Pierwszy etap wdrożenia badań DNA do analizy chorób zakaźnych poświęcony jest głównie opracowaniu testów molekularnych dla badań AIDS, chlamydii, wirusowego zapalenia wątroby i gruźlicy.

## II. Rynek badań kwasów nukleinowych

Rynek badań DNA pomimo gwałtownego rozwoju w ostatnich latach stanowi jedynie niewielką część

**Tabela 3.**

Przykłady możliwości zastosowania amplifikacji kwasów nukleinowych w testach diagnostycznych.

	Częstość występowania	Populacja
<b>1. Choroby genetyczne</b>		
Pląsawica Huntingtona	1/10000	30.000 R(A)
Zespół kruchego chromosomu X	1/1250 mężczyzn 1/2000 kobiet	
Dystrofia miotoniczna	1/7500	
Choroba Alzheimerera	1-6% ludzi powyżej 65 lat (A)	5.000.000 P(A)
Dystrofia mięśniowa Duchenne'a	1/3000	
Hemoglobinopatie	7% populacji	
Mukowiscydoza	1/2000	8.000.000 N(A) 30.000 P(A)
<b>2. Choroby nowotworowe</b>		
Rodzinna polipowatość jelita (FAP)	1/5000	
Rak okrężnicy	1/200	
Rak macicy		3.000.000 T(A)
Rak sutka	1/10	
Ogólna śmiertelność		4.500.000 P(W)
<b>3. Choroby infekcyjne</b>		
HIV		20.000.000 P(W)
AIDS		8.000.000 P(W)
<i>Chlamydia trachomatis</i>		280.000.000 I
<i>Neisseria gonorrhoea</i>		0,5% populacji 31.000.000 T(A)
<i>Herpes simplex</i>		40.000 P 28.000.000 T
<i>Hepatitis B</i>		300.000.000 P
<i>Tuberculosis</i>		8.000.000 P 15.000.000 I(W)

A — dane z USA; I — liczba zainfekowanych; N — liczba nosicieli; P — liczba przypadków; R — liczba rodzin; T — liczba testów; W — dane WHO.

rynku diagnostycznego. Nie ma jednorodnych informacji na ten temat, można jednak przyjąć, że badania DNA stanowią około 1-10% dochodów z badań diagnostycznych, które w 1993 r. przekroczyły na świecie 15 mld dolarów. Przewiduje się, że badania DNA w najbliższych latach przekroczą wartość 1.7 mld dolarów [1]. Według sceptycznych oszacowań amerykańskich w roku 2000 wartość analiz DNA będzie wynosiła około 600 mln dolarów, a wg bardziej optymistycznych prognoz powyżej 2.8 mld dolarów, przy czym potencjalny roczny wzrost może dochodzić nawet do 35%. Jak już wspomniano głównym zainteresowaniem w tych badaniach, które jak dotąd stanowi amplifikacja sekwencji DNA są choroby przenoszone drogą płciową, diagnozowane dotychczas w oparciu o pracochłonne hodowle. Zróżnicowana diagnostyka rzeżączki i chlamydii jest stosunkowo trudna z zastosowaniem technik klasycznych, stanowi więc idealny obiekt do opracowań testów genetycznych. Bezpośrednie wykrywanie wirusów HIV i hepatitis C przyczynia się również do rozwoju badań nad poszukiwaniem nowych leków i monitorowaniem terapii, której koszt jest obecnie bardzo wysoki. Innym przykładem zainteresowań firm farmaceutycznych jest badanie mycobacterii. Występuje tutaj istotna przewaga badań

molekularnych nad badaniami obejmującymi hodowle, ponieważ w badaniach molekularnych uzyskuje się wynik w ciągu 1 dnia, podczas gdy badania klasyczne trwają nieraz kilka tygodni.

Wśród firm farmaceutycznych, które w swoich testach stosują amplifikację DNA na czołowe miejsce wysuwają się Abbott Laboratories, które obejmują ponad 53% rynku diagnostycznego. Dla badań DNA firma Abbott opracowała dwie nowe reakcje zbliżone do PCR — reakcję łańcuchową ligazy (LCR) i reakcję łańcuchową naprawy (RCR — *repair chain reaction*). W ubiegłym roku Abbott doniósł o bardzo pozytywnych wynikach badań z zastosowaniem LCR u kobiet z chlamydią w porównaniu z hodowlami materiału pobranego z wymazów cytologicznych. Podobne testy wykonane u mężczyzn w badaniach moczu wykazały jednak duży odsetek wyników fałszywie negatywnych, co spowodowało wzrost zainteresowań wstępnym etapem przygotowań próbek do badań, w taki sposób aby zostały usunięte inhibitory reakcji. W kwietniu 1994 r. Abbott i Perkin Elmer zawarły porozumienie o wzajemnej wymianie patentów odnośnie metody amplifikacji DNA jak również sprzętu do wykonywania reakcji.

Kolejną wielką firmą farmaceutyczną, która bardzo szybko doceniła przydatność PCR w diagnostyce jest



firma Hoffmann-La Roche. Ta firma dysponuje najważniejszą technologią badania DNA — reakcją łańcuchową polimerazy (PCR), którą odkupiła za 300 mln dolarów od firmy Cetus w 1992 r. Roche bardzo ostrożnie dysponuje licencjami na wykonywanie reakcji PCR i jak dotąd udzielił jej tylko Kodakowi. Jak już zaznaczono Abbott i Roche w 1994 r. zawarły porozumienie o wymianie swoich technologii. Tak więc Roche stosować może w badaniach diagnostycznych PCR, LCR, RCR jak również testy hybrydowe P/LCR. Firma Roche położyła duży nacisk na przygotowanie testów diagnostycznych dla określania HLA-DRB oraz wykrywania enterowirusów, wirusa HIV, cytomegalowirusa, *Mycobacterium avium* i *Mycobacterium intracelulare* a także testu wykrywającego 15 mutacji genu CFTR, prowadzących do wystąpienia mukowiscydozy. W najbliższej przyszłości wdrażaniem objęte mają być badania oporności na ryfampicynę w gruźlicy. Jeśli chodzi o osiągnięcia techniczne firma przygotowała analizator Cobas Amplicor umożliwiający przeprowadzenie detekcji 210 próbek, przy czym możliwe jest jednoczesne wykonanie 24 amplifikacji i 6 testów diagnostycznych dla każdej próbki. Szybkość detekcji oceniana jest na 50 na godz. Można tutaj zauważyć, że mimo istotnego postępu metodycznego w diagnostyce molekularnej w dalszym ciągu dużym problemem jest wstępne przygotowanie materiału do badania diagnostycznego, które również dla omawianych wyżej przypadków nie jest zautomatyzowane.

W minionym roku na rynku diagnostycznym DNA pojawiła się firma Johnson & Johnson. Stało się to możliwe po zakupieniu przez tę firmę oddziału diagnostyki klinicznej Kodaka. Firma Johnson & Johnson jako jedyna nie zajęła się jeszcze chorobami zakaźnymi i jej główne zainteresowanie zwrócone jest na badania genetyczne. W 1995 r. ukazać się mają trzy nowe testy diagnostyczne, w tym jeden na mukowiscydozę. Oparte są one o wariant PCR tzw. ASA-PCR, w którym startery do reakcji PCR charakteryzują się specyficznością dla DNA typu dzikiego lub zmutowanego. Firma rozważa również możliwość wprowadzenia specjalistycznego sprzętu do amplifikacji DNA w okresie 2 lat. Do grupy firm wprowadzających badania DNA w swoich testach diagnostycznych należy również firma Chiron, sprzedająca swoje testy pod nazwą Quantiplex. Rozprowadza ona zestawy diagnostyczne do badań HBV-DNA, HCV-RNA, HIV-RNA, CMV i mRNA dla cytokin, co wskazuje na zwrócenie się w kierunku badań onkologicznych. W badaniach dotyczących RNA duży udział ma również firma Organon-Teknika. Ta firma co prawda nie ujawnia dochodów ze sprzedaży zestawów diagnostycznych, lecz na pewno znajduje się w czołówce. W próbnym badaniach jest już zestaw diagnostyczny do wykrywania RNA wirusa HIV. Dotychczasowe główne osiągnięcia firmy to dwa zestawy dostępne w USA i Europie do wykrywania HIV: test jakościowy HIV-1 RNA QL i test ilościowy HIV RNA QT. Firma Organon Tek-

nika jest właścicielem technologii określonej jako NASBA, umożliwiającej amplifikację RNA, a której wykonanie nie jest uzależnione od specjalistycznego sprzętu. W najbliższym czasie ukazać się mają zestawy do wykrywania translokacji w CML, mutacji czynnika V, hepatitis, CMV, chlamydii i MTB.

Japonia reprezentowana jest na rynku diagnostycznym DNA przez firmę Gene-Probe, która opracowała zestawy diagnostyczne do badań DNA *Chlamydia trachomatis* i *Neisseria gonorrhoea*. Z kolei Boehringer Mannheim, drugi co do wielkości potentat diagnostyczny, zakupił pod koniec 1994 r. duńską firmę PNA Diagnostics i w ten sposób dołączył do grupy sprzedających zestawy do badań DNA.

### III. Amplifikacja DNA

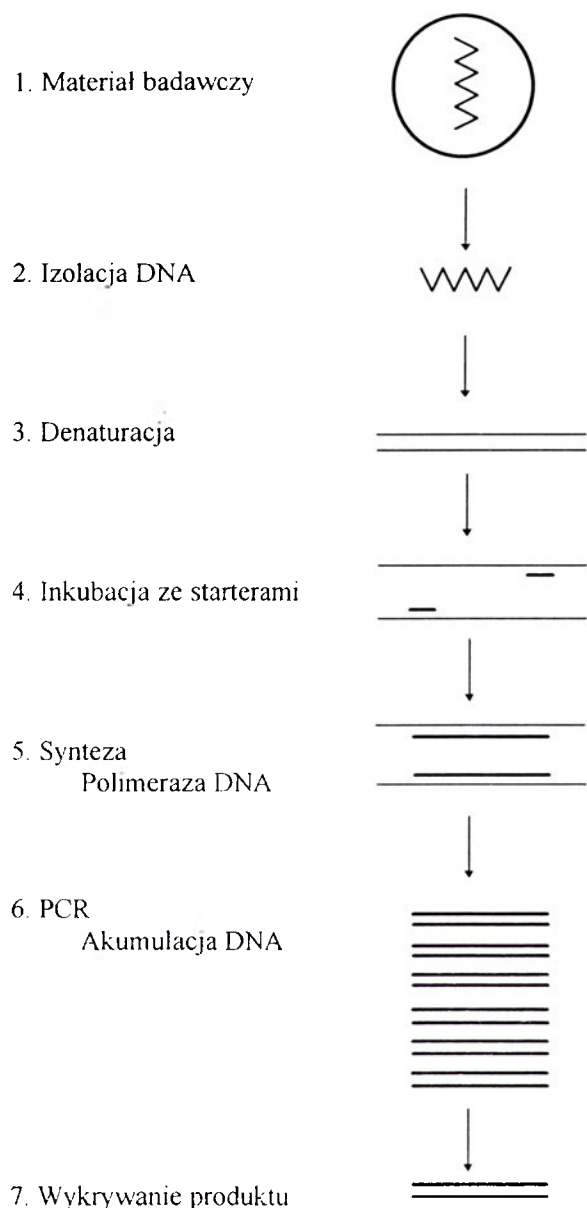
Od chwili opublikowania pierwszej pracy dotyczącej amplifikacji DNA *in vitro*, metody amplifikacji DNA bardzo rozwinęły się i uległy różnym modyfikacjom. Doprowadziło to do powstania co najmniej 12 różnych technologii umożliwiających zwielowrotnienie ilości DNA lub RNA. Równoległe rozwijają się techniki wzmacniania sygnału detekcji. Na czele technik amplifikacji kwasów nukleinowych znajdują się PCR, LCR i NASBA, a także przy mniejszym udziale CPR.

#### III-1. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Metoda PCR została wprowadzona w połowie lat 80-tych przez firmę Cetus, która wcześniej próbowała skonstruować hybrydy komórek somatycznych z przeznaczeniem do immunoterapii nowotworów. Wprowadzenie techniki PCR stanowiło przełom w badaniach molekularnych. Technika PCR stosuje termofilną polimerazę DNA (polimerazę Taq) do uzyskania amplifikacji odcinka DNA między parami starterów (primerów). Reakcja przebiega przy nadmiarze primerów, które hybrydują z matrycą w 60-65°C, natomiast wydłużanie primerów przebiega w 72°C. Matryca DNA jak i powstające amplikony (produkty PCR) są cyklicznie denaturowane przez ogrzewanie w 94°C (Ryc. 1). Reakcja przebiegająca w ten sposób wymaga specjalistycznego sprzętu. Każdy cykl trwa poniżej 3 min. i powstające amplikony służą jako matryce w następnych cyklach reakcji prowadząc do logarytmicznego przyrostu ilości produktów.

Metoda PCR w krótkim czasie dała początek kilku innym metodom, wariantom PCR umożliwiającym amplifikacje nie tylko znanych sekwencji lecz również sekwencji, co do których brakuje jeszcze informacji o sekwencji, przykładem może być wariant PCR tzw. odwrócona PCR (ang. *inverted PCR*), w której badany fragment DNA łączy się z fragmentem znanym lub wklonowanym w wektor a startery są specyficzne dla znanego odcinka DNA [10]. Innym wariantem jest wewnętrzny PCR (ang. *nested PCR*), w którym korzysta się z dwóch par starterów, a przy czym druga para

Amplifikacja matrycy DNA → DNA  
PCR



Ryc. 1 Amplifikacja DNA *in vitro* metodą PCR.

umieszczona jest wewnątrz w stosunku do pierwszej pary [11]. Przez amplifikację z pierwszą parą starterów, w której zalecane jest aby amplifikowano duże fragmenty (1000-2000 pz), a następnie drugą amplifikację znacznie mniejszych fragmentów, uzyskać można podwyższenie specyficzności reakcji przy jednoczesnym wyeliminowaniu fragmentów niespecyficznych.

Matrycą w reakcji PCR może być również RNA, a enzymem stosowanym w tej sytuacji jest odwrotna transkryptaza z *Haemophilus*. Ostatnio dokonywane są próby koamplifikacji nieznaną matrycy jednocześnie z matrycą o znanym stężeniu, co umożliwić ma uzyskanie wyników ilościowych. Jest to rozwinięcie jednego z najważniejszych wariantów PCR tzw. multiplex PCR, w którym przy zastosowaniu kilku par starterów można jednocześnie przeprowadzać amplifikację kilku regionów jednego genu lub wykrywać określone mutacje kilku genów [12]. Tego typu po-

stępowanie stosowane jest powszechnie w wykrywaniu delekcji genu DMD (dystrofia mięśniowa Duchenne'a) lub mutacji punktowych w CFTR (mukowiscydoza). Uzyskać można nawet 13 amplikonów, jednak z przyczyn praktycznych wskazane jest, aby ich liczba wahała się między 5-7 bo ułatwia to znacznie dobranie warunków PCR jak i rozdzielów amplikonów w żelach analitycznych. Teoretycznie wariantów PCR można by przygotować znacznie więcej jednak w praktyce, szczególnie ostatnio, coraz więcej, uwagi poświęca się rozwojowi metod ograniczających zanieczyszczenie reakcji, a różnego rodzaju warianty podstawowej reakcji PCR znalazły się na drugim planie. Jak dotąd największy postęp w zwalczaniu zanieczyszczeń towarzyszących metodzie PCR w badaniach klinicznych odnotowała firma Roche, która przy wykonywaniu testów diagnostycznych w mieszaninie reakcyjnej w miejsce TTP wprowadziła UTP. Umożliwia to działanie na matrycowy DNA N-glikozylazą uracylową celem usunięcia ewentualnych amplikonów zanieczyszczających matrycowy DNA, przy czym N-glikozylaza uracylowa działa wyłącznie na DNA zawierający uracyl i może być po działaniu na taki DNA łatwo zainaktywowana poprzez ogrzewanie we wstępnym, denaturującym etapie PCR. Ta ciekawa technologia pochodzi z licencji firmy Life Technologies i określona została jako AmpErase.

### III-2. Reakcja łańcuchowa ligazy (LCR)

Metoda PCR należy bez wątpienia do najważniejszych technik amplifikacji DNA *in vitro* i wykorzystywana jest w 70% laboratoriów diagnostycznych lecz uzyskała również konkurenta w postaci reakcji LCR, która z powodu unikatowych właściwości stała się bardzo atrakcyjna dla badań diagnostycznych. W metodzie LCR stosowane są 4 startery o długości 50-60 nukleotydów i termofilna ligaza. Startery przygotowane są w ten sposób, aby hybrydowały z matrycą nie pozostawiając lub pozostawiając jedynie jeden wolny nukleotyd między nimi. Jedynie startery, które hybrydowały z matrycą ulegają ligacji. Po ligacji i denaturacji przebiegających cyklicznie podobnie jak w PCR powstające fragmenty DNA służą jako matryca w kolejnych cyklach amplifikacji [13,14]. Podobnie jak w PCR reakcja LCR charakteryzuje się logarytmicznym przyrostem ilości produktów (Ryc. 2). Okazało się, że modyfikacje podstawowych wersji metody LCR mogą znaleźć natychmiastowe zastosowanie w diagnostyce i jednocześnie stanowić punkt wyjścia do automatyzacji diagnostyki. Dla testów klinicznych obydwa startery mogą być przygotowane w ten sposób, że do ich końców 5' przyłączone są ligandy zakotwiczone i ligandy detekcyjne, co w rezultacie prowadzi do tego, że jedynie startery, które uległy ligacji mogą być zidentyfikowane dzięki jednoczesnemu zakotwiczeniu i detekcji. Ta strategia pozwoliła firmie Abbott na dostosowanie reakcji LCR do ist-

Amplifikacja matrycy DNA → DNA  
LCR

1. Materiał badawczy



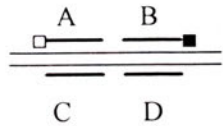
2. Izolacja RNA lub DNA



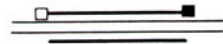
3. Denaturacja



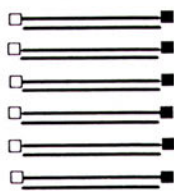
4. Inkubacja ze starterami  
A, B, C i D



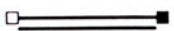
5. Ligacja  
Ligaza DNA



6. LCR  
Akumulacja DNA



7. Wykrywanie produktu



Ryc. 2 Amplifikacja DNA *in vitro* metodą LCR.

niejącego już sprzętu firmy. Firma wprowadza na rynek 3-częściowy zestaw LCX umożliwiający wykonanie reakcji LCR i immunodetekcji produktu. Reakcja LCR wykorzystywana jest również do wykrywania mutacji punktowych i stosowane są wtedy dwie pary starterów komplementarnych do obydwu nici matrycy. Niesparowanie zasad w miejscu mutacji uniemożliwia przebieg reakcji LCR. Oznacza to, że reakcja LCR jest szczególnie przydatna do wykrywania różnego rodzaju mutacji punktowych w produktach PCR.

### III-3. Reakcja łańcuchowa polimerazy i ligazy (P/LCR)

Ponieważ w LCR stosowane są długie startery, prawdopodobieństwo ich niespecyficznego wiązania

z matrycą jest niskie, jednakże może wystąpić tło amplifikacji z powodu ligacji tępych końców starterów. Połączenie reakcji PCR i LCR zaproponowane przez firmę Imclone i Abbott wydaje się przewyższać problem tła, a więc podwyższenia specyficzności, co czyni tę reakcję szczególnie przydatną w badaniach diagnostycznych. Podobnie jak LCR przy wykrywaniu mutacji punktowych P/LCR stosuje 2 pary starterów, ale pozostawia między starterami odstęp kilku nukleotydów. W przeciwieństwie do LCR odstęp między starterami wynosi jedynie kilka nukleotydów i co najważniejsze w odstępie między starterami w składzie nukleotydowym matrycy występować mają jedynie trzy różne nukleotydy. W mieszaninie reakcyjnej P/LCR umieszcza się trzy nukleotydy występujące w matrycy. W wyniku współdziałania polimerazy i ligazy dochodzi do ligacji obydwu starterów. Powstawanie niespecyficznego fragmentu uniemożliwia brak pełnego zestawu czterech nukleotydów w mieszaninie reakcyjnej. Podobnie jak LCR i PCR również P/LCR przebiega w sposób cykliczny. Pojawia się jednak jeszcze dodatkowa możliwość podwyższenia specyficzności reakcji poprzez dobranie odrębnych optymalnych temperatur dla wydłużania starterów i ligacji.

## IV. Amplifikacja RNA

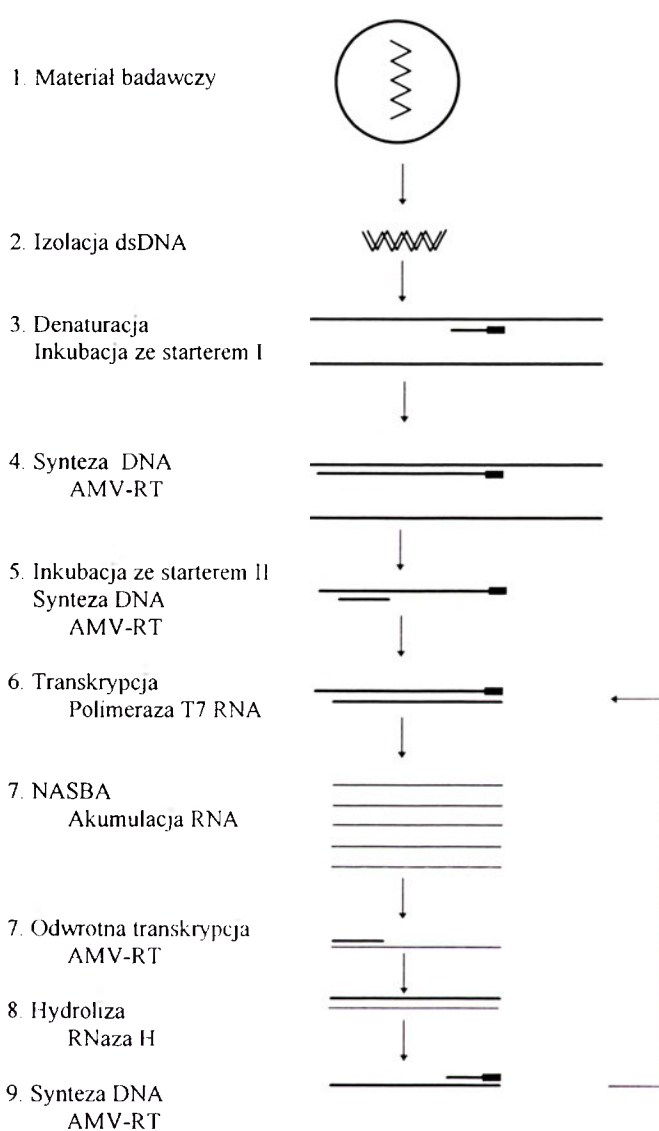
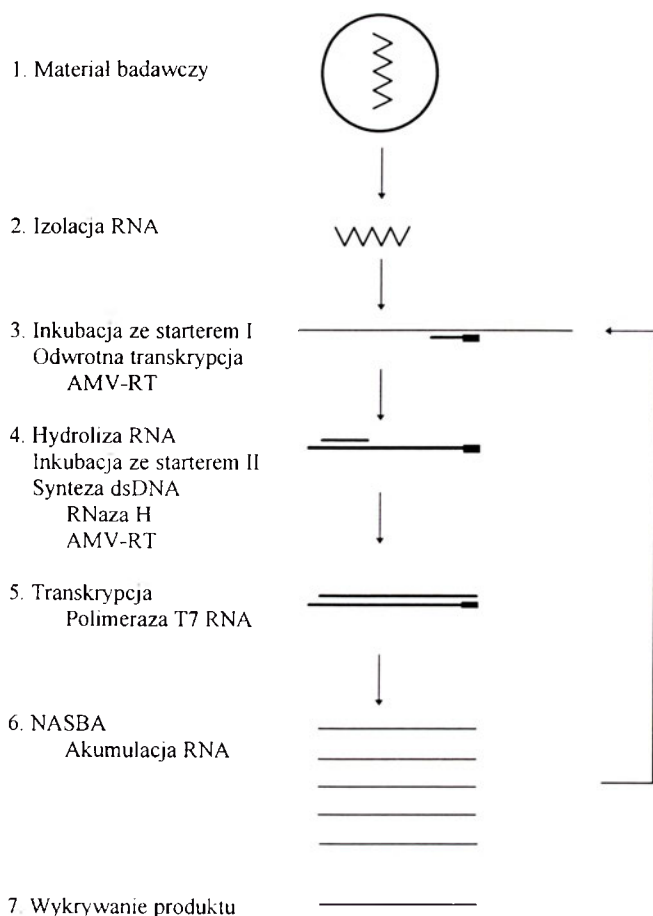
Amplifikacja sekwencji RNA jest często szybsza i wydajniejsza niż amplifikacja DNA, lecz występują tu ograniczenia — przede wszystkim dobrego oczyszczenia badanej matrycy jak i jej zabezpieczenia przed działaniem nukleaz. Amplifikację RNA w swoich zestawach diagnostycznych stosuje firma Organon Technika. Technika ta, określana jako NASBA (ang. *nucleic acid sequence based amplification*) stosuje 3 enzymy do amplifikacji pojedynczoniowych RNA (Ryc. 3) lub dwuniciowych DNA (Ryc. 4). Reakcja przebiega w warunkach izotermicznych, a najczęściej stosowanymi enzymami są odwrotna transkryptaza AMV-RT, polimeraza RNA T7 i RNaza H [15,16]. Reakcję opracowano do wykrywania wirusów DNA, lecz obecnie jej aplikacja została rozszerzona o wykrywanie wirusów RNA, retrowirusów, wykrywanie żywych patogenów i monitorowanie proliferacji komórek nowotworowych. Technika NASBA okazała się tak samo czuła jak PCR przy wykrywaniu wirusa HIV-1. Jak już zaznaczono NASBA jest reakcją izotermiczną, a więc nie korzysta się dla jej wykonania z amplifikatora.

## V. Amplifikacja sygnału

Przed opracowaniem metody PCR główny nacisk w diagnostyce molekularnej kładziono na zwiększenie sygnału detekcji. Pojawiły się metody wbudowania do sond molekularnych 32P- $\alpha$ NTP („nick” translacja, metoda heksamerowa, z zastosowaniem polimerazy DNA), znakowania końca 5' sondy 32P- $\gamma$ NTP (z

Amplifikacja matrycy RNA → RNA  
NASBA

Amplifikacja matrycy DNA → RNA  
NASBA



Ryc. 3 Amplifikacja RNA *in vitro* metodą NASBA.

Ryc. 4 Amplifikacja DNA *in vitro* metodą NASBA.

zastosowaniem kinazy polinukleotydowej) i znakowania 3' sondy  $^{32}\text{P}$ - $\alpha\text{NTP}$  (z zastosowaniem terminalnej transferazy). W wielu laboratoriach diagnostycznych stanowią one nadal podstawowe narzędzie pracy. Ich główne ograniczenie polega na stosowaniu radioizotopów. Dlatego coraz więcej uwagi poświęca się opracowywaniu metod znakowania sond molekularnych nie-radioaktywnymi ligandami, przy czym najczęściej stosowana jest fluoresceina, digoksygenina i biotyna. Etap detekcji polega na wiązaniu ligandu z przeciwciałem skoniugowanym z enzymem, przy którego udziale w obecności substratu zachodzi reakcja chemiluminiscencji lub kolorymetrii.

Przykładem reakcji pośrednich między amplifikacją sygnału, a amplifikacją sekwencji jest CPR — cykliczna reakcja sondy molekularnej. Reakcja ta została zaproponowana do badań diagnostycznych przez firmę ID Biomedical. Sonda molekularna jest hybrydem DNA:RNA i łączy się z sekwencją docelową DNA, a w drugim etapie następuje przecięcie cząsteczki RNA RNazą H, co prowadzi do powstania dwóch fragmentów RNA. CPR jest reakcją izotermiczną.

Nową, oryginalną propozycją amplifikacji sygnału na cele diagnostyczne jest tzw. bDNA (ang. *branched DNA*) zaproponowany przez firmę Chiron. W systemie tym zachodzą dwie reakcje: hybrydyzacji do detekcji DNA i amplifikacji sygnału. W pierwszej reakcji sonda

molekularna hybryduje z komplementarną sekwencją matrycy. Sonda molekularna najczęściej związana jest ze stałym podłożem, np. ścianką mikroplątki (Ryc. 5). Druga sonda molekularna wiąże wychwyconą przez pierwszą sondę matrycę z amplifikującym sygnał DNA, którym jest syntetyczny DNA, silnie rozgałęziony o długości ok. 1000 pz. — bDNA. Rozgałęziony DNA jest zsyntetyzowany w ten sposób, że zawiera tysiące chemiluminiscencyjnych ligandów, które wykrywane są przez chemiluminiscencję digoksyetanu [1]. W metodzie bDNA nie wymagane jest oczyszczenie próbek. Według zapewnień firmy metoda bDNA może wykryć już 60 cząsteczek danej matrycy w 1 ml.

## VI. Perspektywy rozwoju diagnostyki molekularnej opartej o amplifikację sekwencji i sygnału

W najbliższej przyszłości oczekiwać można dalszego postępu badań DNA i rozszerzania wyników dla

## Amplifikacja sygnału bDNA

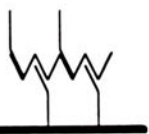
1. Materiał badawczy



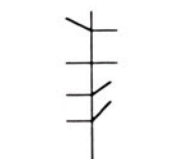
2. Izolacja RNA/DNA



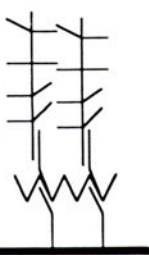
3. Inkubacja z sondami molekularnymi



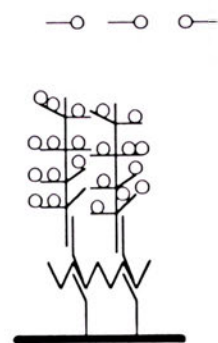
4. Hybrydyzacja z wolnymi sondami i sondami związanymi z podłożem



5. Inkubacja z bDNA



6. Utworzenie hybrydu bDNA:sonda:matryca



7. Inkubacja z sondami zawierającymi enzym dla detekcji sygnału

8. Inkubacja z substratem, ocena chemiluminiscencji

Ryc. 5 Amplifikacja sygnału — bDNA.

potrzeb diagnostyki molekularnej. Autorzy zakładają, że postęp obejmował będzie zarówno dobór materiału badawczego jak i zwiększenie czułości metod oraz automatyzację procedur analitycznych. Jak wynika z przykładów zamieszczonych w tabeli 3 zapotrzebowanie na nowe testy diagnostyczne jest ogromne i w krajach zachodnich, dla wielu chorób genetycznych, nowotworowych i wykrywania patogenów wykonywane są one już rutynowo. Szczególnie w przypa-

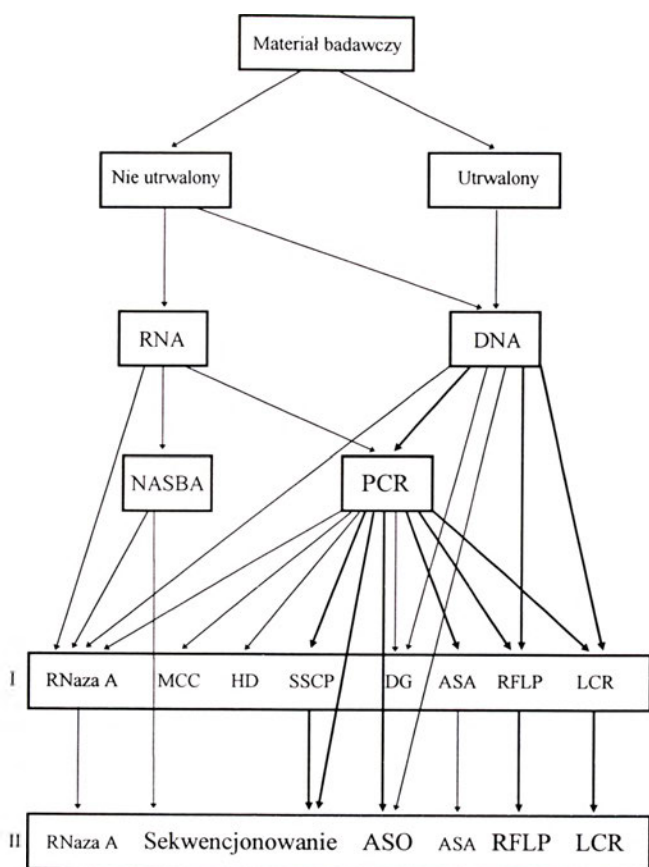
dkach zakażeń, metody amplifikacji sekwencji umożliwiają wykrycie patogenu w czasie zdecydowanie krótszym niż hodowle. W obawie przed ewentualnymi konsekwencjami wynikającymi z opóźnienia terapii poprzez oczekiwanie na wynik hodowli (nieraz 3 tygodnie) szpitale wdrażają testy molekularne. Zgodność wyników takich testów uzyskanych metodami amplifikacji DNA z wynikami hodowli, dla których przyjmuje się 100% jest bardzo wysoka — powyżej 99% [1].

W etapie wstępnym przygotowania materiału do badań występuje opóźnienie metodyczne i sprzętowe w stosunku do samej strategii badań DNA, która poprzez sekwencjonowanie umożliwia wykrycie zmian pojedynczych nukleotydów w DNA. Etap przygotowania DNA do badań jest jednak najważniejszy, gdyż rzutuje na pozostałe etapy wykonywania analizy. Dla przykładu obecność inhibitorów enzymów w preparatach DNA uniemożliwia jego badanie lub powoduje powstanie artefaktów. Jest to szczególnie niebezpieczne przy stosowaniu badań opartych wyłącznie o enzymatyczną amplifikację DNA *in vitro*. Może dochodzić tu do wybiórczej amplifikacji niektórych alleli. Z kolei postęp w samych badaniach DNA jest ogromny i możliwe jest badanie bardzo małych ilości DNA, nawet z pojedynczych komórek. W przypadkach materiału przeznaczanego do badań medyczno-sądowych częstym zjawiskiem jest zdegradowanie DNA. Badania DNA mogą dać wtedy wynik fałszywie negatywny, dlatego wszelkie badania DNA poprzez jego amplifikację powinny przebiegać w obecności kontroli doświadczenia.

Zwiększenie czułości metod obejmować będzie coraz szersze wprowadzanie chemiluminiscencji i kolorymetrii do wykrywania DNA, co w przyszłości zaowocować ma zautomatyzowaniem badania DNA na poziomie rozdzielności elektroforetycznej i detekcji wyniku. Trwają również poszukiwania nowych, optymalnych markerów do badań DNA, które charakteryzowałyby się wielkością w zakresie 100-500 pz i wykazywałyby duży polimorfizm wielkości oraz wysoki stopień heterozygotyczności a jednocześnie niewielką częstość mutacji.

Matrycami do amplifikacji sekwencji i sygnału w celach diagnostycznych może być zarówno RNA jak i DNA (Ryc. 6). Diagnostyka molekularna przebiega głównie poprzez amplifikację DNA metodą PCR. PCR jest również metodą wyjściową dla większości innych analiz molekularnych, które mogą prowadzić do wykrycia obecności defektu molekularnego lub/i podania dokładnej jego charakterystyki (Poziom I i Poziom II na Ryc. 6).

Rozwój informatyki umożliwi przygotowanie specjalistycznych baz danych, jednak z tym zagadnieniem bardzo silnie wiąże się standaryzacja badań wykonywanych przez różne placówki czy kraje. Problem ten na pewno nie ulegnie rozwiązaniu w najbliższej przyszłości, gdyż metody biologii molekularnej, a w szcze-



Ryc. 6 Amplifikacja materiału genetycznego w celach diagnostycznych.

Wyjściowy materiał badawczy można zakwalifikować do dwóch grup, w których materiał genetyczny (RNA lub DNA) izolowany jest bezpośrednio po pobraniu krwi (tkanki) lub z materiału przechowywanego, przesyłanego drogą pocztową lub utrwalonego. W pierwszym przypadku możliwe jest uzyskanie zarówno wysokocząsteczkowego DNA jak i RNA. W drugiej grupie najczęściej izolowany jest DNA. RNA i DNA mogą być stosowane w diagnostyce molekularnej w formie wyjściowej lub po amplifikacji *in vitro*. Pogrubionymi strzałkami oznaczono metody analityczne stosowane najczęściej. Zauważyć można, że obecna diagnostyka molekularna przebiega głównie przez amplifikację DNA metodą PCR. Metoda PCR stanowi metodę wyjściową dla większości analiz molekularnych. Wyróżnić można dwa poziomy uzyskiwania informacji o defekcie molekularnym (poziom I i II). Metody analityczne I poziomu umożliwiają wykrycie mutacji, jednak bez jej bliższej charakterystyki. Poziom drugi umożliwia poznanie molekularnego podłoża choroby, przy czym sekwencjonowanie, ASO, RFLP i LCR dają najdokładniejsze wyniki.

Wyjaśnienie skrótów:

- ASA — Amplifikacja określonych alleli z zastosowaniem starterów rozpoznających allel dziki i allele zmutowane.
- ASO — Hybrydyzacja oligomerów specyficznych dla allelu z badanym DNA. Oligomery łączą się wybiórczo z allelem dzikim lub zmutowanym.
- DG — Metoda analityczna polegająca na obserwacji denaturacji dwuniciowego DNA we wzrastającym gradiencie czynnika denaturującego (mocznika lub temperatury) podczas rozdzielu elektroforetycznego w żelach poliakrylamidowych.
- HD — Metoda analizy mutacji poprzez obserwację heterodupleksów DNA:DNA między zmutowanymi DNA a DNA typu dzikiego. Niezparowania heterodupleksów opóźniają migrację w żelach poliakrylamidowych.
- LCR — Reakcja łańcuchowa ligazy na poziomie I może wykryć DNA (lub patogen) a na poziomie II

umożliwia identyfikację mutacji poprzez dobranie starterów dla miejsca zmutowanego.

MCC — Metoda chemiczna, wykrywanie mutacji polega na działaniu czterotlenku osmu, hydroksyloaminy i piperydiny w miejscach niesparowań heterodupleksów DNA:DNA. Heterodupleks ulega fragmentacji, a powstałe fragmenty wykrywane są w badaniu elektroforetycznym.

NASBA — Metoda amplifikacji kwasów nukleinowych umożliwiająca uzyskanie wielu kopii RNA na matrycy RNA lub DNA.

RFLP — Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA. Na poziomie I stosowana jest do wykrywania polimorfizmu, Na poziomie II poprzez zastosowanie enzymu restrykcyjnego dla miejsca mutacji może wykryć mutację.

RNaza A — Na poziomie I działanie RNazą A na hybrydy RNA:DNA i przecięcie RNA w miejscu niesparowania hybrydu.

Na poziomie II działanie RNazą A na hybrydy RNA:DNA z tą różnicą, że stosowany jest RNA lub DNA zawierający określoną mutację.

SSCP — Metoda analizy polegająca na wykrywaniu polimorfizmu konformacji pojedynczych fragmentów DNA. Mutacje punktowe i mikrodelecje mogą prowadzić do zmiany migracji pojedynczych nici DNA w warunkach natywnych po uprzedniej denaturacji.

gólności PCR uwarunkowane są wieloma parametrami i ich standaryzacja nie jest obecnie możliwa. Nie ma również jasności jakie organizacje powinny czuwać nad poprawnością wykonywania badań diagnostycznych w oparciu o testy molekularne.

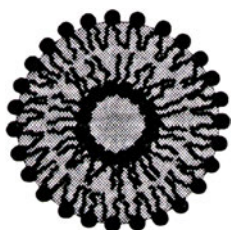
Obecnie w diagnostyce molekularnej wykonywanej przez placówki badawcze przeważa amplifikacja sekwencji metodą PCR, a wzmacnianie sygnału w badaniach hybrydyzacyjnych z sondami molekularnymi (transfer Southerna) jest na pewno rzadziej wykonywane niż w latach ubiegłych. Nie wszystkie badania diagnostyczne mogą być wykonywane technikami amplifikacji sekwencji. Wszędzie, gdzie wykrywane są allele o wielkości powyżej 2000 pz. nadal dominuje amplifikacja sygnału sondy molekularnej. Firmy farmaceutyczne produkujące gotowe zestawy diagnostyczne do badań rutynowych w laboratoriach przy szpitalnych umiejętnie łączą, w zależności od potrzeb amplifikację sekwencji z wzmocnieniem sygnału. Można zatem przyjąć, że amplifikacja sekwencji stosowana do niedawna jako osobna strategia, po połączeniu z wzmocnieniem sygnału będzie podstawową metodą diagnostyki molekularnej.

Praca wykonana w ramach grantu KBN 4S 405 054 04.

Artykuł otrzymano 21 kwietnia 1995 r.  
Zaakceptowano do druku 3 lipca 1995 r.

1. Materiały Konferencji Nucleic Acid-Based Technology Amsterdam 7-9.11.1995
2. Kan YW, Dozy AM (1978) *Lancet* 2: 910-912
3. Orkin SH, Alter BP, Altay C (1978) *N Engl J Med* 299: 166-172
4. Ziętkiewicz E, Słomski R (1987) *Post Biochem* 33: 451-472
5. Jungerman M, Słomski R (1990) *Post Biochem* 36: 14-21
6. Słomski R, Jungerman M, Kraszewski A, Horst-Sikorska W (1989) *Biotechnologia* 2: 74-84
7. Słomski R, Kwiatkowska J, Chlebowska H (1993) *Biotechnologia* 4: 125-131
8. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Ehrlich HA (1985) *Science* 230: 1350-1354
9. Mullis KB, Faloona FA (1987) *Methods Enzymol* 155: 335-350
10. Triglia AT, Peterson MG, Kemp DJ (1988) *Nucleic Acids Res* 16: 8186
11. Gibbs RA, (1990) *Anal Chem* 62: 1202-1214
12. Chamberlain JS, Gibbs, RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT (1989) *Nucleic Acids Res* 16: 11141-11156
13. Bond SB, Carrino JJ, Hampl H, Hanley K, Rinehardt LA, Laffler T (1990) W: Monzenego (wyd): Papillomavirus in Human Pathology. Recent Progress in Epidermoid Precancers. Serono Symposia Publications 78: 425-433
14. Backmann KC, Carrino JJ, Bond SB, Laffler TG (1991) *European Patent Application* No EP 0 439 183 A2
15. Compton J (1991) *Nature (Lond)* 350: 91-92
16. Kievitis T, van Gemen B, van Strijp D, Schukink R, Diricks M, Adrianse H, Malek L, Sooknanan R, Lens P (1991) *Journal of Virological Methods* 35: 273-286
17. Bruisten S, van Gemen B, Koppelman M, Rasch M, van Strijp D, Schukink R, Beyer R, Weigel H, Lens P, Huisman H (1993) *AIDS Research and Human Retrovirus* 9: 259-265

### W. Meijbaum-Katzenellebogen's Seminars



## 3. LIPOSOMES IN BIOLOGY AND MEDICINE

June 3-5, 1996, Wrocław, Poland

General Objective of the Seminar:

To discuss recent advances in construction and application of liposomes in research and clinical practice.

Selected Aspects:

- liposomes, techniques of their preparation and loading
- liposomal stability and its modulation
- liposomes in studies of biomembranes
- liposome technology - from lab bench to clinic
- other drug delivery systems

Daily lectures (international speakers) and facilities for posters. Social events. Exhibition of pharmaceutical, chemical and biochemical companies.

Send application requests to:

Prof. Arkadiusz Kozubek  
Organising Committee  
3 rd Meijbaum-Katzenellenbogen's Seminar.  
LIPOSOMES IN BIOLOGY AND MEDICINE  
Institute of Biochemistry  
Wrocław University  
Przybyszewskiego 63/77  
51-148 Wrocław, Poland  
tel/fax +48 (71) 252930

Early application is advised as Seminar LB&M is limited to 100 persons.

# Terapia genowa — wektory i strategie

## Gene therapy — vectors and strategies

ŁUKASZ HUMINIECKI\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Metody transferu genów
  - II-1. Wektory wirusowe
  - II-2. Wektory niewirusowe
  - II-3. Nakierowanie wektorów
- III. Strategie terapii genowej
  - III-1. Choroby nowotworowe
  - III-2. Choroby dziedziczne
  - III-3. Nabyty zespół niedoboru odporności — AIDS
- IV. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** ADA — ostry złożony zespół niedoboru odporności; AIDS — nabyty zespół niedoboru odporności; LTRs — *long terminal repeats*; ITRs — *inverted terminal repeats*; AAV — *Adeno Associated Virus*; HSV-tk — kinaza tymidynowa wirusa *Herpes simplex*; TILs — limfocyty naciekające guz; TNF — czynnik nekrozy nowotworów; sIL-6R — rozpuszczalna forma receptora dla interleukiny 6; MHC — zespół głównych antygenów zgodności tkankowej; MDR — geny oporności wielolekowej; HIV — *Human Immunodeficiency Virus*; Tat i Rev — białka regulatorowe HIV; TAR i RRE — sekwencje rozpoznawane przez Tat i Rev; RevM10 — transdominujący mutant Rev; SfV — wewnątrzkomórkowe mono-łańcuchowe przeciwciało.

### I. Wstęp

Rozwój biologii molekularnej, a w szczególności metod rekombinacji DNA, zasugerował nowe podejście do leczenia niektórych chorób — terapię genową. Z dość dużą pewnością można przewidywać, że w przyszłości będzie ona przydatna w leczeniu nowotworów, chorób dziedzicznych i infekcji wirusowych. Podstawową jej zasadą jest dostarczanie do komórki genu tak, aby ulegał transkrypcji. Powstające w wyniku ekspresji wprowadzonej informacji genetycznej RNA może służyć do syntezy białka, bądź samo w sobie spełniać funkcję terapeutyczną.

Terapia genowa jest dziedziną niezwykle młodą. Pierwsza kliniczna próba prowadzona przez Andersona, Rosenberga i Blaese miała miejsce w 1990 r. i dotyczyła leczenia ostrego złożonego zespołu niedoboru odporności — ADA [1]. Do końca 1994 r. na całym świecie zostało zatwierdzonych do badań klinicznych ponad 100 różnych programów [2].

### Contents:

- I. Introduction
- II. Methods of gene transfer
  - II-1. Viral vectors
  - II-2. Non-viral vectors
  - II-3. Vector targeting
- III. Gene therapy strategies
  - III-1. Tumours
  - III-2. Hereditary disorders
  - III-3. Acquired immunodeficiency syndrome — AIDS
- IV. Conclusions

Próby te objęły ponad 300 pacjentów. Około 60% tych badań dotyczyło nowotworów, 25% chorób dziedzicznych, 10% nabytego zespołu niedoboru odporności — AIDS. Większość z nich to próby kliniczne pierwszej fazy, mające na celu oszacowanie bezpieczeństwa analizowanych metod. Terapia genowa stwarza wiele teoretycznych zagrożeń. Dlatego do prób klinicznych tak dobierano pacjentów, aby stan ich zdrowia uzasadniał stosowanie słabo zbadanej, eksperymentalnej metody leczenia. W wielu przypadkach byli to ludzie śmiertelnie chorzy. W świetle wspomnianych obaw wyniki testów bezpieczeństwa wydają się niespodziewanie dobre. Doniesiono o poważniejszych efektach ubocznych tylko w przypadku jednego pacjenta z mukowiscydozą (zapalenie płuc) i kilku z nowotworem mózgu [3].

### II. Metody transferu genów

Techniki wprowadzania genów można posegregować na takie, w których DNA wprowadza się do komórek stosując pewne metody fizyczne lub chemiczne oraz takie, gdzie konstruuje się wektory zdolne do samodzielnego przekazywania informacji genetycznej do komórki.

Do pierwszych zalicza się precypitację z  $\text{CaPO}_4$ , elektroporację, mikroiniekcję, techniki biobalistyczne. Metody te są jednak mało wydajne [4] i uciążliwe w stosowaniu. Trudno sobie wyobrazić ich użycie *in vivo*. Obecnie zdają się służyć przede wszystkim do konstruowania linii komórek produkujących wektory wirusowe.

Dopiero opracowanie systemów wektorowych umożliwiło wydajne i selektywne wprowadzanie genów do komórek. Można wyróżnić wektory oparte na rekombinowanych wirusach (retrowirusach, adenowi-

\* Student, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Wydział Biologii, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań



rusach, defektywnych parwowirusach, wirusach *Herpes simplex*, *Vaccinia*, *Polio*, *Sindbis* [4]) i niewirusowe (liposomy, koniugaty molekularne [5]). Należy jednak pamiętać, że tylko wektory retrowirusowe, adenowirusowe i lipofekcja są dopuszczone do prób klinicznych [6], reszta to systemy eksperymentalne testowane na zwierzętach i hodowlach komórek *in vitro*. O tym czy i w jakim stopniu terapia genowa będzie miała wpływ na codzienną praktykę leczniczą, zadecyduje rozwój coraz doskonalszych systemów wektorowych. Konieczne jest przełamanie zjawiska znacznie obniżonej wydajności modyfikacji przy zwiększaniu jej specyficzności. Wektory przyszłości powinny cechować się wysoką pojemnością, wydajnością i selektywnością, zapewniać integrację genu terapeutycznego z genomem komórki-gospodarza w ściśle określonym miejscu, jeśli to konieczne poddawać jego ekspresję mechanizmowi regulacyjnemu komórki-gospodarza oraz działać bez wywoływania skutków ubocznych.

Przykładem dokonującego się postępu jest opracowanie nowatorskiej metody transportu genów do mitochondriów [7]. Udowodniono, że kowalencyjne związanie DNA z peptydem tranzytowym specyficznym dla transportu białek do matriks mitochondrialnej (np. z peptydem tranzytowym transkarboksylazy ornitynowej), wydajnie stymuluje jego transport poprzez błonę mitochondrialną. Perspektywnym celem tych prac jest terapia chorób spowodowanych mutacjami mitochondrialnego DNA.

## II-1. Wektory wirusowe

a) Retrowirusy — są to RNA wirusy. Po wnikięciu retrowirusa do komórki następuje synteza właściwego mu DNA, który następnie integruje z genomem gospodarza w przypadkowym miejscu, przy czym niezbędnym warunkiem integracji jest podział komórki. Jedynym wyjątkiem od tej ostatniej reguły są lentiwirusy mogące integrować także w komórkach niedzielących się. Terapia retrowirusowa daje trwałą ekspresję wprowadzonego genu (także u potomstwa zmodyfikowanej komórki). Przypadkowe miejsce integracji, stwarza też jednak niebezpieczeństwo transformacji komórki w wyniku mutagenyzy insercyjnej (aktywacja leżącego poniżej protoonkogenu, albo inaktywacja znajdującego się w miejscu integracji anty-onkogenu). Kod retrowirusa zawarty w jego RNA po „przepisaniu” na DNA można przedstawić następująco: LTR-*gag-pol-env*-LTR. LTRy (ang. *long terminal repeats* — LTRs) to regiony niekodujące, odpowiedzialne za integrację i regulację transkrypcji. Region *gag* koduje białka rdzenia wirusa, *pol* odwrotną transkryptazę i integrazę, a *env* glikoproteiny otoczki. Genem terapeutycznym (z ewentualnym genem markerowym) zastępuje się *gag-pol-env*. Taka pochodna retrowirusa ulega integracji, ale nie jest zdolna do autoreplikacji. Najczęściej używany wektor retrowirusowy to rekombinowany wirus leukemii mysiej (ang.

*Murine Leukemia Virus* — MuLV) [8]. Wyjątkowo dla terapii AIDS korzystniejsze wydaje się zastosowanie jako wektora (mimo trudności w produkcji) zrekombinowanego wirusa HIV [9] (selektywne infekowanie limfocytów CD4 oraz właściwa lentiwirusom zdolność do integracji nawet przy braku podziałów komórki).

b) Adenowirusy — są to podwójnoniciowe DNA wirusy, nie integrujące się z genomem gospodarza. Nie wymagają one do produktywnej infekcji podziałów komórek. Wirusowe DNA funkcjonuje w postaci nietrwałego epizomu, łatwo podlegającego inaktywacji (szczególnie w trakcie podziału komórki). Dlatego efekt terapii jest stosunkowo krótkotrwały, ale zminimalizowane jest niebezpieczeństwo transformacji komórki-gospodarza. Uniemożliwienie autoreplikacji osiąga się przez usunięcie z genomu adenowirusa regionu E1 [10, 11]. Wadą adenowirusów jest ich immunogenność, przy czym indukowana jest także odpowiedź cytotoksyczna wobec komórek stransdukowanych. Jest to kolejny czynnik decydujący o krótkotrwałości efektów terapii przeprowadzanej za pośrednictwem rekombinowanych adenowirusów. Nie należy jednak wykluczać ich użycia jako wektorów w terapii genowej. Mogą one być z powodzeniem stosowane w sytuacjach kiedy krótkotrwałość osiąganego efektu nie jest wielką przeszkodą, a wywoływana reakcja immunologiczna nie ma praktycznego znaczenia (na przykład w mukowiscydozie).

c) Defektywne parwowirusy — są to pojedynczoniociowe DNA wirusy. Ich zaletą jest to, że do autoreplikacji wymagają koinfekcji adenowirusa. Stąd nazwa wirus adenosatelitarny (ang. *Adeno Associated Virus* — AAV). Ponadto preferencyjnie integrują z genomem gospodarza w określonym miejscu chromosomu 19. Cechę tą warunkują dwie odwrotnie powtórzone sekwencje końcowe (ang. *inverted terminal repeats* — ITRs) wraz z białkami kodowanymi przez region *rep* [12]. Niestety białka Rep są toksyczne dla komórki-gospodarza. Specyficznej co do miejsca integracji towarzyszy równie częsta integracja niespecyficzna. Trudno jest także otrzymywać AAV bez zanieczyszczeń tzw. pomocniczymi adenowirusami. Kolejną wadą jest niska (nawet jak na wektor wirusowy) pojemność — około 4000pz. Wszystko to sprawia, że rekombinowane AAV — wektory wzbudzające początkowo duże nadzieje, ciągle nie są stosowane w próbach klinicznych.

## II-2. Wektory niewirusowe

a) Liposomy — charakteryzuje je duża pojemność, niska immunogenność, nietoksyczność. W przypadku konieczności długotrwałej terapii można lipofekcję bez przeszkód wielokrotnie powtarzać. Jeśli użyjemy kationowych liposomów *in vivo* we wlewie dożylnym to głównymi odbiorcami będą komórki prowadzące intensywną endocytozę (przede wszystkim makrofagi wolne oraz osiadłe wątroby, szpiku kostnego i śledzi-

ny). Aby tego uniknąć stosuje się w taki sposób liposomy typu „niewidzialne” (ang. *stealth*), z dodatkiem gangliozydu GM1 lub glikolu polietylenowego (PEG), co nadaje ich powierzchni ładunek ujemny i czyni „niewidocznymi” dla makrofagów [5]. Aby nadać liposomowi powinowactwo do określonych komórek można umieścić na jego powierzchni przeciwciało, hormon albo czynnik wzrostu. Stymulację fuzji liposomu z błoną cytoplazmatyczną komórki docelowej zapewnić może białko fuzjogenne F (ang. *fusogenic protein*) wirusa Sendai.

Wysoce wydajne, łatwo integrujące się z błoną komórkową liposomy kationowe powinno się raczej stosować *ex vivo*, ewentualnie *in vivo* miejscowo (iniekcja wprost do guza, wlew dotętniczy, podanie do dróg oddechowych w postaci aerozolu itp.).

b) Koniugaty molekularne (ang. *molecular conjugate vectors*) — składają się z określonego liganda połączonego kowalencyjnie z polilizyną (polikation), która dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym wiąże plazmid. Taki koniugat wnika do komórki na zasadzie endocytozy sterowanej receptorem (dla w/w liganda [13]). Aby wektor opuścił endosom przed przyłączeniem lizosomu i strawieniem, dodaje się do niego fragment otoczki adenowirusa [13]. Związane jest to z właściwą adenowirusom, powodowaną przez pewne białka otoczki, zdolnością do szybkiego opuszczania endosomu.

### II-3. Nakierowywanie wektorów

W wielu przypadkach krytyczne znaczenie dla powodzenia terapii genowej ma skonstruowanie wektora doprowadzającego do ekspresji genu terapeutycznego tylko w niektórych rodzajach komórek. Wektory o takiej właściwości określa się mianem kierowanych (ang. *targeted*), a terapię prowadzoną z ich użyciem nazywa się selektywną. Opisany efekt można osiągnąć na dwa sposoby:

a) Wybiórcze infekowanie. Wektor przekazuje gen terapeutyczny tylko niektórym rodzajom komórek. W absolutnej większości wirusy aby wnikać do komórki muszą związać się ze specyficznym receptorem na jej powierzchni. Powinowactwo do tych receptorów zapewniają pewne elementy otoczki (np. glikoproteiny kodowane przez geny *env* u retrowirusów). Zmieniając te ligandy na drodze rekombinacji genetycznej, przyłączenia przeciwciała, czy chemicznej modyfikacji, możemy sterować tropizmem tkankowym wirusa [5].

b) Wybiórcza transkrypcja genu terapeutycznego. Dokonuje się przez umieszczenie genu terapeutycznego pod kontrolą promotora tkankowo-specyficznego. Na przykład aby osiągnąć ekspresję w hepatocytach można zastosować promotor albuminy [14], w przypadku melanocytów odpowiedni będzie promotor tyrozynazy [15]. Proponuje się także szereg promotorów nowotworowo-specyficznych. Przykłady to

promotor  $\alpha$ -fetoproteiny dla nowotworu wątrobowo-komórkowego; promotor onkogenu ERBB2 dla raka sutka, żołądka, jelita cienkiego i grubego; promotor antygeny karcynoembrionalnego dla raka jelita grubego, płuca, żołądka [16]. Można też wykorzystać naturalne powinowactwo retrowirusów (użytych jako wektor) i niedefektywnych parwowirusów (wykorzystujemy tylko wirusowy promotor) do komórek nowotworowych.

### III. Strategie terapii genowej

Podstawową decyzją jaką należy podjąć w trakcie opracowywania programu terapii genowej jest wybór, czy ingerencji genetycznej będziemy dokonywać poza (*ex vivo*), czy wewnątrz (*in vivo*) organizmu pacjenta. Wygodniejsza jest modyfikacja *ex vivo*. Nie jest wtedy tak ważna selektywność (izolujemy tylko interesujący nas typ komórek). *Ex vivo* możliwe jest wprowadzenie genu terapeutycznego w uprzednio upatrzone miejsce w genomie, w drodze tzw. somatycznej rekombinacji homologicznej [17]. Jak na razie jest to nie do przeprowadzenia *in vivo* ze względu na małą wydajność procesu powodującą konieczność selekcji negatywnej komórek, w których integracja nie zaszła, bądź miała miejsce bez selektywności. Wektory stosowane *ex vivo* zawierają najczęściej oprócz genu terapeutycznego także gen oporności na antybiotyk, umożliwiający pozytywną selekcję komórek, do których udało się wprowadzić materiał genetyczny, i w których ulega on ekspresji. Taka selekcja nie jest oczywiście możliwa *in vivo*. Przykładem jest gen oporności na neomycynę, czyniący komórki niewrażliwymi na stosowany analog neomycyny G418. Gen niewrażliwości na antybiotyk może służyć także jako gen markerowy.

W wielu przypadkach konieczna jest jednak modyfikacja komórek *in vivo*. Szczególnie trudna jest terapia obliczona na eliminację komórek nowotworowych. Wymaga ona wysokiej wydajności (celem jest zabicie wszystkich nieprawidłowych komórek) oraz doskonałej wprost selektywności. Nieco mniej wymagająca jest terapia chorób dziedzicznych (terapię genową *in vivo* trzeba np. stosować w leczeniu mukowiscydozy [18]). Częściowo traci wtedy na znaczeniu wymóg wydajności (często dla skorygowania nieprawidłowego fenotypu wystarcza, że tylko pewien procent komórek normalnie produkujących daną substancję podejmie swoją funkcję). Podobnie mniej rygorystyczne jest kryterium selektywności (produkcja w tkance białka, które normalnie się tam nie znajduje, o ile zachodzi w znikomych ilościach, nie jest zwykle toksyczna).

W przypadku terapii genowej infekcji wirusem HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) najczęstszym celem jest modyfikacja limfocytów CD4. Z powodu ryzyka zakażenia personelu, zastosowanie programów *ex vivo* na szerszą skalę w leczeniu klinicznym wydaje się wręcz niemożliwe. Dlatego w tym wyjątkowym przypadku istnieje tendencja do rozwijania technik *in vivo*.

### III-1. Choroby nowotworowe

Obecnie ilościowo zdają się przeważać programy związane ze szczepionkami przeciwnowotworowymi [4]. Powodem jest zapewne duże bezpieczeństwo i stosunkowa łatwość wykonania (modyfikacji dokonuje się *ex vivo*). Bardzo obiecujące, choć trudne i ryzykowne, są strategie wprowadzania do komórek nieprawidłowych genów wrażliwości na pewne leki (tzw. „genów samobójczych” ang. *suicide genes*).

a) Wprowadzanie „genów samobójczych”. Zabiegu dokonuje się *in vivo* poprzez iniekcję wektora (bądź fibroblastów produkujących wektor wirusowy) wprost do guza (w celu zniszczenia guza pierwotnego), ewentualnie dożylnie (chcąc wyeliminować przerzuty). Po upływie czasu koniecznego do transferu genów do komórek nowotworowych i ekspresji zawartej w nich informacji genetycznej, podaje się systemicznie odpowiedni lek, normalnie nietoksyczny albo słabo toksyczny dla komórek człowieka.

Najczęściej stosowany jest gen kinazy tymidynowej wirusa *Herpes simplex* (HSV-tk) kodujący białko fosforylujące gancyklowir (ew. nieco inną pochodną guaniny — acyklowir) do monofosforanu, który pod wpływem enzymów komórki-gospodarza, ulega przemianie w silnie toksyczny trójfosforan [19-21]. Jednocześnie niszczące działanie nie jest ograniczone do komórki produkującej białko HSV-tk, ale obejmuje także komórki kontaktujące się z nią swą powierzchnią (ang. *bystander killing effect*). Umożliwia to całkowite zniszczenia guza nawet wtedy, gdy tylko do części jego komórek wprowadzony został gen HSV-tk.

Inny przykład to gen kodujący dezaminazę cytozynową. W obecności tego enzymu przy podawaniu 5'-fluorocytozyny powstaje toksyczny 5'-fluorouracyl. Nie może on jednak migrować poza komórkę w związku z czym brak jest efektu *bystander killing* [22-24].

Niedawno wykazano [25-27], że w przypadku HSV-tk i genu dezaminazy cytozyny w grę wchodzi nie tylko wytwarzanie toksycznych metabolitów, ale także stymulacja układu immunologicznego, gdyż pozytywnych efektów terapii nie obserwowano u zwierząt z niedoborem odporności.

Ostatnio zaproponowano użycie jako „genu samobójczego” genu cytochromu p-450 [28]. Zdziwienie może budzić wykorzystanie enzymu silnie aktywnego w wątrobie. Rzeczywiście, mamy tu do czynienia z odmiennym podejściem terapeutycznym. Stosowanymi lekami są pochodne oksazofosforynowe: cyklofosfamid i jego izomer ifosamid — cytostatyki „normalnie” stosowane w leczeniu niektórych nowotworów. Są to w rzeczywistości proleki, przekształcane w aktywną formę w wątrobie pod wpływem cytochromu p-450. Oksazofosforyny wykazują bardzo silny, nie wymagający nawet bezpośrednio kontaktu komórek, *bystander killing effect*. Ponadto cytostatyki te są skuteczne we wszystkich fazach cyklu komórkowego (system HSV-tk niszczy tylko w fazie S, pewna

zaś pula komórek nowotworu pozostaje w fazie G<sub>0</sub>, co powoduje duże niebezpieczeństwo wznowy). Aby uniknąć układowej toksyczności oksazofosforynów planuje się stosować ich iniekcję wprost do masy guza i/albo selektywne hamowanie aktywności wątrobowego cytochromu p-450 (dominuje tam inny izoenzym niż wszczepiany komórkom nowotworu).

b) „Naprawa nowotworów”.

Powszechnie wskazuje się na genetyczne podłoże choroby nowotworowej [29, 31, 32]. Za proces carcinogenezy odpowiedzialne są gromadzone w ciągu życia (w pewnych przypadkach także odziedziczone) mutacje w różny sposób powodujące aktywację onkogenów lub inaktywację antyonkogenów. Przypuszcza się, że bez względu na charakter mutacji, wprowadzenie funkcjonalnej kopii antyonkogenu, czy „wyciszenie” onkogenów za pomocą którejś ze strategii antysensu [30], powinno hamować niekontrolowane podziały komórek nowotworowych.

c) Immunostymulacja.

Komórki nowotworowe są rozpoznawane jako obce i są w pewnej mierze atakowane przez układ odpornościowy. Najważniejszą rolę gra tu odpowiedź komórkowa za pomocą limfocytów T cytotoksycznych. Reakcja ta jest jednak słaba i w efekcie nie dochodzi do zwalczania choroby.

Chcąc wykorzystać możliwości terapii genowej dla wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej przeciw nowotworowi, próbowano bezpośredniej stymulacji limfocytów przez wprowadzenie do nich genów cytokin. W tym celu pobierano limfocyty naciekające guz (ang. *tumour infiltrating lymphocytes*), namnażano je *in vitro* i wprowadzano gen czynnika nekrozy nowotworów (ang. *tumour necrosis factor* — TNF) w celu nadania im większej zjadliwości oraz gen interleukiny 2, dla stymulacji ich ilościowego rozwoju. Próby kliniczne prowadzone w Narodowym Instytucie Zdrowia USA w 1991 r. dały zniechęcające rezultaty. Nie ma podstaw aby twierdzić, że zmodyfikowane limfocyty po wszczepieniu w większych ilościach ponownie atakują guz. Monitorowanie wyników krwi pacjentów i testy laboratoryjne na zwierzętach zdają się potwierdzać obawy przed ich niekontrolowanym autokrynnie stymulowanym namnażaniem [33].

W innym podejściu stosuje się specyficzne szczepionki przeciwrakowe. Dla ich przygotowania pobiera się komórki nowotworu, namnaża *in vitro* i wprowadza do nich gen którejś z cytokin. Wyniki badań zdają się sugerować szczególną aktywność połączenia dwóch genów: interleukiny 6 i rozpuszczalnej formy jej receptora (sIL-6R) [4]. Przed przeprowadzeniem szczepienia należy jeszcze naświetlić komórki nowotworowe odpowiednią dawką promieni R<sub>tg</sub>, aby uniemożliwić ich dalszy wzrost.

Kolejna strategia immunostymulacji polega na wszczepieniu komórkom nieprawidłowym *in vivo* genu kodującego silnie immunizujący antygen (np. allogeniczne główne antygeny zgodności tkankowej — MHC

[34]), ewentualnie tzw. kostymulatorów powierzchniowych (np. B7.1 [35]), których obecność silnie aktywuje swoiste limfocyty T cytotoksyczne.

d) Ochrona komórek szpiku w trakcie chemioterapii poprzez wprowadzenie genu oporności wielolekowej (ang. *multi drug resistance* — MDR1).

Opracowanie tej strategii umożliwiły badania nad mechanizmami oporności niektórych nowotworów na stosowane chemioterapeutyki [36]. Cytostatyki są lekami o niskim indeksie terapeutycznym, w związku z czym wywołują liczne efekty uboczne. Jedną z najbardziej narażonych jest silnie proliferująca populacja komórek krwiotwórczych szpiku. Nadawanie jej oporności na następnie podawane leki poprzez wprowadzanie genu MDR1, pozwalałoby na dłuższą i intensywniejszą kurację [37].

e) Próby stosowania terapii genowej dla udoskonalenia techniki przeszczepów autologicznych szpiku w leczeniu białaczek.

Stosowanie chemioterapeutyków w przebiegu nowotworów krwi daje często tylko okresową remisję. Wykonanie przeszczepu allogenicznego wymaga znalezienia odpowiedniego dawcy i stwarza duże niebezpieczeństwo powikłań. Niedogodności te nie istnieją w przypadku przeszczepu własnego, uprzednio oczyszczonego z komórek nowotworowych szpiku kostnego [38]. Niestety stosowane dotychczas procedury oczyszczania wydają się być nieskuteczne. Zastosowanie transferu genów może być dwójakie. Po pierwsze, znakowanie oczyszczonego szpiku genem markerowym pozwoli ustalić, czy wznowa rzeczywiście powodowana jest niedokładnością procesu oczyszczania (komórki nowotworowe będą posiadały gen markerowy), czy też zawodzi stosowana *in vivo* chemioterapia

(komórki wznowy bez genu markerowego). Istnieją bowiem przypuszczenia, że o sukcesie przeszczepu allogenicznego decyduje reakcja przeszczep-przeciw-białaczce (ograniczony wariant zespołu przeszczep-przeciw-gospodarzowi). Jeżeli obawy te nie potwierdzą się, terapia genowa może posłużyć do lepszego oczyszczenia szpiku.

### III-2. Choroby dziedziczne

W tabeli 1 wymienione są niektóre z chorób dziedzicznych, w przypadkach których próbuje się stosować terapię genową.

Wydaje się, że aby terapia genowa mogła być obecnie skutecznie zastosowana dla leczenia danej choroby dziedzicznej powinny być spełnione następujące warunki: a) jednogenowość; b) ograniczona liczba komórek, których korekcja ma krytyczne znaczenie dla przywrócenia prawidłowego fenotypu; c) brak konieczności regulacji ekspresji wprowadzonego genu w zależności od fazy cyklu komórkowego, czy od sygnałów ze środowiska zewnętrznego; d) szeroki przedział terapeutyczny pomiędzy zbyt niską (nieskuteczną), a zbyt wysoką (toksyyczną) ekspresją genu.

W przypadku kiedy patologiczny fenotyp jest recesywny wystarczy tzw. wzmocnienie genu (dostarczenie prawidłowej kopii bez eliminacji zmutowanego allelu). Jednak, gdy będzie on dominował, potrzebna jest wymiana genu („uciszenia” nieprawidłowego allelu można dokonać w strategii antysensu [30], albo z wykorzystaniem somatycznej rekombinacji homologicznej [17]).

Prowadzi się intensywne badania nad transferem genów do komórek prekursorowych krwi, tak aby

**Tabela 1.**

Niektóre z chorób dziedzicznych, dla których próbuje się stosować terapię genową

Choroba	Białko kodowane przez wprowadzany gen	Typ modyfikowanych komórek
Ostry złożony zespół niedoboru odporności — ADA	Dezaminaza adozynowa	Limfocyty T obwodowe i ich komórki prekursorowe
Mukowiscydoza	CFTR	Nabłonek dróg oddechowych
Rodzinna hipercholesterolemia	Receptor LDL	Hepatocyty
Hemofilia A	Czynnik VII	Płytki krwi
Hemofilia B	Czynnik IX	Fibroblasty skóry
Fenyloketonuria	Hydroksylaza fenyloalaninowa	Hepatocyty
Choroba Gauchera	Glukocerebrozydaza	Makrofagi, komórki prekursorowe krwi
Adrenoleukodystrofia	ALDP	Komórki prekursorowe krwi
Anemia złośliwa	$\beta$ -globina	Eryocyty
Dystrofia Duchenne'a	Dystrofina	Mioblasty
Zespół Lesch-Nyhana	Fosforybozylotransferaza hipoksantynowa	Komórki zwojów podstawnych
Przewlekła choroba ziarniniakowa	Białko cytochromu b	Neutrofile

wyeliminować konieczność powtarzania terapii istniejącą przy modyfikowaniu komórek obwodowych [39].

Należy podkreślić, że wszystkie dotychczas prowadzone próby kliniczne leczenia chorób dziedzicznych (także, co jest właściwie oczywiste AIDS i nowotworów) — to somatyczna terapia genowa (modyfikuje się komórki somatyczne). Teoretycznie możliwe są także manipulacje dokonywane na komórkach generatywnych, czy we wczesnych stadiach rozwoju zarodka. Nie przeprowadza się ich ze względu na trudności metodyczne, wątpliwe znaczenie praktyczne i silne opory etyczne [40]. Z podobnych powodów pomijam ich dokładniejszy opis w niniejszym artykule.

### III-3. Nabyty zespół niedoboru odporności — AIDS

Wydaje się, że terapia genowa AIDS napotyka na tę samą trudność, co próby opracowania skutecznych chemioterapeutyków. Tym problemem jest szybkie powstawanie opornych odmian wirusa HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) w wyniku jego dużej niestabilności genetycznej. Skuteczną terapię mogłoby prawdopodobnie zapewnić dopiero połączenie kilku metod.

Na podstawie badań *in vitro* zaproponowano następujące strategie terapii genowej infekcji wywołanej wirusem HIV:

#### a) Kompetycyjne sensowne RNA

1. „Pułapki RNA” (ang. *RNA decoys*) — replikacja wirusa HIV jest możliwa w obecności dwóch białek Tat i Rev (stymulują one transkrypcję i transport syntetyzowanego RNA z jądra do cytoplazmy). Sekwencje wiążące Tat i Rev to odpowiednio TAR i RRE. Sensowne RNA zawierające wielokrotnie powtórzone sekwencje TAR albo RRE, poprzez kompetycyjne wiązanie w/w białek, są w stanie hamować replikację wirusa [41].

2. Sensowne RNA z sygnałem pakowania — w badaniach *in vitro* wykazywały silniejszy efekt przeciwwirusowy niż „pułapki RNA” [42]. W trakcie formowania się wirionów o interakcji genomowego RNA wirusa z białkami rdzenia decyduje specyficzna sekwencja zwana sygnałem pakowania. Obecność „fałszywych” genomowych RNA z sygnałem pakowania owocuje produkcją defektywnych wirionów.

b) Strategie antysensu — w związku z cyklem życiowym wirusa HIV atrakcyjnym celem antysensownych oligonukleotydów są sekwencje TAR i RRE (przyłączanie Tat i Rev do transkryptów stymuluje ich transport z jądra do cytoplazmy). Z kolei rybozomy mogłyby nie tylko unieczynniać produkty ekspresji prowirusa, ale także niszczyć wprowadzane w trakcie infekcji genomowe RNA (zapobiegając syntezie DNA, a poprzez to powstawaniu prowirusa) [43].

c) Produkcja wewnątrzkomórkowych przeciwwirusowych białek.

1. Wyróżniono grupę białek zwanych mutantami transdominującymi (ang. *transdominant mutant*). Od-

krywano je w trakcie badań nad szczepami wirusa, które utraciły „zjadliwość”. Przykład to Rev10M — zmutowana forma białka Rev, zdolna wiązać się z sekwencją RRE, ale niespełniająca roli regulatorowej i transportowej [45].

2. Wewnątrzkomórkowe mono-łańcuchowe przeciwciała (*intracellular single-chain antibodies* — Sfv). Sfv specyficzny dla gp160 (glikoproteina otoczki wirusa odpowiedzialna za interakcję z receptorem CD4) poprzez łączenie się z gp160 powoduje jego uwięzienie wewnątrz retikulum endoplazmatycznego i w efekcie produkcję wirionów nieinfekcyjnych. Z kolei Sfv specyficzny dla Rev uniemożliwia jego migrację z cytoplazmy do jądra (z miejsca syntezy do miejsca aktywności), hamując w ten sposób replikację wirusa [46].

d) Eliminacja zainfekowanych komórek. Dokonuje się poprzez dostarczenie „genu samobójczego” pod kontrolą wirusowego promotora (ekspresja tylko w komórkach zainfekowanych gdzie występują białka Tat i Rev) [47].

e) Szczepionki genetyczne. Układ immunologiczny jest w stanie walczyć z infekcją wirusem HIV. Najważniejszą rolę zdają się tu grać limfocyty CD8 cytotoksyczne i odpowiedź humoralna. Wprowadzenie do pewnej grupy komórek genów białek wirusowych, z następczą ich ekspresją i prezentacją antygenów na powierzchni komórek za pomocą (MHC I-odpowiedź komórkowa) lub MHC II (odpowiedź humoralna), może zwiększać siłę reakcji immunologicznej [48].

Niektóre z w/w strategii już dziś testuje się w próbach klinicznych I i II fazy. Przykłady podane są w tabeli 2.

### IV. Uwagi końcowe

Niezwykle mało pisze się dzisiaj o skuteczności testowanych klinicznie programów terapii genowej. Wiadomo o dwóch przypadkach długotrwałej skutecznej kuracji ostrego złożonego zespołu niedoboru odporności. Był jeden pacjent z rodzinną hipercholesteronią, u którego miał miejsce znaczący spadek

**Tabela 2.**

Niektóre z prowadzonych w USA prób klinicznych terapii genowej AIDS

Ośrodek	Opis programu
Viagene	Wszczepienie zmodyfikowanych <i>ex vivo</i> fibroblastów (wektor retrowirusowy niosący geny env i rev)
Viagene	Iniekcja retrowirusowego wektora niosącego geny env i rev
Univ. of Michigan	Wszczepienie zmodyfikowanych <i>ex vivo</i> autologicznych limfocytów CD4 (gen rev M10)
Univ. of California	Jak wyżej, ale wprowadzony gen koduje rybozym

poziomu cholesterolu we krwi. Zaobserwowano kilkanaście remisji u osób z nowotworami [2]. Jednak nawet i te wyniki obciążone są wątpliwościami interpretacyjnymi [49] i niepewnością co do długoterminowych skutków terapii. Stawia to pod znakiem zapytania celowość olbrzymich nakładów pracy i pieniędzy: liczne ośrodki prowadzące badania, dwa czasopisma tematyczne: *Gene Therapy* i *Human Gene Therapy*, inwestycje prywatnych firm biotechnologicznych [50] kierowanych na rozwój terapii genowej. Wspomniany stan dezinformacji można jednak po części wytłumaczyć niechęcią do ujawniania wyników badań w miarę zbliżania się do ich komercyjnego wdrożenia.

Uzasadnieniem entuzjazmu wokół terapii genowej mogą być olbrzymie teoretyczne możliwości jej zastosowań (choć w chwili obecnej jej przydatność w praktyce leczniczej jest bardzo nikła). Korekcja nieprawidłowego fenotypu rozwijającego się w przebiegu chorób dziedzicznych to w rzeczywistości tylko niewielka ich część. Transfer genów może być prawdopodobnie użyteczny w większości chorób człowieka. Chodzi tu bowiem nie tylko o przywracaniu normalnych funkcji komórek, ale także nadawanie im zupełnie nowych właściwości (np. oporności na infekcję wirusową), znakowanie, a także selektywne niszczenie.

Artykuł otrzymano 25 maja 1995 r.  
Zaakceptowano do druku 28 sierpnia 1995 r.

## Piśmiennictwo

- Gavaghan H (1995) *Nature* (Lond) **374**: 393
- Anderson WF (1994) *Hum Gene Ther* **5**: 1431-1432
- Editorial (1995) *Lancet* **11**: 739-740
- Górny A, Wiznerowicz M, Mackiewicz A (1995) *Biotechnologia* **1**: 74-89
- Miller N, Vile R (1995) *FASEB J* **2**: 190-199
- Brenner MK (1995) *J Internal Medicine* **237**: 229-239
- Seibel P, Trappe J, Villani G, Klopstock T, Papa S, Reichmann H (1995) *Nucleic Acids Research* **1**: 10-17
- Samons B, Gunzburg WH (1993) *Human Gene Ther* **4**: 129-141
- Bridges SH, Sarver N (1995) *Lancet* **6**: 427-432
- Engelhardt JF, Yang Y, Straford-Perricaudet LD, Allen ED, Kozarsky K (1993) *Nat Genet* **4**: 27-34
- Le Gal La Salle G, Robert JJ, Berrard S, Ridoux V, Straford-Perricaudet LD (1993) *Science* **259**: 988-990
- Weizman MD, Kyostio SRM, Kotin RM, Owens RA (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5808-5812
- Michael SI, Curiel DT (1994) *Gene Ther* **1**: 223-232
- Huber B, Richards CA, Krenitsky TA (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8039-8043
- Vile RG, Hart IR (1993) *Cancer Res* **53**: 3860-3864
- Deonarian MP, Spooner RA, Epenetos AA (1995) *Gene Ther* **2**: 235-244
- Capechi MR (1994) *Świat nauki* **5**: 36-43
- Bal J (1994) *Post Biochem* **2**: 86-91
- Moolten F, Wells J (1990) *J Natl Cancer Inst* **82**: 297-300
- Field A, Davies M, Devitt C (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 4139-4143
- Moolten FM (1986) *Cancer Res* **46**: 5276-5281
- Mullen CA, Kilstrup M, Blaese RM (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 33-37
- Huber BE, Austin EA, Good SS, Knick VC, Tibbels S, Richards CA (1993) *Cancer Res* **53**: 4619-4626
- Huber BE, Richards CA, Krenitsky TA (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8039-8044
- Vile RG, Nelson JA, Castleden S, Chong H, Hart JR (1994) *Cancer Res* **54**: 6228-6234
- Barba D, Hardin J, Sadelain M, Gage FH (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 4348-4352
- Mullen CA, Coale MM, Lowe R (1994) *Cancer Res* **54**: 1503-1506
- Chen L, Waxman DJ (1995) *Cancer Res* **55**: 581-589
- Berbec H (1994) *Post Biochem* **1**: 6-10
- Stec WJ (1994) *Biotechnologia* **4**: 5-15
- Sikora E (1993) *Post Biochem* **4**: 212-220
- Harłodzińska-Szmyrka A (1995) *Post Biochem* **1**: 7-14
- Yamada G, Kitamura Y, Sonoda H, Taki S, Mulligan RC (1993) *EMBO J* **12**: 2705-2709
- Nabel GJ, Nabel EG, Yang Y, Fox BA, Plautz GE, Gao X (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90** (23): 11307-11311
- Chen L, Ahe S, Brady WA, Hellstrom I, Hellstrom KE, Ledbetter JA (1992) *Cell* **71**: 1093-1102
- Salmon SE, Datton WS, Grogan TM, Plezia P, Lehnert M, Roe DJ (1991) *Blood* **78**: 44
- Levin L, Simon R (1993) *J Natl Cancer Inst* **85**: 1732
- Golde WD (1992) *Świat nauki* **2**: 38-46
- Hughes PFD, Thacker JD, Hogge D, Sutherland HJ, Thomas TE, Landsdorp PM (1992) *J Clin Invest* **89**: 1817-1824
- Hamilton M (1994) *Hum Gene Ther* **12**: 1433-1437
- Sullenger BA, Gallardo HF, Ungers GE, Gilboa E (1991) *J Virol* **65**: 6811-6816
- Berkhout B, Jeroen Lb van Wamel (1995) *Antiviral Research* **26**: 101-115
- Rossi JJ, Sarver N (1992) *Adv Exp Med Biol* **312**: 95-109
- Nabel GJ, Fox BA, Post L (1994) *Hum Gene Ther* **5**: 79-92
- Marasco WA, Haseltine WA, Chen SY (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7889-7893
- Duan L, Bagasra O, Laughlin MA (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5075-5079
- Brady HJM, Miles CG, Pennington DJ, Dziezick EA (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 365-369
- Irwin MJ, Laube LS, Lee V (1994) *J Virol* **68**: 5036-5044
- Grossman M, Raper SE (1994) *Nat Genet* **6**: 335-341
- Swinbanks D (1995) *Nature* (Lond) **374**: 394

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.

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

# Markery molekularne w genetyce i hodowli roślin

## Molecular markers in plant genetics and plant breeding

WALDEMAR MARCZEWSKI\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Metoda RFLP
- III. Metody MAAP
- IV. Porównanie metod RFLP i RAPD
- V. Konwersja dominujących loci RAPD na markery kodo-  
minujące
- VI. Metoda SRFA
- VII. Mikrosatelitarne markery DNA
- VIII. Metody AS-PCR i SSCP
- IX. Metoda YAC
- X. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** PCR — *polymerase chain reaction*, łańcuchowa reakcja polimerazy; RFLP — *restriction fragment length polymorphism*; QTL — *quantitative trait loci*; MAAP — *multiple arbitrary amplicon profiling*; DAF — *DNA amplification fingerprinting*; RAPD — *random amplified polymorphic DNA*; AP-PCR — *arbitrarily primed PCR*; BSA — *bulked segregant analysis*; AFLP — *amplification (amplified) fragment length polymorphism*; SRFA — *selective restriction fragment amplification*; ARF — *amplified restriction fragment*; DGGE — *denaturing gradient gel electrophoresis*; SCAR — *sequence-characterized amplified region*; STS — *sequence tagged site*; STAR — *sequence-tagged amplified region*; CAPS — *cleaved amplified polymorphic sequence*; SSR — *simple sequence repeat*; AS-PCR — *allele-specific PCR*; SSCP — *single-strand conformational polymorphism*; YAC — *yeast artificial chromosome*, sztuczny chromosom drożdżowy; kb — tysiąc par zasad; nt — nukleotyd.

### I. Wstęp

Wykorzystanie markerów molekularnych w badaniach genetycznych roślin zostało zapoczątkowane wraz z odkryciem izoenzymów. Ekspresja markerów izoenzymowych, w przeciwieństwie do markerów morfologicznych i cytologicznych, jest niezależna od fenotypu rośliny, warunków środowiskowych oraz nie jest związana z występowaniem zjawiska epistazy [1-3]. Jednak niewielka liczba znanych loci markerów izoenzymowych stanowi przeszkodę w ich szerszym wykorzystaniu [1, 4, 5]. Dopiero wprowadzenie metod wykorzystujących markery DNA doprowadziło do przełomu w badaniach genetycznych roślin.

Można wyróżnić trzy podstawowe rodzaje markerów DNA:

### Contents:

- I. Introduction
- II. RFLP method
- III. MAAP methods
- IV. Comparison of RFLP and RAPD methods
- V. Conversion of dominant RAPD loci into codominant markers
- VI. SRFA method
- VII. Microsatellites
- VIII. AS-PCR and SSCP methods
- IX. YAC method
- X. Concluding remarks

- 1 — markery będące fragmentami DNA, powstałymi w wyniku trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi
- 2 — markery wykorzystujące łańcuchową reakcję polimerazy (*polymerase chain reaction* — PCR)
- 3 — markery będące powtarzającymi się sekwencjami genomu.

Celem tego artykułu jest przedstawienie metod badawczych wykorzystujących markery DNA, które znalazły zastosowanie w mapowaniu genomu roślinnego.

### II. Metoda RFLP

Metoda RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) została opracowana w 1974 r. [6]. Jej schemat przedstawiono w tabeli 1. Wyizolowany genomowy lub organelowy DNA jest poddany trawieniu jednym

**Tabela 1.**

Schemat procedur stosowanych w metodach RFLP i MAAP.

RFLP		MAAP
Izolacja DNA		
Trawienie enzymami restrykcyjnymi		PCR
Elektroforeza na żelu agarozowym		Elektroforeza na żelu agarozowym lub poliakrylamidowym
Hybrydyzacja DNA typu „Southern”		
Znakowanie sond i hybrydyzacja: nieradioaktywna      radioaktywna		Detekcja optyczna lub autoradiografia
Detekcja optyczna, luminoscencyjna lub fluorescencyjna	Autoradiografia	

\* Dr, Zakład Genetyki i Syntezy Materiałów Wyjściowych, Instytut Ziemiaka, Młochów, 05-832 Rozalin

lub kilkoma enzymami restrykcyjnymi. W wyniku działania każdego enzymu restrykcyjnego powstaje duża liczba (rzędu  $10^6$ ) różnej długości fragmentów DNA [7-9], które są rozdzielane metodą elektroforezy na żelu agarozowym, a następnie „przenoszone” na filtr nylonowy. Hybrydyzacja tak przygotowanych filtrów ze specyficznymi sondami molekularnymi jest kluczowym etapem metody RFLP. Sondy molekularne hybrydują do określonych fragmentów chromosomów co umożliwia identyfikację pojedynczych fragmentów restrykcyjnych DNA. Identyfikacja hybrydujących fragmentów DNA odbywa się metodą autoradiografii [10, 11], bądź metodami nieradioaktywnymi [12, 13]. Odzwierciedleniem zróżnicowania genetycznego (polimorfizmu) badanych genotypów jest występowanie różnego spektrum identyfikowanych fragmentów restrykcyjnych. Istotą metody RFLP jest „wyszukanie” takich fragmentów restrykcyjnych (markerów RFLP), które są wyróżnikiem badanej cechy.

Polimorfizm może wynikać zarówno z pojedynczych zmian zasad, jak i zmian obejmujących większe fragmenty DNA, co zostało schematycznie przedstawione na rycinie 1. Genotypy A i B charakteryzują się różną długością homozygotycznych fragmentów DNA między identycznymi miejscami restrykcyjnymi (Ryc. 1A, B). Natomiast genotyp C jest heterozygotą względem badanego locus, co wyraża się występowaniem odmiennych miejsc restrykcyjnych dla obu alleli (Ryc. 1C).

Wykorzystanie metody RFLP w badaniach genetycznych organizmów eukariotycznych datuje się od początku lat 80. Zastosowano ją do mapowania genomu człowieka [15, 16] a także w wielu działach genetyki i hodowli zwierząt i roślin [1, 5, 17]. W oparciu o markery RFLP powstały mapy genetyczne dla wielu gatunków roślin [1, 18, 19]. Metodę RFLP zastosowano do mapowania genów odpowiedzialnych za odporność dzikich i uprawnych gatunków roślin na zakażenia różnymi patogenami [20]. Stała się ona przydatna do identyfikacji cech determinowanych przez pojedyncze geny, a także do analizy cech dziedzic-

nych poligenicznie (tzw. QTL — *quantitative trait loci*) [1, 4, 21, 22]. Metoda RFLP znalazła również zastosowanie w badaniach filogenetycznych i taksonomicznych roślin [23-25].

### III. Metody MAAP

Termin MAAP (*multiple arbitrary amplicon profiling*) [26] odnosi się do trzech metod wykorzystujących technikę PCR. Są to:

DAF — *DNA amplification fingerprinting* [28]

RAPD — *random amplified polymorphic DNA* [29]

AP-PCR — *arbitrarily primed PCR* [30]

Technika PCR jest najczęściej stosowanym systemem powielania (amplifikacji) kwasów nukleinowych *in vitro* [31]. Polega ona na hybrydyzacji starterów (*primers*) do końców 3' identyfikowanej sekwencji na obu niciach DNA i amplifikacji tego fragmentu przy pomocy termostabilnej polimerazy DNA. Synteza nowej nici odbywa się więc od końca 3'-OH każdego startera. Po termicznej denaturacji proces ten jest powtarzany nawet kilkadziesiąt razy [31, 32].

Wyróżnia się dwa rodzaje starterów:

- specyficzne, wykorzystywane jako startery do amplifikacji określonych alleli [33], sekwencji minisatelitarnych i mikrosatelitarnych [34, 35]. Zagadnienia te są omówione w dalszej części artykułu.
- dowolne (*arbitrary*), które są wykorzystywane w metodach MAAP. Są to kilkunastonukleotydowe sekwencje DNA, o 50-80% składzie zasad G i C, które wyznaczają amplifikację od kilku do kilkadziesiąt różnych fragmentów genomu [36].

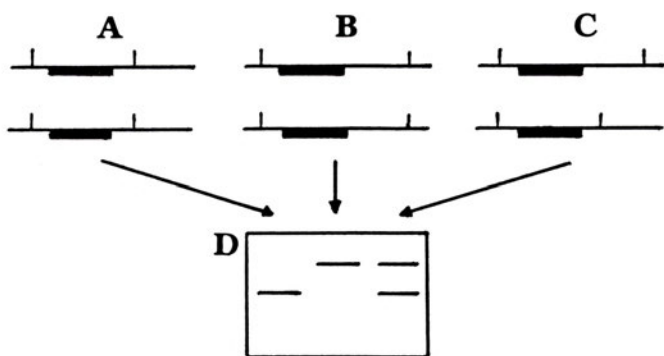
Produkty amplifikacji DNA techniką PCR są identyfikowane elektroforetycznie (Tab. 1). W tabeli 2 przedstawiono różnice występujące między kluczowymi parametrami metod DAF, RAPD i AP-PCR.

**Tabela 2.**

Podstawowa charakterystyka metod DAF, AP-PCR i RAPD.

Cecha	DAF	AP-PCR	RAPD
Długość startera (nt)	5-15	18-32	9-10
Stężenie startera ( $\mu\text{M}$ )	3-30	1-10	0.3
Stężenie DNA ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ )	0.01-1	0.1-5	1
Temperatura wiązania startera ( $^{\circ}\text{C}$ )	30-70	35-50	35-42
Zel rozdzielający	poliakrylamid		agaroza
Identyfikacja	srebro	autoradiografia	bromek etydyny

Opracowano na podst. [28, 36, 55].



**Ryc. 1** Schemat ilustrujący trawienie enzymem restrykcyjnym DNA z trzech roślin diploidalnych (A, B, C) oraz autoradiogram identyfikujący produkty trawienia (D).

Opracowano na podst. [7,17].

Kreskami pionowymi zaznaczono miejsca trawienia DNA endonukleazą. Pogrubioną kreską zaznaczono miejsce wiązania sondy do DNA.

Metody MAAP znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach biologii molekularnej, szczególnie w badaniach roślin, do mapowania genomów [36-38]. Źródłem polimorfizmu, na którym opiera się mapowanie są:

- zmiany nukleotydowej sekwencji w obrębie miejsca



przyłączania startera do matrycy DNA, co może prowadzić do eliminacji lub utworzenia nowego miejsca hybrydizacji startera do DNA

- zmiany w długości amplifikowanego segmentu DNA
- zmiany konformacyjne DNA powodujące zróżnicowanie efektywności hybrydizacji startera lub procesu amplifikacji [28, 39-42].

Bardzo istotnym etapem mapowania genomu metodami MAAP jest odpowiednie przygotowanie badanej populacji roślin. Poniżej wyszczególniono trzy metody umożliwiające wyodrębnienie genowego regionu zawierającego badaną cechę.

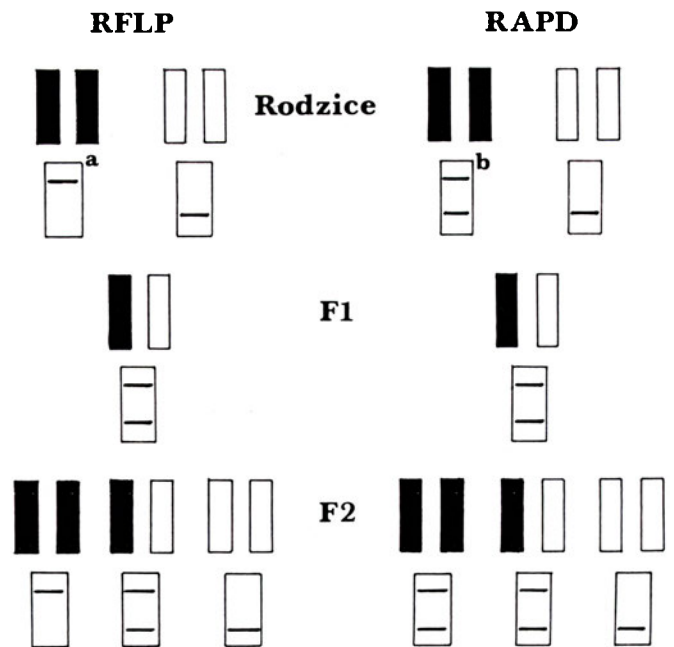
Pierwszą jest metoda linii izogenicznych (*near-isogenic lines*), która umożliwia uzyskanie, przez serię krzyżowań wstecznych (*backcross*), linii genetycznych cechujących się obecnością fragmentu DNA z genem kodującym pożądaną cechę [18, 43, 44]. Metoda ta została zastosowana w badaniach wielu gatunków roślin, do identyfikacji regionów zawierających geny odporności [14] a także geny warunkujące występowanie różnych cech fenotypowych [43]. Niekorzystną cechą metody linii izogenicznych jest konieczność wykonywania wielu krzyżowań wstecznych, co wydłuża okres przygotowywania materiału roślinnego do kilku lat [14, 45].

Druga metoda nazywana BSA (*bulked segregant analysis*) jest zdecydowanie szybsza [46]. Z badanej populacji wybiera się 15-20 roślin charakteryzujących się obecnością analizowanej cechy oraz tak samo liczną grupę roślin nie posiadających danej cechy. Wyizolowane DNA z indywidualnych roślin jest łączone zgodnie z podziałem badanej populacji na dwie grupy. Badanie polimorfizmu między wyodrębnionymi pulami DNA polega na szukaniu startera PCR (markera RAPD) występującego tylko w grupie roślin mających badaną cechę. Metodę BSA zastosowano do identyfikacji loci sprzężonych z genami odporności [14].

W trzecim podejściu, zaproponowanym przez Gio v a n n o n i i w s p. [47], wykorzystano metody RFLP i RAPD. Są to najczęściej stosowane metody mapowania genomu roślinnego [48]. W metodzie tej mapa markerów RFLP jest wykorzystywana do wyodrębnienia dwóch grup roślin. Wyróżnikiem takiego podziału nie jest cecha fenotypowa jak w klasycznej metodzie BSA, a są nim dwa markery RFLP. Badanie polimorfizmu polega na szukaniu markera RAPD odróżniającego te dwie grupy roślin. Jednym z zastosowań tej metody jest „uzupełnianie luk” występujących w mapach markerów RFLP [47].

#### IV. Porównanie metod RFLP i RAPD

Zaletą markerów RFLP jest kodominujący charakter, co oznacza, że heterozygotę można odróżnić od homozygoty. Natomiast markery RAPD są dominujące. Oznacza to, że nie można ustalić, czy amplifikowany fragment DNA występuje w obu allelach, czy tylko



Ryc. 2 Schemat ilustrujący kodominujący charakter markerów RFLP i dominujący markerów RAPD.  
a — identyfikacja prążków na filtrze nylonowym w metodzie RFLP  
b — identyfikacja prążków na żelu agarozowym w metodzie RAPD

w jednym allelu [36, 45, 49]. Na rycinie 2 przedstawiono schemat gdzie w przypadku metody RFLP w pokoleniu F2 wyróżnikiem heterozygoty jest obecność dwóch prążków hybrydacyjnych. Natomiast w przypadku metody RAPD obraz elektroforetyczny produktów amplifikacji jest taki sam dla homozygoty dominującej i heterozygoty. Jest to zasadnicza różnica między metodami RFLP i RAPD.

Sondy molekularne stosowane w metodzie RFLP z reguły zawierają sekwencje homologiczne do pojedynczych kopii badanego DNA, co umożliwia uzyskanie informacji o jednym genetycznym locus. Natomiast każdy starter użyty w metodzie RAPD zapoczątkowuje reakcję amplifikacji wielu loci genomu [14, 49]

Badanie polimorfizmu metodą RAPD nie wymaga wstępnej informacji o sekwencji analizowanego DNA [41]. Metoda RAPD jest również mniej pracochłonna i zdecydowanie szybsza, niż RFLP [41, 45, 48, 50].

#### V. Konwersja dominujących loci RAPD na markery kodominujące

W celu rozróżnienia homozygotycznego i heterozygotycznego charakteru markerów RAPD można zastosować krzyżowania wsobne (*recombinant inbred*) i wsteczne badanej populacji. Procedury te są jednak czasochłonne [14].

Mało skuteczne wydaje się też technika densytometrycznego pomiaru na żelu intensywności prążków RAPD [32].

Zawodne jest także zastosowanie w metodzie RFLP sond molekularnych, otrzymanych przez klonowanie produktów amplifikacji uzyskanych przy użyciu star-

terów RAPD [14, 32].

Innymi utrudnieniami są wielość amplifikowanych loci i wrażliwość na zmiany warunków amplifikacji w metodzie RAPD [14, 51].

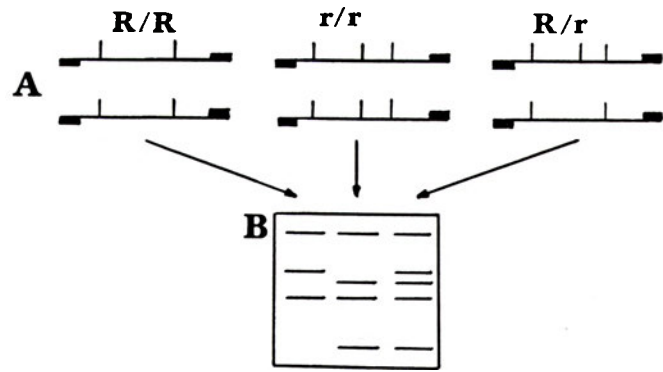
Jednym ze skutecznych sposobów umożliwiających rozróżnienie homozygotycznych i heterozygotycznych markerów RAPD jest metoda DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*). W tej metodzie wykorzystywane jest zjawisko odmiennej podatności na termiczną denaturację alleli tworzących locus heterozygotyczny, czego efektem jest ich zróżnicowana migracja w żelu zawierającym wzrastający gradient związku denaturującego [36, 49, 52].

W drugiej metodzie, nazwanej SCAR (*sequence-characterized amplified region*) [14, 42], oba końce fragmentów DNA, będących produktami amplifikacji ze starterów RAPD, są sekwencjonowane. Na podstawie ustalonych sekwencji syntetyzowane są specyficzne pary starterów, zawierające 10 oryginalnych nukleotydów starterów RAPD oraz 14 kolejnych nukleotydów z każdego końca amplifikowanego fragmentu DNA. Zastosowanie takich starterów — markerów SCAR — do ponownej amplifikacji DNA pozwala ustalić dominujący lub kodominujący charakter wyjściowego markera RAPD. Metoda SCAR jest podobna do metody STS (*sequence tagged site*), zastosowanej do badania genomu człowieka [53]. Być może dlatego dla metody STS zaproponowano nazwę STAR (*sequence-tagged amplified region*) [49].

Trzecia technika, określana terminem CAPS (*cleaved amplified polymorphic sequence*) [49, 54], polega na amplifikacji metodą RAPD fragmentów DNA, które są następnie poddane trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Elektroforetyczna analiza produktów tego trawienia pozwala na identyfikację różnic między allelami. Schemat tej metody przedstawiono na rycinie 3. Występowanie miejsca restrykcyjnego tylko w jednym allelu heterozygoty R/r prowadzi do powstania większej liczby prążków na żelu (Ryc. 3B), (prążki odpowiadają sumie fragmentów restrykcyjnych charakterystycznych dla homozygot R/R i r/r).

## VI. Metoda SRFA

Metoda SRFA (*selective restriction fragment amplification*) została opatentowana w 1993 r. przez firmę biotechnologiczną KEYGENE N.V. w Holandii [56]. Polega ona na amplifikacji techniką PCR fragmentów DNA otrzymanych po trawieniu co najmniej jednym enzymem restrykcyjnym. Nowością tej metody jest konstrukcja miejsca rozpoznawanego przez specyficzne startery oraz samego startera. Do fragmentu restrykcyjnego dołączone są krótkie, 10-30 nukleotydo- we, sekwencje DNA nazywane adaptorami, które razem z sekwencjami rozpoznawanymi przez endonukleazy, stanowią część stałą, do której przyłączają się startery. Sekwencja nukleotydowa starterów odpowiada sekwencji części stałej (adaptor plus miejsce restryk-

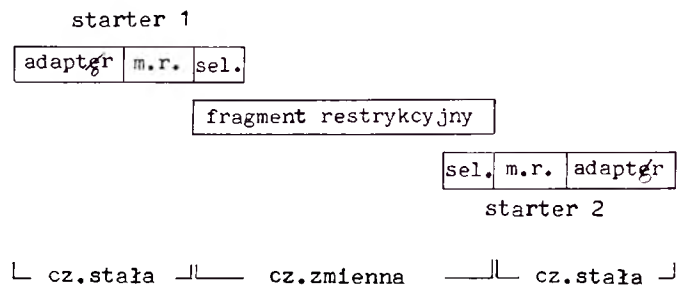


Ryc. 3 Schemat ilustrujący sposób rozróżnienia homozygoty (R/R i r/r) od heterozygoty (R/r) przy zastosowaniu metody CAPS. Opracowano na podst. [54].

(A) Kreskami pionowymi zaznaczono miejsca trawienia enzymem restrykcyjnym. Pogrubiona kreska oznacza miejsce wiązania startera. (B) Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji.

cyjne) i jest uzupełniona o część selekcyjną. Część selekcyjna jest elementem różnicującym startery i składa się z 1 do 4 nukleotydów, które rozpoznają końce fragmentów restrykcyjnych zgodnie z formułą  $4^{2n}$ , gdzie n jest liczbą zasad selekcyjnych. Gdy różnica między częścią selekcyjną a końcem fragmentu restrykcyjnego dotyczy tylko jednej zasady, to zgodnie z powyższą formułą 1 z 16 restrykcyjnych fragmentów DNA będzie amplifikowany. Gdy różnica ta obejmuje 2, 3 lub 4 zasady, to odpowiednio jeden z 256, 4096 lub 65536 fragmentów DNA zostanie powielony. W metodzie SRFA uwzględnione są nie tylko różnice w trawieniu DNA enzymami restrykcyjnymi (jak w metodzie RFLP), ale także różnice w sekwencji przyległych do miejsca trawienia zasad, które są rozpoznawane przez startery selekcyjne. Schemat tworzonego w tej metodzie układu starter — amplifikowany fragment restrykcyjny przedstawiono na rycinie 4.

Pierwsze doniesienia o zastosowaniu metody SFRA ukazały się w formie streszczeń i dotyczą mapowania genomu petunii (*Petunia hybrida*) [57] oraz genu R1, warunkującego odporność na *Phytophthora infestans*, w ziemniaku (*Solanum tuberosum*) [58]. Pierwsze publikacje dotyczące wykorzystania metody SRFA w badaniach genetycznych ziemniaka powinny się ukazać jeszcze w tym roku (Dr C. Gebhardt, Max-



Ryc. 4 Schemat ilustrujący konstrukcję starterów stosowanych w metodzie SRFA. Opracowano na podst. [56]. Oznaczenia: m.r. — sekwencja startera komplementarna do miejsca restrykcyjnego rozpoznawanego przez endonukleazy; sel. — część selekcyjna;

-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Kolonia, informacja ustna).

Ostatnie zagadnienie w tej części artykułu dotyczy rozbieżności stosowania terminu AFLP. Termin AFLP, będący skrótem nazwy *amplification fragment length polymorphism*, wprowadzili Caetano-A-nolles i wsp. [28] przez analogię do terminu RFLP. Odnosi się on do polimorfizmu fragmentów DNA amplifikowanych przy zastosowaniu metody DAF. Inni autorzy [55] skrót AFLP tłumaczą jako *amplified fragment length polymorphism*.

Autorzy metody SRFA [56] do określenia tej metody stosują również termin AFLP. W tym przypadku skrót ten odnosi się do polimorfizmu między produktami amplifikacji fragmentów restrykcyjnych (*amplified restriction fragment – ARF*).

## VII. Mikrosatelitarne markery DNA

Mikrosatelitarne markery DNA (*microsatellites*) [59] określa się również terminami: SSR (*simple sequence repeat*) [60], *short tandem repeat* [61] oraz STMS (*sequence tagged microsatellite sites*) [62]. Są to dwu- i trójnukleotydowe, powtarzające się jednostki sekwencyjne DNA, których liczba zmienia się od kilku do kilkudziesięciu [63-65]. Czteronukleotydowe sekwencje mikrosatelitarne zidentyfikowano w pomidorze (*Lycopersicon esculentum*) za pomocą sondy (GATA)<sub>4</sub> [66].

W badaniu polimorfizmu wykorzystuje się specyficzne startery komplementarne do fragmentów DNA otaczających sekwencje mikrosatelitarne. Źródłem polimorfizmu jest różna długość amplifikowanych fragmentów DNA, wynikająca z różnej liczby powtarzających się jednostek [62, 63]. Identyfikowane markery mikrosatelitarne mają kodominujący charakter [49, 64]. Znalazły one zastosowanie w badaniach wielu roślin [63-65, 67].

Sekwencji mikrosatelitarnych nie należy mylić z sekwencjami minisatelitarnymi (*minisatellites*), które są również powtarzającymi się fragmentami DNA o długości 11-60 par zasad, wykorzystywanymi szczególnie w badaniach genomu człowieka [63].

## VIII. Metody AS-PCR i SSCP

Istnieje wiele wariantów metody AS-PCR (*allele-specific PCR*) [53]. W podstawowej wersji [33] metoda AS-PCR polega na amplifikacji fragmentów DNA za pomocą trzech specyficznych starterów:

- S1 — specyficzny dla jednego allelu
- S2 — specyficzny dla drugiego allelu
- S3 — specyficzny dla obu alleli.

Dopasowanie starterów S1 i S3 do allelu 1 prowadzi do powielania tego fragmentu DNA. Mutacja allelu 2 występująca w miejscu rozpoznawanym przez starter S1 blokuje reakcję amplifikacji (Ryc. 5). W przypadku zastosowania startera S2 zamiast S1 sytuacja będzie odwrotna. Istnieje możliwość wyznakowania starte-

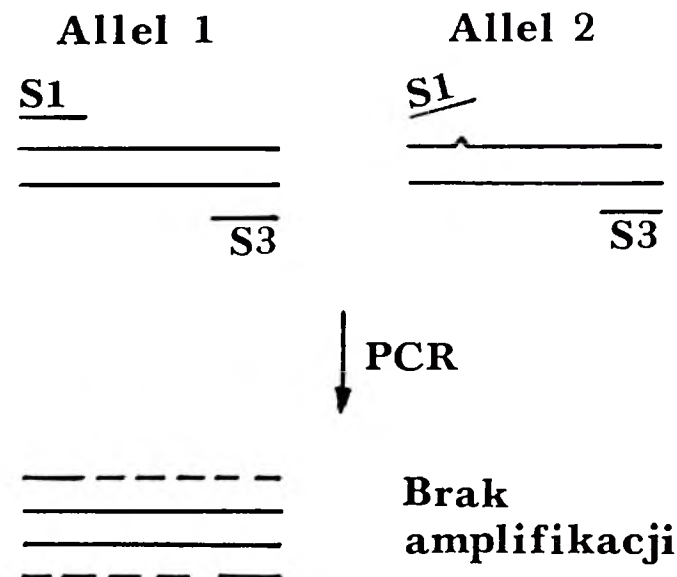
rów na końcach 5' różnymi znacznikami, np. starter S1 biotyną, a starter S2 barwnikiem fluorescencyjnym. Stwarza to możliwość identyfikacji obu alleli jednocześnie. Stosuje się w tym celu chromatografię na kolumnie agarozowej z dołączoną streptoawidyną (dla wyróżnienia S1) i badanie fluorescencji (dla wyróżnienia S2).

Metodą AS-PCR wykorzystano do mapowania genomu ryżu (*Oryza sativa*), stosując ją razem z metodami: RFLP i RAPD [69, 70], a także SSCP [70]. Wykryto dzięki temu polimorfizm spowodowany zmianą jednego tylko nukleotydu.

W metodzie SSCP (*single-strand conformational polymorphism*) wykorzystywany jest fakt odmiennej konformacji denturowanych fragmentów DNA, które są identyfikowane elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym [42, 49, 68].

## IX. Metoda YAC

Do mapowania genomu stosuje się różne typy wektorów [14]. Jednym z nich jest sztuczny chromosom drożdżowy (*yeast artificial chromosome – YAC*) [71]. Podstawową zaletą YAC jest możliwość klonowania bardzo dużych fragmentów DNA, od 150 kb do 1600 kb [14, 72, 73], co jest istotne w metodzie zwanej „spacerowaniem po chromosomie” (*chromosome walking*) [14, 72, 74, 75]. Jest to jednak technika skomplikowana, a zatem dostępna dla nielicznych laboratoriów [73]. Metoda YAC polega na częściowym trawieniu wyizolowanego DNA enzymem restrykcyjnym, eliminacji frakcji zawierającej małe fragmenty DNA, przyłączeniu dużych fragmentów do ramion wektora YAC i wprowadzeniu ich do drożdży za pomocą techniki transformacji. Cechą wektora jest posiadanie sekwencji spełniających funkcje centromeru i telomeru, co zapewnia replikację sztucznego chromosomu



Ryc. 5 Schemat ilustrujący identyfikację alleli za pomocą specyficznych starterów w metodzie AS-PCR. Opracowano na podst. [33].

[14, 72]. Metodę YAC zastosowano do mapowania genomu soi [76] i buraka (*Beta vulgaris*) [77].

## X. Uwagi końcowe

Mapy genetyczne opracowane za pomocą metody RFLP są uzupełniane o inne markery. Jest to związane z tworzeniem tzw. gęstych map chromosomowych [78]. Przykładowo, mapa genetyczna *Arabidopsis thaliana* obejmuje markery RFLP, RAPD, CAPS, YAC oraz markery morfologiczne i mikrosatelitarne [54, 79], natomiast mapa *Pisum sativum* składa się z markerów RFLP, RAPD, morfologicznych, izoenzymowych i mikrosatelitarnych [80]. Uzyskanie gęstych map genetycznych stanowi punkt wyjścia do mapowania genów zgodnie z procedurą *chromosome walking* [54, 78, 79].

Osobną kwestią jest zastosowanie przedstawionych w tym artykule metod w rutynowych pracach hodowlanych. Trudno jest dzisiaj znaleźć takie przykłady. Jednak rozwój metod wykorzystujących reakcję PCR, które są szybsze, tańsze i bardziej dostępne od innych dla przeciętnie wyposażonych laboratoriów stwarza szansę na znaczny postęp w tej dziedzinie [81].

### Podziękowanie

Autor dziękuje dr Jackowi Hennigowi, dr Jerzemu Syllerowi i dr Ewie Zimnoch-Guzowskiej za uwagi i dyskusję. Praca finansowana w ramach Grantu KBN Nr 6 PO4B 006 08.

Artykuł otrzymano 31 stycznia 1995 r.  
Zaakceptowano do druku 29 czerwca 1995 r.

## Piśmiennictwo

1. Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW (1989) *Bio Technology* 7: 257-264
2. Hunter RL, Markert CL (1957) *Science* 125: 1294-1295
3. Smithies O (1955) *Biochem J* 61: 629
4. Tanksley SD (1993) *Annu Rev Genet* 27: 205-233
5. Helentjaris T, Slocum M, Wright S, Schaefer A, Nienhuis J (1986) *Theor Appl Genet* 72: 761-769
6. Grodzicker T, Williams J, Sharp P, Sambrook J (1974) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 39: 439-446
7. Watanabe KN (1994) W: Bradshaw JE, Mackay GR (red) *Potato Genetics*, CAB International, Wallingford, str 213-235
8. Helentjaris T (1987) *Trends Genet* 3: 217
9. Kochert G (1989) W: Introduction to RFLP Mapping and Plant Breeding Applications, University Press, Cornell, str. 1-14
10. Freinberg AP, Vogelstein B (1983) *Anal Biochem* 132: 6-13
11. Helentjaris TG, Slocum KM, Siedenstrang C, Wegman S (1985) *Plant Mol Biol* 5: 109-118
12. Kreike CM, de Konung J RA, Krens FA (1990) *Plant Mol Biol Reprtr* 8: 172-179
13. Panaud O, Magpantay G, McCouch S (1993) *Plant Mol Biol Reprtr* 11: 54-59
14. Michelmore RW, Kesseli RV, Francis DM, Fortin MG, Paran I, Yang CH (1992) W: Gurr SJ, McPherson MJ, Bowles DJ (red) *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach*, t 2. IRL Press, Oxford, str 233-288
15. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) *Am J Hum Genet* 32: 314-331
16. Wyman AR, White R (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6754-6758
17. Beckmann JS, Soller M (1986) *Euphytica* 35: 111-124
18. Klein-Lankhorst RM, Vermunt A, Weide R, Liharska T, Zabel P (1991) *Theor Appl Genet* 83: 108-114
19. Gebhardt C, Ritter E, Barone A, Debner T, Walkemeier B, Schachtschabel U, Kaufmann H, Thompson RD, Bonierbale MW, Ganai MW, Tanksley SD, Salamini F (1991) *Theor Appl Genet* 83: 49-57
20. Gabriel DW, de Feyter R (1992) W: Gurr SJ, McPherson MJ, Bowles DJ (red) *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach*, t 1. IRL Press, Oxford, str 51-66
21. Beckmann JS, Soller M (1986) W: Mifflin BJ (red) *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, t 3. University Press, Oxford, str 196-250
22. Helentjaris TG, Burr B (1989) W: Development and Application of Molecular Markers to Problems in Plant Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
23. Song KM, Osborn TC, Williams PH (1998) *Theor Appl Genet* 75: 784-794
24. Hosaka K, Hanneman Jr. RE (1988) *Theor Appl Genet* 76: 172-176
25. Hosaka K, Hanneman Jr. RE (1988) *Theor Appl Genet* 76: 333-340
26. Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1992) *Bio Technology* 10: 937
27. Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim NA (1985) *Science* 230: 1350
28. Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1991) *Bio Technology* 9: 553-557
29. Williams JGK, Kubelik AR, Lavak KJ, Rafalski JA, Tingey SY (1990) *Nucl Acids Res* 18: 6531-6535
30. Welsh J, McClelland M (1990) *Nucl Acids Res* 18: 7213-7218
31. Tijssen P (1993) W: Hybridization with Nucleic Acid Probes, t 1. Elsevier Science Publishers B.V, Amsterdam, str 165-219
32. Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA, Tingey SV (1993) W: Wu R (red) *Methods in Enzymology*, Vol 218: Recombinant DNA, t 1. Academic Press, Inc, New York, str 704-740
33. Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Wallace RB (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2757-2769
34. Horn GT, Richards B, Klinger KW (1989) *Nucl Acid Res* 17: 2140
35. Weber JL (1991) W: Davies KE (red) *Genome Analysis Vol 1: Genetic and Physical Mapping*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, str 159-181
36. Caetano-Anolles G (1994) *Plant Mol Biol* 25: 1011-1026
37. Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff (1991) *Plant Mol Biol Reprtr* 8: 294-307
38. Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1993) *Mol Gen Genet* 241: 57-64
39. Vierling RA, Nguyen HT (1992) *Theor Appl Genet* 84: 835-838
40. Waugh R, Powell W (1992) *Trends Biotechnol* 10: 186-191
41. Bowditch BM, Albright DG, Williams JGK, Braun MJ (1993) W: *Methods in Enzymology*, Vol 224: Biological Diversity of Macromolecules, Academic Press, Inc, New York, str 294-309
42. Paran I, Michelmore RW (1993) *Theor Appl Genet* 85: 985-993
43. Martin GB, Williams JGK, Tanksley SD (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2336-2340
44. Paran I, Kesseli R, Michelmore RW (1991) *Genome* 34: 1021-1027
45. Tingey SV, del Tufo JP (1993) *Plant Physiol* 101: 349-352
46. Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828-9832
47. Giovannoni JJ, Wing RA, Ganai MW, Tanksley SD (1991) *Nucl Acids Res* 19: 6553-6558
48. Ragot M, Hoisington DA (1993) *Theor Appl Genet* 86: 975-984
49. Rafalski JA, Tingey SV (1993) *Trends Genet* 9: 275-280
50. Quiros CF, Ceada A, Georgescu A, Hu J (1993) *Am Potato J* 70: 35-42
51. Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RJ (1993) *Biotechniques* 14: 214-217

52. He S, Ohm H, Mackenzie S (1992) *Theor Appl Genet* **84**: 573-578
53. Olsen M, Cantor C, Botstein D (1989) *Science* **245**: 1434-1435
54. Konieczny A, Ausubel FM (1993) *Plant J* **4**: 403-410
55. Prabhur RR, Gresshoff PM (1994) *Plant Mol Biol* **26**: 105-116
56. Zabeau M, Vos P (1992) EPO Patent 0534858A1
57. Zethof J, De Keukeleire P, van Montagu M (1994) *4th International Congress of Plant Molecular Biology, Abstract* 19
58. Maksem K, Leister D, Salamini F, Gebhardt C (1994) *4th International Congress of Plant Molecular Biology Abstract* 20
59. Litt M, Luty JA (1989) *AM J Hum Genet* **44**: 397-401
60. Jacob HJK, Lindpaintner K, Lincoln SE, Kusumi K, Bunker K, Mao YP, Gantan D, Dzau VJ, Lander ES (1991) *Cell* **67**: 213-224
61. Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskay (1991) *Am J Hum Genet* **49**: 746-756
62. Becmkann JS, Soller M (1990) *Bio Technology* **8**: 930-933
63. Akkaya MS, Bhagwat AA, Cregan PB (1992) *Genetics* **132**: 1131-1139
64. Morgante M, Olivieri AM (1993) *Plant J* **3**: 175-182
65. Cregan P, Akkaya M, Rongwen J, Shoemaker R, Specht J, Bhagwat A, Lavi U (1994) *4th International Congress of Plant Molecular Biology, Abstract* 1846
66. Vosman B, Arens P (1994) *4th International Congress of Plant Molecular Biology, Abstract*, 42
67. Rafalski JA, Morganate M, Andre C, Biddle P, Powell W, Taramino G, Hanafey J, Tingey S (1994) *4th International Congress of Plant Molecular Biology, Abstract*, 1842
68. Orita MH, Iwahana H, Kanazawa K, Sekiya T (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2766-2770
69. Miyao A, Monna L, Zhong HS, Fukuoka S, Yamazaki M, Sasaki T, Minobe Y (1994) *4th International Congress of Plant Molecular Biology, Abstract* 26
70. Nair S, Mohan M, Bentur JS, Prasada R (1994) *4th International Congress of Plant Molecular Biology Abstract*, 1875
71. Bruke DT, Carle GF, Olson MV (1987) *Science* **236**: 806
72. Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, t 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
73. Frischauf AM (1993) *W: Brown TA (red) Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, t 2. IRL Press, Oxford, str 15-38
74. Wochniak P, Malepszy S (1994) *W: Biotechnologia — Przegląd Informacyjny*, str 15-30
75. Hoheisel JD (1994) *Trends Biotechnol* **10**: 79-83
76. Funke R, Kolchinsky A, Gresshoff (1994) *4th International Congress of Plant Molecular Biology, Abstract*, 23
77. Del-favero J, Charels D, Vandenbossche D, D'Haeseleer M, Jacobs M (1994) *4th International Congress of Plant Molecular Biology, Abstract*, 22
78. Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vincente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson, Pineda O, Röder MS, Wing RA, Wu W, Young ND (1992) *Genetics* **132**: 1141-1160
79. Reiter RS, Williams JGK, Feldmann KA, Rafalski JA, Tingey SV, Scolnik PA (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1477-1481
80. Dirlwanger E, Isaac PG, Ranade S, Belajouza M, Cousin R, de Vinne D (1994) *Theor Appl Genet* **88**: 17-27
81. Niewöhner J, Salamini F, Gebhardt C (1995) *Molecular Breeding* **1**: 65-78

## Czy przemiany rodników tlenowych w organizmie przebiegają cyklicznie?\*

## Does the oxygen — radical metabolic — cycle exist in the organism?

ROMAN GONDKO\*

**Wykaz stosowanych skrótów:** RFT — reaktywne formy tlenu (rodnikowe i nierodnikowe pochodne tlenu),  $O_2^{\cdot-}$  — anionorodnik ponadtlenkowy,  $\cdot OH$  — rodnik wodorotlenowy (hydroksylowy),  $O_3^{\cdot-}$  — rodnik ozonowy, LH — wielonienasycony kwas tłuszczowy,  $L^{\cdot}$  — rodnik alkilowy,  $LO^{\cdot}$  — rodnik alkoksylowy,  $LOO^{\cdot}$  — rodnik nadztlenkowy, SOD — dysmutaza ponadtlenkowa, CAT — katalaza, GPx — peroksydaza glutationowa, GSH — zredukowany glutation, GSSG — disulfid glutationu (utleniony glutation).

Odkrycie reakcji dysmutacji, zachodzącej przy udziale enzymu dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), zapoczątkowało w biologii i medycynie dziedzinę badań reakcji wolnorodnikowych [1]. W wyniku jednoelektronowej redukcji cząsteczki tlenu powstaje anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ). Jego spontaniczna

\*\* W tomie 34 (1988) *Postępów Biochemii* ukazały się następujące artykuły n.t. rodników tlenowych:

Liczmański AE — Toksyczność tlenu. I. Uszkodzenie żywych komórek: 273-291.

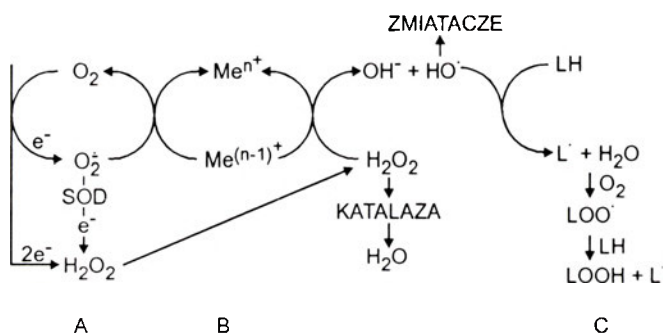
Liczmański AE — Toksyczność tlenu. II. Mechanizmy obronne: 293-310.

Kwiatowski JA — Dysmutaza ponadtlenkowa — struktura, funkcja i filogeneza: 311-333.

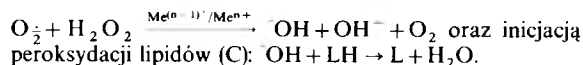
\* Prof. dr hab., Katedra Biofizyki Ogólnej U.Ł., Banacha 12/16, 90-237 Łódź

czy niespontaniczna dysmutacja, lub dwuelektronowa redukcja tlenu prowadzą do powstania nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ).

W reakcji Habera-Weissa czy Fentona nadtlenek z nadtleniem w obecności metali ( $Cu^+$ ,  $Fe^{2+}$ ) tworzą rodnik wodorotlenowy (hydroksylowy —  $\cdot OH$ ) (Ryc. 1). Powyższe rodniki oraz  $H_2O_2$  zwane „reaktywnymi formami tlenu” (RFT) okazały się bardzo szkodliwe dla organizmów („szok tlenowy”), a także są zdolne do naruszenia struktur materii nieorganicznej. „Aktywny tlen” uczestniczy w procesach peroksydacji lipidów (Ryc. 1.), co prowadzi do destrukcji błon i innych struktur komórkowych [2]. Wolne rodniki powodują m.in. korozję metali, uszkodzenie skał, plastiku, a także jełczenie masła i innych tłuszczów.



Ryc. 1 Jedno- i dwuelektronowa redukcja tlenu (A) w powiązaniu z reakcją Fentona (B):



W środowisku naturalnym głównym źródłem rodników są reakcje tlenu z węglowodarami. Powstają one w procesie spalania stałych i płynnych paliw, a także tytoniu. Fotodysocjacja  $HNO_3$  w wyniku której w atmosferze generowane są rodniki hydroksylowe i ozonowe ( $O_3$ ), to w naturze drugie bogate źródło reakcji wolnorodnikowych. W wyniku reakcji fotochemicznych anionorodnik nadtlenny i nadtlenek wodoru powstają w wodach słodkich i morskich. Po napromieniowaniu ( $X$ ,  $\gamma$ , UV) (np. radioliza wody) lub przyłączeniu związków inicjujących szereg związków chemicznych może ulec przekształceniu w wolne rodniki [3]. W organizmach aerobowych wolne rodniki powstają w procesach metabolicznych w trakcie autooksydacji wielu związków, bądź w wyniku oddziaływań czynników zewnętrznych. Stwierdzono, że wolne rodniki mogą być przyczyną pewnych stanów chorobowych, zwłaszcza w warunkach osłabionej ochrony antyoksydacyjnej, a także procesów starzenia [4-8]. Prawie wszystko o budowie, własnościach i roli tlenu oraz jego reaktywnych pochodnych (23 dotychczas zidentyfikowanych) w organizmach (przyrodzie), a także wiele dodatkowych informacji (np. metody oznaczeń) znajdzie czytelnik w monografii Bartosza [9].

W warunkach fizjologicznych wolne rodniki generowane są w toku wielu procesów fizjologicznych (tj. oddychanie, fotosynteza, autooksydacja chinonów,

leukoflawin, hemoglobiny i innych związków). Głównym źródłem rodników tlenowych w organizmach jest mitochondrialny łańcuch oddechowy. Czteroelektronowa redukcja tlenu cząsteczkowego do wody w łańcuchu oddechowym zachodzi wyłącznie na poziomie oksydazy cytochromowej (kompleks IV). Jednakże przepływ elektronów przez składowe łańcucha oddechowego nie jest szczelny: część elektronów „wycieka” redukując cząsteczkę tlenu na drodze procesu jednoelektronowego. Odpowiedzialnymi za „jednoelektronowy wyciek” z łańcucha oddechowego są: dehydrogenaza NADH i koenzym Q. Zredukowane formy: koenzymu dehydrogenazy NADH i ubihydrochinonu na drodze jednoelektronowej reakcji z tlenem tworzą  $O_2\cdot^-$ . Tym samym mitochondrialny łańcuch oddechowy nie jest w 100% wydajny. Z całkowitej puli tlenu cząsteczkowego, 99-96% ulega w mitochondriach pełnej czteroelektronowej redukcji do  $H_2O$ . Pozostała część (1-4%) po częściowej redukcji stanowi „jednoelektronowy wyciek” ( $O_2\cdot^-$ ) z układu. Fakt ten świadczyć może o „niedoskonałości” czy błędzie procesu ewolucyjnego. Występująca w macierzy mitochondrialnej dysmutaza manganowa (MnSOD) transformuje do  $H_2O_2$  około 80% „jednoelektronowego wycieku”. Pozostała część (20% tzn. 0,2% z wyjściowej całości) wnika do cytoplazmy gdzie napotyka dysmutazę cynkowo-miedziową (Cu, ZnSOD). Anionorodnik nadtlenny powstaje także w mikrosomalnym łańcuchu oddechowym przy udziale reduktazy cytochromu P-450 i cytochromu P-450. Rodnik ten wytwarzany jest również podczas fotosyntezy, kiedy stężenie  $CO_2$  w chloroplastach ulega obniżeniu [9, 10].

Nasuwa się pytanie, czy stałe generowanie wolnych rodników w komórce jest „błędem” ewolucyjnym, czy też niezbędnym, wyselekcjonowanym w trakcie ewolucji, szlakiem metabolicznym. Gdyby RFT były tylko szkodliwe dla organizmów, to na drodze doboru naturalnego powinny zostać wyeliminowane reakcje, które je generują [11]. Takie właśnie przypuszczenia wysunięto po analizie produktów redukcji tlenu z udziałem niektórych enzymów, w tym oksydazy cytochromowej [12]. Źródłem RFT w komórkach są także reakcje enzymatyczne z udziałem oksydaz (oksydoreduktaz). Enzymy te uczestniczą w przeniesieniu elektronu lub atomu wodoru na tlen. Jedną z grup oksydaz zawiera w centrum aktywnym tylko metal, a ich produktem redukcji jest  $H_2O$ . W innej grupie oksydaz, obok metalu, koenzymem jest dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD). Z udziałem tych oksydaz powstaje  $H_2O_2$ . Jest interesujące, że oksydaza ksantynowa (grupa prostetyczna: Mo, FAD) może redukować tlen jedno lub dwuelektronowo tj. wytwarzając  $O_2\cdot^-$  bądź  $H_2O_2$ . Ilość tlenu, którą enzym zredukuje jednoelektronowo lub dwuelektronowo zależy od stężenia tlenu w roztworze i pH. W roztworze zrównoważonym z tlenem pod ciśnieniem 101 kPa w pH = 10, szlakiem jednoelektronowym przemiesz-

czonych zostaje 100% elektronów. Natomiast w pH 7,8 w roztworach dobrze napowietrzonych tylko 15% elektronów. Wyższe stężenia tlenu i wyższe wartości pH nasilają jednoelektronową redukcję tlenu, a wyższe stężenie substratu odwrotnie [9]. W układzie *in vitro* z udziałem oksydazy dytochromowej produktem redukcji jest H<sub>2</sub>O [12]. Rozważenie wyżej przedstawionych danych prowadzi do wniosku, że redukcja cząsteczkowego tlenu do wody nie musi zachodzić etapowo z utworzeniem reaktywnych rodników tlenowych. Tym samym hipotezę o „błędzie” należy odrzucić, przyjmując hipotezę o fizjologicznej konieczności generowania rodników tlenowych w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym. Tym bardziej, że mamy coraz więcej faktów świadczących o roli i znaczeniu wolnych rodników tlenowych w normalnych reakcjach metabolicznych. W organizmach aerobowych reaktywne formy tlenu wydają się być niezbędnymi, „normalnymi”, metabolitami, a ich generowanie i usuwanie utrzymuje stan dynamicznej równowagi (homeostaza prooksydacyjno-antyoksydacyjna), którego naruszenie prowadzi do patologii [13]. Na podstawie danych literaturowych B a r t o s z opisał szczegółowo ponad 20 reakcji fizjologicznych w których RFT są niezbędne [9]. Poniżej przytoczone przykłady świadczą o szczególnej roli wolnych rodników w prawidłowej funkcji komórek i tkanek. Tak na przykład, zmiana stężenia cGMP zachodzi pod wpływem O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a hiperoksja, czy rozkład H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> z udziałem katalazy, warunkuje aktywność cykazy guanylowej [14-17]. Organiczne rodniki pojawiają się podczas syntezy deoksyrybonukleozydów, przebiegającej z udziałem reduktazy difosforbynonukleozydowej [18]. Okazało się, że nie tylko komórki endotelialne, ale także neurony wytwarzają O<sub>2</sub><sup>-</sup> oraz rodnik — NO<sup>•</sup>, z którego tworzy się nadtlenoazotyn (ONOO<sup>-</sup>), a są to dwie zawierające azot bardzo ważne formy „reaktywnego tlenu” [19]. Niszczenie obcych komórek bądź struktur przez fagocyty następuje w wyniku wybuchu (szoku) tlenowego wywołanego przez O<sub>2</sub><sup>-</sup> generowanego przy udziale oksydazy NADPH w błonie neutrofilii, makrofagów, monocytów i eozynofili [20]. Nadtlenek wodoru powstający w błonie adipocytów szczurów uważany jest za drugi regulator insuliny [21]. Stężenia nadtlenu lipidów oraz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> warunkują syntezę prostaglandyn, leukotrien i tyroksyny (melanin) [22-24]. Tak ważne procesy fizjologiczne jak: potencjał błonowy, wpływ witaminy K<sub>1</sub> na syntezę protrombiny i koagulację czynników VII i IX; agregacja płytek, metabolizm ksenobiotyków, zachodzą przy udziale O<sub>2</sub><sup>-</sup> [25-27]. Anionorodnik nadtlenu jest substratem kilku enzymów takich jak: dioksygenaza 2-nitropropanu, dioksygenaza indofenylova; oksydaza galaktozowa, indoloamino-2,3-dihydroksylaza, dopamino-dihydroksylaza [28]. Uważa się, że wolne rodniki tlenowe są niezbędne w tak podstawowych procesach życiowych, jak podział komórek i rozwój organizmów [29]. Wytwarzanie wolnych rodników i peroksydacja lipi-

dów są silnie stymulowane w okresach dużego zużycia tlenu jaki ma miejsce w włóknach mięśniowych w trakcie wysiłku fizycznego lub w brązowej tkance podczas termogenezy [30, 31].

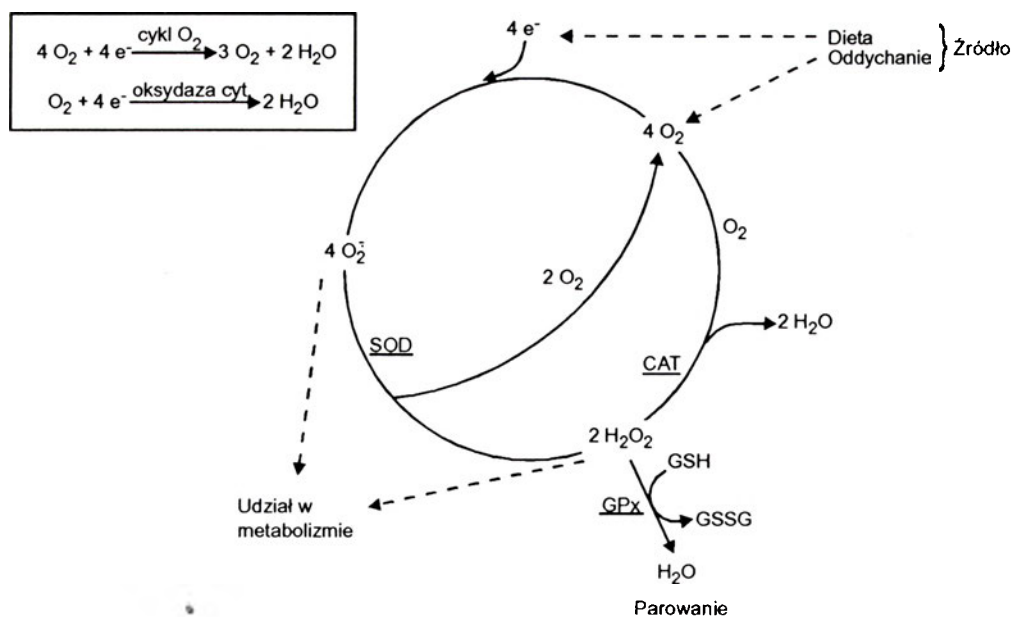
U bezkręgowców i roślin szereg prawidłowych fizjologicznych funkcji tkanek (organów) uwarunkowanych jest obecnością wolnych rodników. Obecne w błonie zapłodnionych jaj jeżowca morskiego wolne rodniki zapobiegają polispermii [32]. U niektórych bezkręgowców wywołują bioluminescencję [33] i biorą udział w specyficznej reakcji obronnej niektórych chrząszczy biegaczowatych [34]. W świecie roślin proces peroksydacji ułatwia syntezę głównego składnika drewna — ligniny [35]. Nadtlenuki lipidów i aldehydy powstałe w uszkodzonych tkankach roślin mogą pełnić istotną rolę w obronie roślin przed bakteriami i grzybami wnikającymi w miejsce zranienia [36].

Analiza danych literaturowych dotyczących wolnorodnikowych reakcji skłoniła B a r j a ę do zaproponowania hipotezy cyklicznej przemiany w organizmie anionorodnika nadtlenu (Ryc. 2) [10]. W przemianie tej kluczową rolę grać mają enzymy: dysmutaza nadtlenu (SOD) i katalaza (CAT) przy czym produkt(y) reakcji miałyby regulować cykliczność przemian na drodze sprzężenia zwrotnego. Tym samym wymienione enzymy przede wszystkim grałyby rolę regulacyjną, a nie obronną (antyoksydacyjną).

W stosunku do ilości tlenu uwolnionego z hemoglobiny, ilość uwalnianego tlenu przy udziale SOD i CAT w hipotetycznym cyklu jest nieznaczna. Mimo to cykliczność procesu może, w przypadku dużego przyrostu wolnych rodników, spowodować miejscowe obniżenie pO<sub>2</sub> w tkankach. Gdyby układ nie mógł wytwarzać O<sub>2</sub>, to wybuch tlenowy (duże punktowe stężenie rodników) połączony ze zmiataniem rodników (tj. zużyciem tlenu) mógłby doprowadzić do lokalnej hipoksji oraz ograniczenie reakcji tlenowo-zależnych.

W proponowanym cyklu, podczas jednego pełnego obrotu, nie ma równowagi pomiędzy ilością zużytego i wytworzonego tlenu (ilość O<sub>2</sub><sup>-</sup> plus reakcje z SOD i CAT). Stechiometria reakcji wskazuje, że na każde 4 cząsteczki zużytego tlenu podczas jednego obrotu cyklu, odtworzone są tylko 3 cząsteczki O<sub>2</sub> (Ryc. 2.). Cztery cząsteczki O<sub>2</sub> zostają zredukowane do 2 cząsteczek H<sub>2</sub>O. Takie samo zdarzenie tj. nierównoważność w ilości zużytego i wytworzonego tlenu ma miejsce w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym z udziałem oksydazy cytochromowej, sprzężonym z syntezą ATP. W proponowanym cyklu nie uwzględniono tworzenia wiązań wysokoenergetycznych (ATP).

Cykl rozpoczyna tlen i elektrony pochodzące ze środowiska zewnętrznego (dieta, oddychanie). Produkt pośredni cyklu — H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eliminuje peroksydaza glutationowa (GPx). Enzymy antyoksydacyjne: SOD i CAT w pierwszym rzędzie stanowią fizjologiczny



Ryc. 2 Hipotetyczny cykl rodników tlenowych [10]. Enzymy: SOD i CAT są regulatorami cyklu, a główną funkcję antyoksydacyjną tj. usuwanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przy udziale GSH pełni GPx.

układ regulatorowy, odpowiedzialny za ilość wolnych rodników tlenowych w komórkach i tkankach.

Z obecności cyklu wynikają następujące konsekwencje.

(a) Kiedy przyrostowi zawartości SOD nie towarzyszy przyrost katalazy, to nastąpi wzrost stężenia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. SOD nie eliminuje produktów cyklu, katalizuje tworzenie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nadmiar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> może spowodować bezpośrednie uszkodzenie komórek, bądź pośrednie, poprzez generowanie w obecności jonów żelazowych — rodnika •OH w reakcji Fentona.

(b) Nadmiar katalazy nie ma tak negatywnych skutków, bowiem przy jej udziale powstaje tlen cząsteczkowy i woda.

(c) Równoczesny przyrost SOD i katalazy spowoduje wydatkowanie energii (w wyniku redukcji tlenu do wody), zużytkowując w tym celu elektrony z metabolizmu, bez syntezy ATP.

(d) Wzrost spożycia pokarmów teoretycznie może podwyższyć w tkankach ilości O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Jeżeli rodniki tlenowe są uwalniane w procesie starzenia to szybkość starzenia może zostać spowolniona poprzez regulowanie (ograniczenie) wartości kalorycznej diety.

(e) Podobnie, wzrost utlenienia tkankowego — zużycie tlenu mające miejsce podczas wysiłku fizycznego (praca — sport) może być powodem stresu tlenowego spowodowanego przyrostem w komórkach stężeń produktów pośrednich cyklu.

Przedstawiona hipoteza Barja, co jest oczywiste, wymaga doświadczalnej weryfikacji.

Artykuł otrzymano 17 marca 1995 r.  
 Zaakceptowano do druku 11 września 1995 r.

## Piśmiennictwo

1. Fridovich J (1975) *Annu Rev Biochem* **44**: 147-159
2. Halliwell B, Gutteridge JMC (1984) *Biochem J* **219**: 1-14

3. Riley PA (1994) *Int J Radiat Biol* **65**: 27-33
4. Feher J, Csomos G, Vereckei A (1987) W: *Free Radical Reaction in Medicine*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo
5. Warner HR (1994) *Free Radical Biol Med* **17**: 249-258
6. Sikora E (1989) *Post Biochem* **35**: 563-574
7. Jaruga P, Oliński R (1994) *Post Hig Med Dośw* **48**: 443-456
8. Jurkowiak M, Oliński R (1995) *Kosmos* **44**: 71-81
9. Bartosz G (1995) W: *Druga Twarz Tlenu*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
10. Barja G (1993) *Free Rad Res Comms* **18**: 63-70
11. Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) W: Halliwell B, Gutteridge JMC (red) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Univ Press, Oxford str 366-415
12. Chance B (1981) W: Gilbert DL (red) *Oxygen and Living Processes: an interdisciplinary approach*, Springer-Verlag, New York str 200-209
13. Gondko R (1994) W: Kiliańska Z, Krajewska WM, Lipińska A (red.) *Biłka Komórek Prawidłowych i Patologicznych*, ŁTN, Łódź str 241-270
14. Haddox MK, Stephenson JH, Moser ME, Goldberg NE (1978) *J Biol Chem* **253**: 3143-3152
15. Burke TM, Wolin MS (1987) *J Applied Phys* **66**: 167-170
16. Santa Maria C, Revilla E, Fabregat J, Machado A (1989) *Age* **12**: 1-5
17. Cherry PD, Wolin MS (1989) *Free Radical Biol Med* **7**: 485-490
18. Fontecave M, Graslund A, Reichard P (1987) *J Biol Chem* **262**: 12332-12337
19. Ferencik M, Bergendi L, Kacani L (1993) W: Feher J, Balzowics A, Matkovic B, Mezes M (red) *Role of Free Radicals in Biological System* Akademiai Kiado, Budapest, str 71-81
20. Morel F, Doussiere J, Vignasis PV (1991) *European J Bioch* **201**: 523-546
21. Hayes GR, Loockwood DH (1987) *Proc Nat Acad Scie USA* **84**: 8115-8119
22. Nakamura Y, Ohtaki S (1989) *J Endocrinology* **126**: 283-287
23. Choi JH, Yu BP (1990) *Age* **13**: 61-64
24. Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN (1987) *Science* **237**: 1171-1176
25. Scott JA, Rabito CA (1988) *Free Radical Biol Med* **5**: 237-246
26. Kanabus-Kamińska JM, Girardot JM (1984) *Archv Biochem Biophys* **228**: 646-652
27. Sevanian A, Nordenbrand K, Kim E, Ernster L, Hochstein P (1990) *Free Radical Biol Med* **8**: 145-152
28. Nohl H (1981) *Klinische Wochen* **59**: 1081-1091
29. Allen RG, Balin AK (1989) *Free Radical Biol Med* **6**: 631-661



30. Alessio HM, Goldfarb AH (1988) *J App Physiol* **64**: 1333-1336
31. Barja de Quiroga G, Lopez-Torres M, Percz-Campo R, Abelanda M, Nava MP, Puerta ML (1991) *Biochem J* **277**: 289-292
32. Shapiro BM (1991) *Science* **252**: 533-536
33. Henry JP, Monny C, Michelson AM (1975) *Biochemistry* **14**: 3458-3466
34. Aneshansley DJ (1983) *Experientia* **39**: 366-368
35. Halliwell B (1978) *Planta* **140**: 81-88
36. Kronze JR, Elstner EF (1978) *Biochim Biophys Acta* **528**: 213-221

## Domeny w błonach biologicznych i ich znaczenie fizjologiczne

## Domains in biological membranes and their physiological importance

JOANNA BANDOROWICZ-PIKUŁA\*

### Spis treści:

- I. Uwagi wstępne
- II. Klasyfikacja domen w błonach biologicznych
  - II-1. Domeny utworzone przez białka
  - II-2. Mikrodomeny lipidowe
- III. Niektóre aspekty organizowania się fosfolipidów w domenach
  - III-1. Fuzja błon
  - III-2. Wpływ lipidów na aktywność enzymów, białek transportujących i receptorowych
  - III-3. Mechanizmy oddziaływania fosfolipidów z niektórymi białkami
- IV. Podsumowanie

### Contents:

- I. Preface
- II. Classification of domains in biological membranes
  - II-1. Domains formed by proteins
  - II-2. Lipid microdomains
- III. Some aspects of phospholipid assembly into domain structures
  - III-1. Membrane fusion
  - III-2. An influence of lipids on the activity of enzymatic, transport and receptor proteins
  - III-3. Mechanisms of interaction of phospholipids with some proteins
- IV. Conclusion remarks

*To be functionally meaningful, (...) membrane domains must be larger than (...) the size of an enzyme (...), 10-100 nm, (and) to have a lifetime of at least a typical enzyme turnover time, say 1-1000 microseconds.*

*Ken Jacobson i Winchil L. C. Vaz, 1992 [1]*

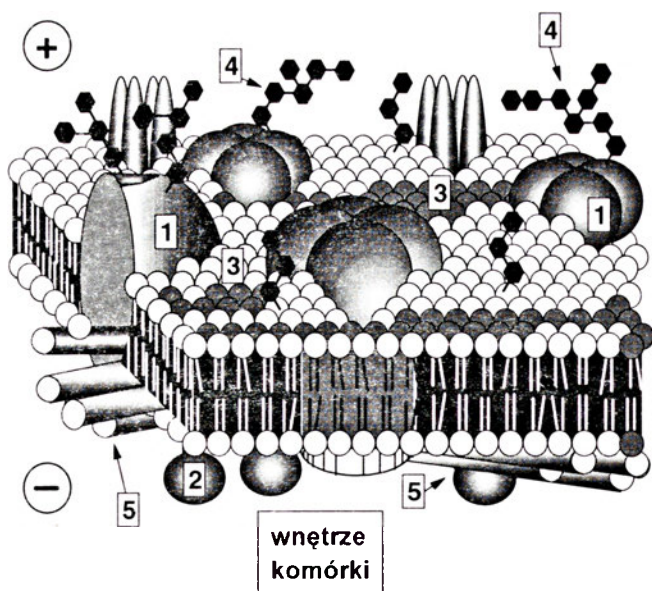
**Wykaz stosowanych skrótów:** CL — kardiolipina; PA — kwas fosfatydowy; PC — fosfatydylocholina; PE — fosfatydyloetanolamina; PG — fosfatydyloglicerol; PI — fosfatydyloinozytol; PIP — fosfatydyloinozytolo-4-fosforan; PIP<sub>2</sub> — fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan; PS — fosfatydyloseryna; SM — sfingomielina; DAG — 1,2-diacylglicerol; FA — kwasy tłuszczowe; PXB — polimiksyna B; PLA<sub>2</sub> — fosfolipaza A<sub>2</sub>; PLC — fosfolipaza C; PKC — kinaza białkowa C.

### I. Uwagi wstępne

Model budowy błon biologicznych zaproponowany przez Singera i Nicolsona [2], opisuje błony jako płynną mozaikę przypadkowo rozmieszczonych składników. Podłoże mozaiki stanowi dwuwarstwa lipidowa, w którą pozostałe składniki błony, białka strukturalne i enzymy, są wbudowane, lub z którą oddziałują elektrostatycznie. Dynamikę takiej struktury zapewniają lipidy zdolne do wykonywania ruchów warunkujących płynność dwuwarstwy. Dzięki temu pozostałe składniki błony mają możliwość poruszania się w płaszczyźnie błony i rotacji wokół własnej osi. Ruchy te są nieodzowne dla ich biologicznej funkcji [3, 4].

Nie jest to jednak pełny obraz błony biologicznej. Błona plazmatyczna komórek organizmów eukario-

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



Ryc. 1 Budowa błony biologicznej.

Opracowano na podstawie modelu płynnej mozaiki Singera i Nicolsona [2], z modyfikacjami [3, 5]. Oznaczenia: 1 — białka integralne błony i glikoproteidy; 2 — białka peryferyjne błony, tylko częściowo penetrujące w dwuwarstwę lipidową lub wiążące się z nią elektrostatycznie; 3 — mikrodomeny lipidowe o różnym składzie chemicznym; 4 — reszty cukrowe glikoproteidów i glikolipidów ekspozowane po zewnętrznej, ekstracytoplazmatycznej stronie błony komórkowej; 5 — elementy cytoszkieletu; niektóre z białek wchodzących w jego skład wiążą się z dwuwarstwą lipidową błony; + i -, oznaczają ładunek wypadkowy odpowiednio na zewnętrznej i wewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej komórki.

tycznych (Ryc. 1) pokryta jest płaszczem glikokaliksowym, a od strony cytoplazmatycznej wsparta rodzajem „rusztowania”, utworzonego przez białka cytoszkieletu. Błona biologiczna jest także strukturą asymetryczną, zarówno w rzucie prostopadłym, jak i równoległym do płaszczyzny dwuwarstwy. Asymetria jest skutkiem specyficznych oddziaływań pomiędzy składnikami błony, które mogą prowadzić do powstania zróżnicowanych chemicznie i strukturalnie rejonów w błonie o odmiennej wielkości, czasie półtrwania i prawdopodobnie funkcji, tzw. domen [3, 6-9].

## II. Klasyfikacja domen w błonach biologicznych

Rozmieszczenie cząsteczek lipidów w liposomie o odpowiednio dużej średnicy jest uwarunkowane ich ruchami termicznymi. Ruchy te winny sprzyjać przypadkowemu rozmieszczeniu składników również w błonie naturalnej. W tym ostatnim przypadku dochodzi jednak do zakłócenia równomiernego rozmieszczenia cząsteczek, np. nagromadzenia białek. Fakt ten spowodowany jest ograniczeniem ich ruchu bocznego [1, 4, 6, 10-12], co zapobiega „wymieszaniu się” składników i może prowadzić do utworzenia domen.

### II-1. Domeny utworzone przez białka

Integralne i powierzchniowe białka błony są roz-

mieszczone w dwuwarstwie lipidowej w nieprzypadkowy sposób. W mikroskali ( $< 10^3 \text{ nm}^2$ ) mamy do czynienia z kompleksami białek (np. zgrupowania oligomerycznych receptorów acetylocholino), łączącymi ze sobą błony organelli komórkowych lub całe komórki. W skali pośredniej ( $10^3\text{-}10^4 \text{ nm}^2$ ) postrzegamy „łatki”, domeny bogate w receptory lub inne integralne czy powierzchniowe białka błonowe. Domeny te powstają często na skutek kontaktów pomiędzy komórkami, adhezji lub oddziaływań z elementami cytoszkieletu [13]. W skali makroskopowej ( $> 10^4 \text{ nm}^2$ ) na powierzchni błony plazmatycznej komórek nabłonkowych, erytrocytów, fibroblastów, plemników i komórek nowotworowych zaobserwowano występowanie dużych rejonów o różnym składzie lipidowym i białkowym [14, 15]. Domeny te są stabilne przez wiele godzin i można je obserwować nawet w mikroskopie świetlnym<sup>2</sup>. Należy podkreślić, że badając tylko skład chemiczny błon nie stwierdza się istnienia domen, a przecież muszą one wpływać na funkcjonowanie składników błony, szczególnie aktywność enzymów.

Domeny bogate w specyficzne białka powstają w wyniku agregacji lub asocjacji białek na powierzchni błony pod wpływem zmian stężenia kationów lub zmian stanu fizycznego i składu lipidowego błony. Może dochodzić również do zakotwiczenia składników błony na elementach cytoszkieletu, czy cząsteczkach wirusów w trakcie infekcji komórki, lub plemnikach podczas zapłodnienia komórki jajowej, oraz tworzenia się białkowych barier, które dzielą dwuwarstwę lipidową na odrębne rejonu [3, 9-13, 19, 20].

### II-2. Mikrodomeny lipidowe

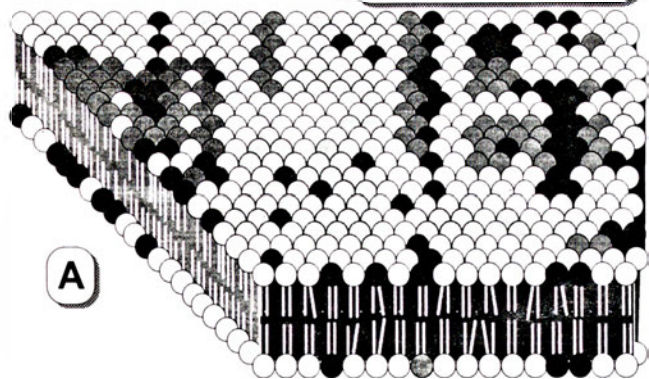
Zróżnicowana szybkość ruchu bocznego cząsteczek lipidów prowadzi do powstania domen lipidowych. Domeny tworzą się w efekcie nie mieszania<sup>3</sup> się składników będących w tej samej fazie, lub ograniczenia ruchu cząsteczek na skutek zmian temperatury, ciśnienia, siły jonowej, stężenia kationów, czy specyficznych oddziaływań lipidów z peryferyjnymi i integralnymi białkami błony [4, 9, 21-23] (Ryc. 2).

Jednym z podstawowych parametrów charakteryzujących zachowanie się lipidów w dwuwarstwie lipidowej błony jest temperatura ich przejścia fazowego. W przypadku sztucznych błon, zbudowanych z jednego rodzaju molekularnego lipidów, w niskiej temperaturze cząsteczki są w stanie uporządkowanym (stan krystaliczny, żel). W miarę wzrostu temperatury stan ten przechodzi w półpłynny (ciekło-krystaliczny). Lipidy zaczynają poruszać się na boki (dyfuzja lateralna), rotować wokół własnej osi (dyfuzja rotacyjna), a także wykonywać ograniczone ruchy w płaszczyźnie

<sup>2</sup> przegląd metod stosowanych w badaniach domen zamieszczono w tabeli 1

<sup>3</sup> ang. *immiscibility*

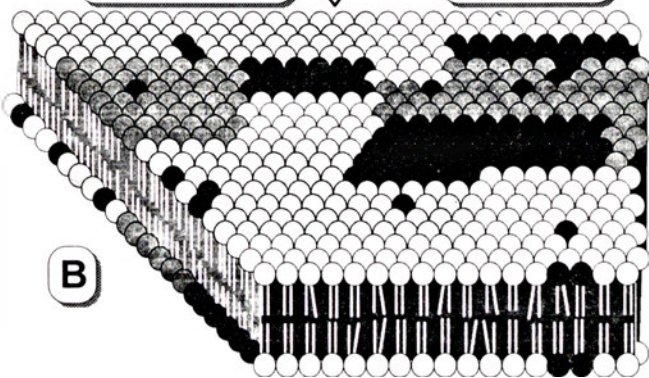
Przypadkowe rozmieszczenie składników



A

T (°C),  $\mu$ , p (Pa)  
pH, [Ca<sup>2+</sup>], białka

Powstawanie domen



B

Ryc. 2 Czynniki wpływające na tworzenie się domen lipidowych w błonie.

T — temperatura;  $\mu$  — siła jonowa; p — ciśnienie.

poprzecznej błony (*flip-flop*). Jednocześnie, łańcuchy acylowe kwasów tłuszczowych w cząsteczkach lipidów nabywają zdolności do wykonywania ruchów segmentalnych, szczególnie wokół wiązania podwójnego [6, 19, 24]. Błona traci uporządkowanie. W przypadku dwuwarstwy zbudowanej z więcej niż jednego rodzaju lipidu, zmiany związane z przejściem fazowym w błonie są kompleksowe, łącznie z nierównomiernym rozdziałem składników w płaszczyźnie błony. Obraz jest jeszcze bardziej skomplikowany, kiedy dwuwarstwę lipidową penetrują białka integralne lub oddziałują z nią białka powierzchniowe [25, 26].

Haverstick i Glaser [27], stosując fluorescencyjne pochodne fosfatydyloetanolaminy, fosfatydylocholiny i kwaśnych fosfolipidów, fosfatydyloseryny i kwasu fosfatydowego, w połączeniu z metodami mikroskopowymi, stwierdzili, że pod wpływem Ca<sup>2+</sup> w liposomach o średnicy 5-15  $\mu$ m i w błonie erytrocytów powstają domeny zbudowane tylko z kwaśnych fosfolipidów. Van Dijk i wsp. [28] oraz Feigenson [29] wykazali, że Ca<sup>2+</sup> i H<sup>+</sup> odpowiedzialne są za segregację anionowych fosfolipidów w liposomach, czemu towarzyszy powstawanie kompleksów Ca<sub>n</sub>(PS)<sub>m</sub> i żelifikacja pewnych rejonów błony. Konsekwencją opisanych zjawisk jest współistnienie w błonie mikrodomen lipidowych wykazujących uporządkowanie oraz mikrodomen o wysokim stopniu

płynności. W błonie *Acholeplasma laidlawii* czy *E. coli*, w temperaturze sprzyjającej wzrostowi komórek, obserwowano obecność żelifikowanych lipidów, szczególnie jeśli komórkom dodano do pożywki nasycone lub *trans*-nienasycone kwasy tłuszczowe. Obecność podobnych domen stwierdzono również w błonie plazmatycznej plemników [14, 16, 30].

Skład fosfolipidowy błon większości komórek jest bardzo różnorodny. Charakteryzuje go wysoka zawartość *cis*-jedno- lub wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, a w przypadku błon plazmatycznych, dodatkowo wysoka zawartość cholesterolu [4, 5]. Cholesterol w wyższym stężeniu działa jako czynnik „uplastyczniający” błony. Asocjuje z czterema cząsteczkami sfingomieliny, dwiema fosfatydylocholiny lub jedną fosfatydyloetanolaminą [25]. W związku z powyższym, w temperaturze ciała organizmu, w większości błon biologicznych fosfolipidy w stanie żelu praktycznie nie występują. Zostało to potwierdzone np. w przypadku mysich fibroblastów i ludzkich erytrocytów [16].

Domeny lipidowe mogą mieć strukturę inną niż dwuwarstwa (Tab. 2). Zdolnością do tworzenia takich domen odznaczają się szczególnie fosfatydyloetanolamina i kwaśne fosfolipidy. Specyficznym przykładem domeny lipidowej jest warstwa cząsteczek lipidów wokół integralnego białka błonowego, silnie z nim związana, tzw. annulus. Występowanie hipotetycznego annulusa przewidywano w przypadku Ca<sup>2+</sup>-ATPazy z błon sarkoplazmatycznego retikulum [32]. Lipidy wchodzące w jego skład miałyby odgrywać rolę w regulacji aktywności enzymu. Hipoteza ta jest krytykowana przez wielu badaczy. Z drugiej strony jednak, niektórzy z nich stwierdzają w obecności białek integralnych zmianę ruchliwości łańcuchów acylowych lipidów, szybkości dyfuzji lateralnej cząsteczek, a także zmianę asymetrii [6, 19].

### III. Niektóre aspekty organizowania się fosfolipidów w domeny

Funkcje, jakie pełnią błony w komórce, zależą w dużym stopniu od składu lipidowego dwuwarstwy. Znaczenie zjawiska polimorfizmu lipidów dla fizjologii komórki może być rozpatrywane w kategoriach specyficznych oddziaływań lipidy-białka, modulowanych przez lipidy oddziaływań białka-białka, i w kategoriach zmian płynności błony. Płynność jest zjawiskiem odwrotnym do lepkości, wielkości fizycznej związanej z ograniczeniem ruchu boczno cząsteczek [3, 4, 6, 23]. W związku z tym asymetryczne rozmieszczenie fosfolipidów w błonie może mieć duże znaczenie dla fizykochemicznych właściwości dwuwarstwy. Również kwasy tłuszczowe wchodzące w skład fosfolipidów są rozmieszczone asymetrycznie. W przypadku błony erytrocytów (Ryc. 3) i fibroblastów skład kwasów tłuszczowych fosfolipidów zależy od rodzaju polarnej głowy cząsteczki. Aminofosfolipidy w pozycji *sn2* bogate są w reszty kwasu arachidonowego i innych

**Tabela 1.**

Metody stosowane w badaniach domen w błonach biologicznych.

Błona biologiczna lub sztuczna	Organizm, tkanka, komórka	Zastosowana metoda	Wnioski uzyskane z obserwacji
<b>Metody biochemiczne</b>			
błona plazmatyczna	ludzkie erytrocyty	1. zastosowanie fosfolipaz o różnej specyficzności substratowej	istnienie domen bogatych w PC
błona plazmatyczna	<i>Acholeplasma laidlawii</i>		istnienie domen bogatych w PG; wpływ białek integralnych błony
błona plazmatyczna i błony organelli komórkowych	komórki neuroblastomy	2. badania metabolizmu lipidów	nierównomierne rozmieszczenie PC w błonie
błony zewnętrzne i wewnętrzne	<i>E. coli</i>		nierównomierne rozmieszczenie PG w błonie
błony tylakoidów	chloroplasty	3. frakcjonowanie błon biologicznych	istnienie dużych różnic w składzie chemicznym rejonów błony eksponowanych do stromy i do wnętrza tylakoidu
błona plazmatyczna	embriony jeżowca		istnienie domen o różnym składzie chemicznym
błona plazmatyczna	ludzkie erytrocyty	4. chemiczne sieciowanie białek i lipidów	istnienie domen bogatych w PC i PS oraz specyficznych oddziaływań pomiędzy glikolipidami i białkami integralnymi
błona plazmatyczna	<i>Micrococcus luteus</i>	5. fotochemiczne sieciowanie białek i lipidów	istnienie domen bogatych w DAG i dimannozylo-DAG
<b>Metody fizyko-chemiczne</b>			
błona plazmatyczna	plemniki szczura	1. różnicowa kalorymetria (DSC) <sup>a</sup>	współistnienie domen w błonie o różnej płynności
retikulum sarkoplazmatyczne	mięśnie szkieletowe królika	2. <sup>32</sup> P-NMR <sup>b</sup>	wpływ białek integralnych błony na powstawanie domen lipidowych
błona plazmatyczna i ER	wątroba szczura	3. frakcjonowanie błon i EPR	współistnienie domen o różnej płynności w temperaturze < 32°C; istnienie domen bogatych i ubogich w cholesterol
błona plazmatyczna	ludzkie erytrocyty		zaobserwowanie zjawiska rozdziału składników w płaszczyźnie błony, powstawanie domen bogatych w cholesterol
błona plazmatyczna (rejon bogaty w Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPazę)	organ elektryczny <i>Torpedo marmorata</i>		istnienie lipidowego annulusa wokół cząsteczek ATP-azy zbudowanego z cząsteczek fosfolipidów anionowych
liposomy	błony z PS/PC lub PE/PC; oddziaływanie z aneksynami	4. EPR <sup>c</sup>	wpływ aneksyn IV i VI na obniżenie dyfuzji lateralnej lipidów wywołanej przez jony Ca <sup>2+</sup> ; efekt specyficzny w stosunku do błon zbudowanych z PS
<b>Metody mikroskopowe w połączeniu z modyfikacjami chemicznymi</b>			
błona plazmatyczna	plemniki świnki morskiej	1. PXB	zniszczenie struktury błony w specyficznych rejonach, prawdopodobnie wzbogaconych w PS
błona plazmatyczna	ludzkie erytrocyty	2. PXB, trawienie PLC i immunocytochemia <sup>c</sup>	istnienie domen bogatych w fosfolipidy anionowe
fragmenty błony plazmatycznej bogate w receptory dla acetylocholinę	miotuby szczura	3. saponina, filipina	istnienie domen lipidowych o różnym składzie i płynności

Tabela 1. (cd.)

Metody mikroskopowe w połączeniu z metodami fluorescencyjnymi			
błona plazmatyczna	limfocyty myszy, komórki CH1 <sup>d</sup> limfomy, komórki nerki chomika (BHK) <sup>e</sup> , komórki nabłonkowe aorty wołu (BAE) <sup>f</sup>	1. pochodne fluorescencyjne kwasów tłuszczowych	istnienie domen o różnej strukturze lipidów wchodzących w ich skład
błona plazmatyczna	ludzkie fibroblasty; komórki BAE <sup>f</sup>	2. FRAP <sup>g</sup>	istnienie lipidowo-białkowych domen w płaszczyźnie błony o różnym składzie i różnej dyfuzji lateralnej; stwierdzenie, że połączenia między komórkami stanowią barierę uniemożliwiającą ruch boczny składników w pewnych rejonach błony
błona plazmatyczna	komórki jajowe chomika chińskiego	3. FRAP <sup>g</sup> w połączeniu z badaniami metabolicznymi	istnienie domen lipidowych

Dane zamieszczone w tabeli zaczerpnięto z pracy Glaser [16] omawiającej metody badania domen w płaszczyźnie błon biologicznych, a także uwzględniono wyniki własne.

<sup>a</sup>DSG, ang. *differential scanning calorimetry*;

<sup>b</sup>NMR, ang. *nuclear magnetic resonance*, magnetyczny rezonans jądrowy;

<sup>c</sup>wyniki własne;

<sup>d</sup>CH, ang. *Chinese hamster*, chomik chiński;

<sup>e</sup>BHK, ang. *baby hamster kidney cells*;

<sup>f</sup>BAE, ang. *bovine aortic endothelial cells*;

<sup>g</sup>FRAP, ang. *fluorescence recovery after photobleaching*, nieinwazyjna metoda polegająca na znakowaniu lipidów i białek sondami fluorescencyjnymi w błonie komórek, naświetlaniu określonego rejonu błony wiązką światła laserowego, w celu zniszczenia w tym rejonie znacznika fluorescencyjnego, i mikroskopowej obserwacji powrotu znacznika, dzięki ruchliwości składników błonowych [17, 18].

długołańcuchowych, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, podczas gdy w cząsteczkach fosfolipidów cholinowych występuje w tej pozycji przeważnie reszta kwasu palmitynowego [4-7, 26]. Można zatem przewidywać różnice w płynności obu monowarstw błony. Istotnie, cytoplazmatyczną monowarstwę błony erythrocytu, bogatą w aminofosfolipidy, charakteryzuje niższa mikrolepkość (wyższa płynność), niż mikrolep-

kość przeciwnej monowarstwy.

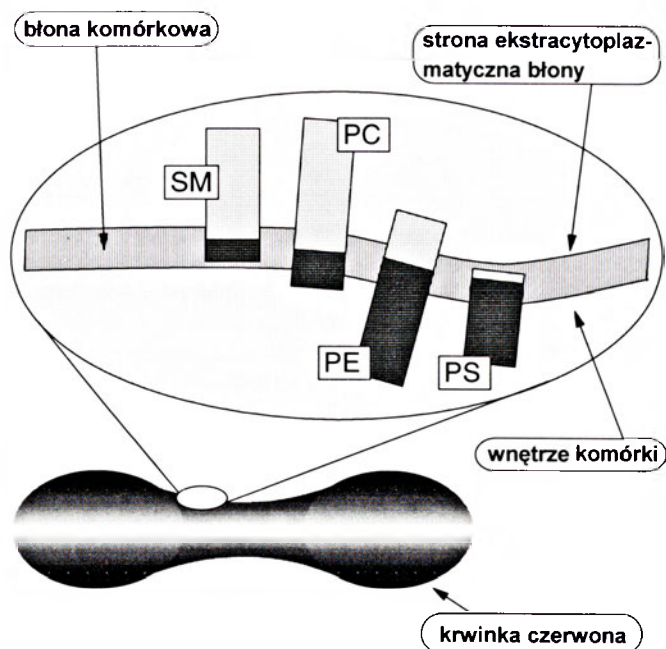
Asymetryczne rozmieszczenie aminofosfolipidów w błonie jest jednym z czynników, który odpowiada za prawidłowy charakter kontaktów pomiędzy komórkami czy oddziaływań elementów cytoszkieletu z błoną. Dzięki temu zjawisku ulegają wytworzeniu rejonu błony plazmatycznej płytek krwi biorące udział w koagulacji komórek po ich aktywacji. Takie rejonu błony

Tabela 2.

Niektóre właściwości fosfolipidów błon biologicznych.

Klasa fosfolipidów	Polarna głowa lipidu	Ładunek wypadkowy	Pole powierzchni w błonie (Å <sup>2</sup> )	Średnia m.c.	Struktury tworzone w błonie
CL	difosfoglicerol	ujemny	~ 100	1450	dwuwarstwowa lub heksagonalna H <sub>II</sub> (+ Ca <sup>2+</sup> )
PA	-OH	ujemny	~ 70	750	dwuwarstwowa lub heksagonalna H <sub>II</sub> (+ Ca <sup>2+</sup> w pH < 6,0 lub -Ca <sup>2+</sup> w pH < 3,0)
PC	fosfocholina	brak	~ 70	750	dwuwarstwa
PE	fosfoetanolamina	brak	~ 70	750	heksagonalna H <sub>II</sub>
PG	fosfoglicerol	ujemny	~ 70	750	dwuwarstwa
PI	fosfoinozytol	ujemny	~ 70	850	dwuwarstwa
PS	fosfoseryna	ujemny	~ 70	750	dwuwarstwa (+ Ca <sup>2+</sup> ) lub heksagonalna H <sub>II</sub> (w pH < 4,0)
SM	fosfocholina	brak	~ 70	750	dwuwarstwa

Dane zamieszczone w tabeli zaczerpnięto z monografii Gennisa [6], Vance'a i Vance [21], Kozubka i wsp. [31] i Watta [22].



Ryc. 3 Asymetryczne rozmieszczenie fosfolipidów w płaszczyźnie poprzecznej błony erythrocytu ludzkiego. Objaśnienia symboli znajdują się w wykazie stosowanych skrótów. Opracowano na podstawie [7, 33, 34].

odgrywają rolę również we wzajemnym rozpoznawaniu się komórek w stanach patologicznych (anemia sierpowata, hemofilia, malaria), lub związanych z procesami ich starzenia się (eliminacja z krwioobiegu starzejących się erytrocytów). We wszystkich wymienionych przypadkach mechanizm zjawiska polega na zniesieniu asymetrii w rozmieszczeniu fosfatydyloseryny, w wyniku zahamowania, przez wzrost stężenia  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie, aktywności translokazy aminofosfolipidów. Dzięki ruchowi *flip-flop* wyrównuje się stężenie PS w obu monowarstwach błony [6, 7, 35].

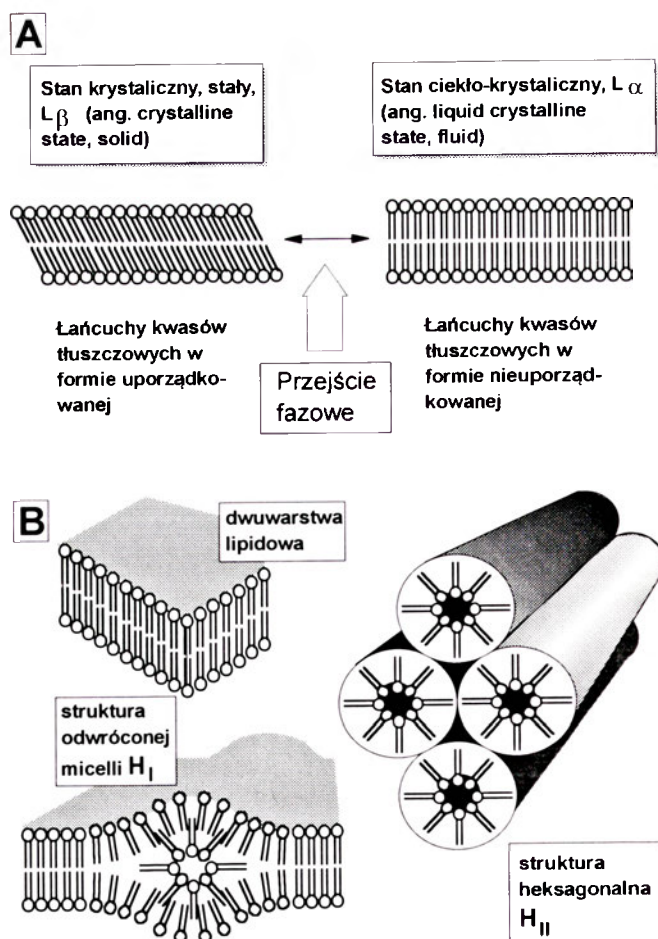
Ważną cechą lipidów błon biologicznych jest również możliwość regulacji lokalnych zmian struktury błony. Zarówno zmiany temperatury, pH, stężenia jonów, jak i peroksydacja lipidów czy specyficzne oddziaływania z białkami integralnymi błony, białkami powierzchniowymi i elementami cytoszkieletu podbłonowego, mogą wpływać na właściwości dwuwarstwowej w strukturę odwróconej micelli  $H_1$  czy heksagonalną  $H_{II}$  [5, 6, 21, 36-38].

### III-1. Fuzja błon

Fuzja błon biologicznych jest zjawiskiem towarzyszącym m.in. egzo- i endocytozie. Wielu badaczy uważa, że w procesie tym istotną rolę odgrywają aminofosfolipidy jako czynniki fuzjogenne. W liposomach zbudowanych z tych fosfolipidów  $Ca^{2+}$  indukuje segregację cząsteczek w płaszczyźnie błony. Domeny fosfatydyloseryny ulegają żelifikacji, cząsteczki PS przestają stabilizować dwuwarstwę, zaś cząsteczki fosfatydyloetanolaminy, zmieniając swoją konfigurację, tworzą struktury heksagonalne  $H_{II}$ . Fos-

fatydyloetanolamina odznacza się bowiem innym współczynnikiem upakowania w błonie niż lipidy tworzące dwuwarstwę (patrz Ryc. 4 i [6]). Powstanie struktur  $H_{II}$  sprzyja fuzji, hemifuzji i lokalnym zmianom kształtu błony (tworzenie wpukleń w trakcie endocytozy). Jeśli w błonie znajduje się cholesterol (30 mol%), w obecności  $Ca^{2+}$  nie dochodzi do segregacji cząsteczek PS i wszystkie lipidy tworzą struktury  $H_{II}$  [5].

Szczególnie ważną funkcję w procesie fuzji pełnią jony wapnia [39]. Odnaczają się one wyższym powinowactwem do anionowych fosfolipidów (stała dysocjacji,  $0,5-1 \times 10^{-1}$  M), w porównaniu z fosfatydylocholiną i fosfatydyloetanolaminą ( $3 \times 10^{-1}$  M) [6]. Dodatkowo w pobliżu powierzchni błony, na skutek oddziaływań pomiędzy różnoimiennymi ładunkami kationu a warstwą przeciwjonów i lipidami anionowymi powstaje zagęszczona warstwa  $Ca^{2+}$  [6]. Pierwszym etapem w procesie fuzji jest zbliżenie się dwóch błon. W procesie tym przeszkodę stanowi warstwa hydratacyjna o grubości 2 nm, będąca fizyczną barierą w zbliżeniu błon. Jony wapnia i fosfatydyloseryna „pozwalają” błonom na bliski kontakt, mimo istnienia warstwy hydratacyjnej [23]. Również lipidy o niskim poziomie hydratacji, np. fosfatydyloetanolamina,



Ryc. 4 Struktury tworzone przez lipidy w błonach. A — zmiana stanu krystalicznego (stały) w ciekło-krystaliczny (płynny) i związana z nią zmiana uporządkowania łańcuchów acylowych w cząsteczkach lipidów; B — przestrzenna organizacja cząsteczek lipidów w błonach [5, 6].

ułatwiają fuzję [40]. Prawdopodobnie zjawisko to może zachodzić na granicy domen o różnym składzie i różnej płynności [41, 42], a także w rejonie błony o strukturze heksagonalnej  $H_{II}$ . Lipidami tworzącymi strukturę  $H_{II}$  i odwróconej micelli są oprócz fosfatydyloetanolaminy, cholesterol, kwasy tłuszczowe, lizofosfolipidy, a także w pewnych warunkach diacyloglicerol, kardiolipina, kwas fosfatydowy i fosfatydyloseryna [6, 7, 26, 43-47].

### III-2. Wpływ lipidów na aktywność enzymów, białek transportujących i receptorowych

Wykazano wprawdzie, że większość lipidów znajdujących się w pobliżu białka integralnego bardzo szybko ( $10^7 \text{ sek.}^{-1}$ ) wymienia się z innymi lipidami błony, ale stwierdzono również, że np. anionowe fosfolipidy (PS, PA), przebywają dłużej w pobliżu białek integralnych [35]. Lipidy mogą zatem regulować aktywność niektórych białek np. receptora insuliny (cholesterol hamuje jego aktywność, kwasy tłuszczowe działają odwrotnie),  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy (cholesterol hamuje aktywność enzymu),  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazy z błony plazmatycznej (enzym aktywowany jest m.in. przez kwaśne fosfolipidy i wielonienasycone kwasy tłuszczowe), receptora acetylocholinyl (aktywność modulowana jest przez cholesterol), czy izoenzymów kinazy białkowej C [5, 15, 26, 32, 35]. W przypadku tego ostatniego enzymu podstawową rolę w modulacji jego aktywności odgrywa wiązanie z fosfatydyloseryną, zaś  $\text{Ca}^{2+}$  i diacyloglicerol podwyższają powinowactwo kinazy do tego fosfolipidu [48, 49].

### III-3. Mechanizmy oddziaływania fosfolipidów z niektórymi białkami

Rozważania dotyczące mechanizmów oddziaływań fosfolipidów z białkami przeprowadzono w oparciu o trzy przykłady: fosfolipaz  $A_2$  z jadu węży (grupy I, II), które wykazują specyficzność w stosunku do fosfolipidów zestyfikowanych w pozycji *sn2* resztą kwasu arachidonowego, izoform kinazy białkowej C, specyficznie oddziałujących z cząsteczkami PS oraz aneksyn, białek które w sposób zależny od stężenia jonów wapnia wiążą się z fosfolipidami anionowymi.

Jeden z lepiej poznanych mechanizmów katalizy enzymatycznej dotyczy reakcji hydrolizy fosfolipidów przez fosfolipazę  $A_2$  z jadu węży. Tworzenie kompleksu enzym/fosfolipid następuje przed związaniem substratu w centrum katalitycznym i jest uwarunkowane zjawiskami zachodzącymi na granicy fazy wodnej i dwuwarstwy lipidowej<sup>4</sup>; fosfolipaza jest aktywniejsza na granicy faz niż w roztworze [35, 50, 51]. Czynnikiem ograniczającym aktywność enzymu jest organizacja strukturalna substratu, gdyż wiązanie hydrolazy zachodzi tylko z lipidami tworzącymi uporządkowaną

strukturę dwuwarstwową. Jakikolwiek zaburzenie takiej struktury błony (przez detergenty, kwasy tłuszczowe, lizofosfolipidy, diacyloglicerol, alkohole, czy zmianę temperatury) obniża aktywność enzymu [35]. Ładunek grupy polarnej fosfolipidu w znaczący sposób zmienia powinowactwo enzymu do substratu, z  $10^{-13} \text{ M}$  w przypadku fosfolipidów anionowych, do  $10^{-6} \text{ M}$  w przypadku fosfolipidów neutralnych [52]. Wiązanie substratu jest odpowiedzialne za aktywację fosfolipazy  $A_2$ , bez zmiany struktury białka, która jest stabilizowana przez 7 mostków S-S [53-55].

Czas półtrwania kompleksu fosfolipaza  $A_2$ /lipid jest stosunkowo długi. W tym okresie białko oddziałuje z 35 cząsteczkami fosfolipidów [52, 56], poruszając się nad określonym rejonem błony i przez bardzo krótki czas wiążąc się z pojedynczą cząsteczką, która ma ulec hydrolizie. Kolejnym etapem (zależnym od  $\text{Ca}^{2+}$ ) jest wejście substratu przez hydrofilowy kanał w białku do centrum aktywnego fosfolipazy. Znajdująca się w centrum aktywnym reszta histydyny, H48, a w jej otoczeniu reszty kwasu asparaginowego, D99 i D49, polaryzują cząsteczkę wody. Zachodzi wtedy atak nukleofilowy na grupę karboksylową w cząsteczce fosfolipidu.  $\text{Ca}^{2+}$  w centrum aktywnym enzymu, koordynowany przez resztę D49, jest czynnikiem kierującym substrat we właściwe miejsce i stabilizującym produkt przejściowy reakcji [50, 51, 54]. Stała powinowactwa procesu dla  $\text{Ca}^{2+}$  wynosi  $10^{-4} \text{ M}$ .

Najlepiej scharakteryzowana fosfolipaza  $A_2$ , enzym wewnątrzkomórkowy, odznacza się wysoką specyficznością wobec kwasu arachidonowego. Enzym wymaga obecności  $\text{Ca}^{2+}$  nie tylko do katalizy, ale również do wiązania z błoną. W procesie tym odgrywa rolę rejon C-końcowy białka [57]. Jedną z cytosolowych fosfolipaz, specyficzna w stosunku do fosfolipidów zawierających kwas arachidonowy, charakteryzuje się obecnością rejonu oddziałującego z  $\text{Ca}^{2+}$ , który jest analogiczny do domeny wiążącej fosfolipidy anionowe w cząsteczce kinazy białkowej C [58].

Kinaza białkowa C jest zaangażowana w regulacji wielu procesów w komórce, w tym egzocytozy, aktywności receptorów, ekspresji genów i proliferacji komórek [15, 35, 59-61]. Znanych jest ponad dziesięć izoenzymów PKC o podobnej budowie cząsteczki, charakteryzującej się obecnością N-końcowej domeny regulatorowej, zawierającej miejsca wiążące dla fosfolipidów i diacyloglicerolu oraz domeny odpowiedzialnej za aktywność enzymatyczną. Izoenzymy te dzieli się na trzy podrodziny: o aktywności zależnej od  $\text{Ca}^{2+}$  i diacyloglicerolu, zależnej tylko od diacyloglicerolu lub niezależnej od obu wymienionych związków [62, 63]. W cytosolu enzym występuje w formie nieaktywnej. Jeśli w wyniku pobudzenia komórki w błonie plazmatycznej powstanie 1,2-diacyloglicerol (produkt specyficznej w stosunku do fosfatydylocholinyl fosfolipazy  $C_c$ ), kinaza ulega związaniu z błoną i aktywacji. Proces wymaga  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\leq 10^{-6} \text{ M}$  w obecności diacyloglicerolu) i cząsteczek fosfatydyloseryny;

<sup>4</sup> ang. *interfacial activation*

enzym jest również aktywowany przez estry forbolu [59]. Przyjmuje się, że po aktywacji kinaza białkowa C wiąże się z fosfolipidami błony (przede wszystkim z cząsteczkami fosfatydyloseryny, które grają rolę koenzymu), podczas gdy diacyloglicerol działa jak aktywator, być może wspólnie z fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanem przyłączającym się do innego miejsca wiążącego w cząsteczce białka [64] i *cis*-nienasyconymi kwasami tłuszczowymi [65]. Co do liczby wiązanych cząsteczek fosfatydyloseryny przez enzym panuje wśród badaczy duża rozbieżność [15, 35, 66, 67].

B a z z i i N e l s e s t u e n [68, 69] przyczynili się do częściowego wyjaśnienia mechanizmu oddziaływania PKC z lipidami. Enzym, po związaniu z błoną, przyjmuje dwa podstawowe stany konformacyjne. Pierwszy, w obecności  $Ca^{2+}$  (ulega odwróceniu po usunięciu kationów), drugi zaś białko przyjmuje w obecności estrów forbolu. Wiązanie  $Ca^{2+}$  przez kinazę jest procesem kooperatywnym (wysoki współczynnik Hilla), zależnym od obecności fosfolipidów [35, 70]. Związaniu z cząsteczką enzymu ulega co najmniej osiem jonów [71]. Kinaza białkowa C wiąże się z fosfolipidami z wysokim powinowactwem. Mechanizm wiązania jest sekwencyjny i prowadzi do wiązania ponad 10 cząsteczek aminofosfolipidów z cząsteczką białka [72, 73].

Wysoką specyficzność w stosunku do fosfolipidów anionowych wykazują aneksyny. Aneksyny (oznaczone rzymskimi cyframi od I do XIII) tworzą grupę homologicznych białek rozpuszczalnych, wiążących fosfolipidy i  $Ca^{2+}$ . Niektóre ich właściwości zbliżają je wprawdzie do białek integralnych błony, ale powszechnie uznaje się, że oddziaływanie aneksyn z dwuwarstwą lipidową w obecności  $Ca^{2+}$  jest zjawiskiem powierzchniowym [74-76]. Od tej reguły są wyjątki. Na przykład odporność izoform aneksyn V i VI z tkanek wołu na ekstrakcję EGTA i możliwość solubilizacji z błony tylko z użyciem detergentu jest charakterystyczna dla białek integralnych [75]. Kontrowersje wzbudza także zdolność aneksyny V do tworzenia zależnych od potencjału błonowego kanałów wapniowych [77-81]. Jeden z poważniejszych zarzutów opiera się na fakcie, że segmenty o strukturze  $\alpha$ -helikalnej w cząsteczce aneksyny V są o 6-8 reszt aminokwasowych krótsze, niż segmenty transbłonowe o tej strukturze w cząsteczkach białek integralnych błony [77]. Co więcej, wnikanie aneksyny w hydrofobowy rejon błony, zważywszy na duże powierzchnie hydrofilowe w jej cząsteczce, wymagałoby olbrzymich zmian struktury trzeciorzędowej, a tego nigdy nie obserwowano [8, 82]. Przyjmuje się więc, że wiązanie aneksyny V z błoną polega na wywoływaniu przez to białko miejscowego zaburzenia struktury dwuwarstwy lipidowej, co prowadzi do jej zwiększonej przepuszczalności dla elektrolitów [80]. Reorganizacja dwuwarstwy lipidowej może być również, jak się wydaje, spowodowana oddziaływaniem związanych z aneksyną jonów wapnia z grupami fosforanowymi fos-

folipidów i zmianą geometrii ich cząsteczki lub zaburzeniem przez aneksynę lokalnego pola elektrostatycznego i utworzeniem hydrofilowych porów w błonie [8, 80, 83].

Powierzchniowy charakter oddziaływania aneksyn z błoną został potwierdzony przez Newmana i w s p. [84, 85]. Badacze ci stwierdzili, że wiązanie aneksyny VI z monowarstwą lipidową w obecności  $Ca^{2+}$  w niewielkim stopniu podwyższa ciśnienie powierzchniowe monowarstwy utworzonej z aminofosfolipidów. Badania z zastosowaniem metody rozpraszania neutronów<sup>5</sup> wykazały, że aneksyna V tworzy na powierzchni jednowarstwowych liposomów warstwę o grubości 3,5 nm. Znając wielkość cząsteczki białka (~3,0 nm) można wnioskować, że aneksyna V nie wnika w dwuwarstwę lipidową [86]. Do podobnych konkluzji doszli Pigault i w s p. [87], analizując strukturę dwuwymiarowych kryształów aneksyny V. Konsekwencje wiązania aneksyny V z liposomami badano także przy użyciu spektroskopii NMR i kriomikroskopii elektronowej. Stwierdzono brak wpływu białka na ruchy segmentalne łańcuchów acylowych reszt kwasów tłuszczowych fosfolipidów. Równolegle zaobserwowano znaczący wpływ aneksyny na zmiany konfiguracyjne w reszcie fosforanowej główki fosfolipidów [88-90] i redukcję krzywizny błony [8, 91]. Fakty te przemawiają za koncepcją, że wiązanie aneksyn z lipidami odbywa się bez penetracji białka w dwuwarstwę lipidową i wprowadza w błonie rodzaj miejscowego zaburzenia, bez zniszczenia integralności dwuwarstwy.

Oddziaływanie aneksyny z dwuwarstwą lipidową może dodatkowo wpływać na zmiany ruchu bocznego fosfolipidów w błonie [92] i segregację cząsteczek fosfolipidów, czyli tworzenie i rozpad domen [71-73]. Sobota i w s p. [93], stosując pomiar widm EPR liposomów o zdefiniowanym składzie wykazali, że aneksyna IV i aneksyna VI rozbijają kompleksy  $Ca_n(PS)_m$  w błonie, w wyniku powstawania niekowalencyjnych połączeń aneksyna-lipid przez mostki wapniowe. W nieobecności aneksyn, kompleksy  $Ca_n(PS)_m$  mogłyby tworzyć zaczątki większych domen w płaszczynie błony, wzbogaconych w fosfatydyloserynę.

W tabeli 3 zebrano przykłady innych białek specyficznie oddziałujących z lipidami.

#### IV. Podsumowanie

W płynno-mozaikowym modelu budowy błony biologicznej przyjęto założenie, że lipidy w formie dwuwarstwy tworzą środowisko dla integralnych i powierzchniowych białek błonowych, w którym cząsteczki białek mogą poruszać się w nieskrępowany sposób. Bezpośrednią konsekwencją tego założenia jest, że białka i lipidy są w przypadkowy sposób rozmiesz-

<sup>5</sup> SANS, *ang. small-angle neutron scattering* [86]



**Tabela 3.**

Niektóre białka i oddziałujące z nimi klasy lipidów.

Białka	Lipidy
$\alpha$ -spektryna	PS, PE
białko pasma 4.1	PS
białko pasma 4.1/glikoforyna C	PIP, PIP <sub>2</sub>
$\alpha$ -aktylina	DAG, FA
profilina/profilaktyna	PIP <sub>2</sub> , PIP
żelzolina	PIP <sub>2</sub>
aneksyny I-XIII	PA > PS > PI > PE
winkulina	PI, PIP <sub>2</sub> , PS
białko z mikrokosmków jelitowych o m.cz. 110 kDa	PE, PS, PA, PI, PC
izoformy kinazy białkowej C	PS, PA, PI, DAG, FA
kinaza pp60 <sup>src</sup> oraz inne kinazy serynowo-treoninowe i tyrozynowe	PS, DAG, PI, PIP, PIP <sub>2</sub> , FA
białka zależne od witaminy K	PS, PA, PI
zasadowe białko mielinowe	PS > PL > PA > PG > PI > PE > PC
cytochrom c	CL > PS $\approx$ PI > PC $\approx$ PE
fosfolipazy A <sub>2</sub> (grupy I, II, IV)	fosfolipidy zawierające kwas arachidonowy
fosfolipazy C <sub>i</sub> i C <sub>c</sub>	PI i pochodne PI (PLC <sub>i</sub> ) oraz PC (PLC <sub>c</sub> ), a także zawierające kwas arachidonowy
lizozym	CL > PG > PE > PC > PS > PI

Tabelę opracowano na podstawie prac przeglądowych i doświadczalnych dotyczących białek cytoszkieletu [6, 94-99], białek oddziałujących z aktyną [94, 95, 100], fosfolipaz [23, 50-53], izoform kinazy białkowej C [71-73, 101], aneksyn [44, 74-76] i innych białek [6, 13, 19, 23, 94, 102-104].

czone w błonie [3]. W rzeczywistości wiele zebranych w niniejszej pracy obserwacji świadczy o czymś przeciwnym. W błonach biologicznych występuje przestrzenna regionalizacja składników. Regionalizacja ta ma charakter mikro- i makrodomen, i obejmuje obie powierzchnie błony. Domeny to wyspecjalizowane ponadcząsteczkowe struktury o różnej wielkości, istniejące w różnej skali czasowej. Pomiedzy ich chemicznym składem, stanem fizycznym, organizacją a funkcją istnieje ścisły związek [3, 9, 13]. Rozdział lipidów pomiedzy różnymi domenami może być wynikiem zmian w szybkości ruchu bocznego cząsteczek, zjawiska wzajemnego nie mieszania się składników w tej samej fazie, a także oddziaływania lipidów z powierzchniowymi i integralnymi białkami błonowymi [9]. Wyspecjalizowane domeny lipidowe mogą pełnić

w komórce istotne funkcje, wpływać na stopień i szybkość reakcji w błonie oraz funkcjonować jako receptory dla specyficznych białek. Szczególnie dotyczy to białek powierzchniowych, których aktywność jest regulowana w wyniku niekowalencyjnego wiązania się z lipidami błonowymi [13]. Domeny lipidowe są zaangażowane także w tak ważnych dla komórki procesach, jak rozdział lipidów pomiedzy różne przedziały komórkowe oraz egzo- i endocytoza [9].

Praca finansowana z grantu KBN nr 6PO4A01408.

Artykuł otrzymano 6września 1995 r.  
Zaakceptowano do druku 18 września 1995 r.

## Piśmiennictwo

- Jacobson K, Vaz WLC (red) (1992) *Comm Mol Cell Biophys* 8: 1-114
- Singer SJ, Nicolson GL (1972) *Science* 175: 720-731
- Tocanne JF, Cezanne L, Lopez A, Pikhova B, Schram V, Tournier JF, Welby M (1994) *Chem Phys Lipids* 73: 139-158
- Op den Kamp JAF (red) (1994) W: *Biological Membranes: Structure, Biogenesis and Dynamics*. NATO ASI Series H: Cell Biology t 82. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, str 356
- Cullis PR, Hope MJ (1991) W: Vance DE, Vance J (red) *New Comprehensive Biochemistry* t 20. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, str 1-42
- Gennis RB (1989) W: Cantor ChR (red) *Springer Advanced Texts in Biochemistry*. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, str 533
- Zachowski A (1993) *Biochem J* 294: 1-14
- Brown D, Rose J (1992) *Cell* 58: 533-544
- Welti R, Glaser M (1994) *Chem Phys Lipids* 73: 121-137
- Edidin M (1992) *Trends Cell Biol* 2: 376-386
- Edidin M (1992) *Comm Mol Cell Biophys* 8: 73-82
- Thompson TE, Sankaram MB, Biltonen RL (1992) *Comm Mol Cell Biophys* 8: 1-15
- Kinnunen PK, Koiv A, Lehtonen JY, Rytomaa M, Mustonen P (1994) *Chem Phys Lipids* 73: 181-207
- Arts EG, Jager S, Hoekstra D (1994) *Biochem J* 304: 211-218
- Sandermann JrH, Duncan TM, McIntyre JO, Fleisher S (1993) W: Watts A (red) *New Comprehensive Biochemistry* t 25. *Protein-Lipid Interactions*. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, str 67-86
- Glaser M (1992) *Comm Mol Cell Biophys* 8: 37-52
- Tocanne JF (1992) *Comm Mol Cell Biophys* 8: 53-72
- Tocanne JF, Dupou-Cezanne L, Lopez A, Tournier JF (1989) *FEBS Lett* 257: 10-16
- Mouritsen OG, Biltonen RL (1993) W: Watts A (red) *New Comprehensive Biochemistry* t 25. *Protein-Lipid Interactions*. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, str 1-40
- Vaz WLC, Almeida PFF (1993) *Curr Opin Struct Biol* 3: 482-488
- Vance DE, Vance J (red) (1991) *New Comprehensive Biochemistry* t 20. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, str 596
- Watts A (red) (1993) *Protein-Lipid Interactions*. *New Comprehensive Biochemistry* t 25. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, str 379
- Hoekstra D (red) (1994) *Current Topics in Membranes* t 40. *Cell Lipids*. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, str 638
- Lee GM, Jacobson K (1994) W: Hoekstra D (red) *Current Topics in Membranes* t 40. *Cell Lipids*. Academic

- Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, str 111-142
25. Wolf DE (1994) W: Hoekstra D (red) *Current Topics in Membranes* t 40. Cell Lipids. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, str 143-165
  26. Devaux PF (1991) *Biochemistry* **30**: 1163-1173
  27. Haverstick DM, Glaser M (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 4475-4479
  28. Van Dijk PWM, de Kruijff B, Verkleij AJ, Van Deenen LLM, de Gier J (1978) *Biochim Biophys Acta* **512**: 84-96
  29. Feigenson GW (1989) *Biochemistry* **28**: 1270-1278
  30. Arts EG, Kuiken J, Jager S, Hoekstra D (1993) *Eur J Biochem* **217**: 1001-1009
  31. Kozubek A, Sikorski FA, Szopa J (1993) W: Kozubek A (red) Molekularna organizacja komórki. Skrypt do ćwiczeń t II. Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław, str 115
  32. Pikuła S, Epstein L, Martonosi A (1994) *Biochim Biophys Acta* **1196**: 1-13
  33. Verkleij AJ, Zwaal RFA, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D, Van Deenen LLM (1973) *Biochim Biophys Acta* **323**: 178-193
  34. Roelofsen B, Op den Kamp JAF (1994) W: Hoekstra D (red) *Current Topics in Membranes* t 40. Cell Lipids. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, str 7-46
  35. Bienvenüe A, Sainte Marie J (1994) W: Hoekstra D (red) *Current Topics in Membranes* t 40. Cell Lipids. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, str 319-356
  36. Op den Kamp JAF, Roelofsen B, Wirtz KWA (red) (1986) *Lipids and Membranes. Past, Present and Future*. Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division), Amsterdam, Oxford, New York, str 336
  37. Papahadjopoulos D, Nir S, Düzgünes N (1990) *J Bioenerg Biomembr* **22**: 157-179
  38. White JM (1992) *Science* **258**: 917-923
  39. Jacobson K, Papahadjopoulos D (1975) *Biochemistry* **14**: 152-161
  40. Hoekstra D (1982) *Biochemistry* **21**: 2833-2840
  41. Massari S, Colonna R (1988) *Ann Ist Super Sanità* **24**: 59-70
  42. Burger KNJ, Verkleij AJ (1990) *Experientia* **46**: 631-645
  43. Severs NJ, Robenek H (1983) *Biochim Biophys Acta* **737**: 373-408
  44. Blackwood RA, Ernst JD (1990) *Biochem J* **266**: 195-200
  45. Burgoyne RD, Morgan A (1993) *Biochem J* **293**: 305-316
  46. Allan D, Kallen K-J (1994) *Trends Cell Biol* **4**: 350-353
  47. Rodgers W, Glaser M (1993) *Biochemistry* **32**: 12591-12598
  48. Bazzi MD, Youakim MA, Nelsestuen GL (1992) *Biochemistry* **31**: 1125-1134
  49. Yang L, Glaser M (1995) *Biochemistry* **34**: 1500-1506
  50. Scott DL, White SP, Otwinowski Z, Yuan W, Gelb MH, Sigler PB (1990) *Science* **250**: 1541-1546
  51. Dennis EA (1994) *J Biol Chem* **269**: 13057-13060
  52. Ramirez F, Jain MK (1991) *Proteins* **9**: 229-239
  53. Waite M (1987) W: Hanahan DJ (red) *Handbook of Lipid Research* t 40. Plenum Press, New York, London, str 332
  54. Waite M (1991) W: Vance DE, Vance J (red) *New Comprehensive Biochemistry* t 20. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, str 269-296
  55. Schalkwijk CG, Märki F, Van den Bosch H (1990) *Biochim Biophys Acta* **1044**: 139-146
  56. Berg OG, Hu BZ, Rogers J, Jain MK (1991) *Biochemistry* **30**: 7283-7297
  57. Coussens L, Parker PJ, Rhee L, Yang-Fang TL, Chen E, Waterfield MD, Franke U, Ullrich A (1986) *Science* **233**: 859-866
  58. Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Remesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JK (1991) *Cell* **65**: 1043-1051
  59. Nishizuka Y (1988) *Nature (Lond)* **334**: 661-665
  60. Vance DE (1991) W: Vance DE, Vance J (red), *New Comprehensive Biochemistry* t 20. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, str 205-240
  61. Azzi A, Boscoboinik D, Hensey C (1992) *Eur J Biochem* **208**: 547-557
  62. Hug H, Sarre TF (1993) *Biochem J* **291**: 329-343
  63. Diveche N, Irvine RF (1995) *Cell* **80**: 269-270
  64. Lee MH, Bell RM (1991) *Biochemistry* **30**: 1041-1049
  65. Shinomura T, Asoaka Y, Oka M, Yoshida K, Nishizuka Y (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5149-5153
  66. Newton A, Koshland Jr DE (1989) *J Biol Chem* **264**: 14909-14915
  67. Newton A, Koshland Jr DE (1990) *Biochemistry* **29**: 6656-6661
  68. Bazzi MD, Nelsestuen GL (1988) *Biochem Biophys Res Commun* **152**: 336-343
  69. Bazzi MD, Nelsestuen GL (1988) *Biochemistry* **27**: 7589-7593
  70. Bazzi MD, Nelsestuen GL (1990) *Biochemistry* **29**: 7624-7630
  71. Bazzi MD, Nelsestuen GL (1991) *Biochemistry* **30**: 7970-7977
  72. Bazzi MD, Nelsestuen GL (1991) *Biochemistry* **30**: 7961-7969
  73. Bazzi MD, Nelsestuen GL (1992) *Biochemistry* **31**: 10406-10413
  74. Raynal P, Pollard HB (1994) *Biochim Biophys Acta* **1197**: 63-93
  75. Swairjo MA, Seaton BA (1994) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **23**: 193-213
  76. Liemann S, Lewit-Bentley A (1995) *Structure* **3**: 233-238
  77. Huber R, Römisch J, Pâques EP (1990) *EMBO J* **9**: 3867-3874
  78. Huber R, Schneider M, Mayr I, Römisch J, Pâques EP (1990) *FEBS Lett* **275**: 15-21
  79. Huber R, Berendes R, Burger A, Luecke H, Karshikov A (1992) W: Moss SE (red) *The Annexins*. Portland Press, London, Chapel Hill, str 105-124
  80. Huber R, Berendes R, Burger A, Schneider M, Karshikov A, Luecke H, Römisch J, Pâques EP (1992) *J Mol Biol* **223**: 683-704
  81. Demange P, Voges D, Benz J, Liemann S, Gottig P, Berendes R, Burger A, Huber R (1994) *Trends Biochem Sci* **19**: 272-276
  82. Goossens ELJ, Reutelingsperger CHPM, Jongasma FHM, Kraayenhof R, Hormens WTH (1995) *FEBS Lett* **359**: 155-158
  83. Karshikov A, Berendes R, Burger A, Cavalié A, Lux H-D, Huber R (1991) *Eur Biophys J* **20**: 337-344
  84. Newman R, Leonard K, Crumpton MJ (1991) *FEBS Lett.* **279**: 21-24
  85. Newman R, Tucker A, Ferguson C, Tsernoglou D, Leonard K, Crumpton MJ (1989) *J Mol Biol* **206**: 213-219
  86. Ravanat C, Torbet J, Freyssinet J-M (1992) *J Mol Biol* **226**: 1271-1278
  87. Pigault C, Follenius-Wund A, Schmutz M, Freyssinet JM, Brisson A (1994) *J Mol Biol* **236**: 199-208
  88. Lewit-Bentley A, Morera S, Huber R, Bodo G (1992) *Eur J Biochem* **210**: 73-77
  89. Lewit-Bentley A, Bentley GA, Favier B, L'Hermitte G, Renouard M (1994) *FEBS Lett* **345**: 38-42
  90. Sopkova J, Gallay J, Vincent M, Pancoska P, Lewit-Bentley A (1994) *Biochemistry* **33**: 4490-4499
  91. Andree HAM, Stuart MCA, Hermens WT, Reutelingsperger CHPM, Hemker HC, Frederic PM, Willems GM (1992) *J Biol Chem* **267**: 17907-17912
  92. Meers P, Daleke D, Hong K, Papahadjopoulos D (1991) *Biochemistry* **30**: 2903-2908
  93. Sobota A, Bendorowicz J, Jezierski A, Sikorski AF (1993) *FEBS Lett* **315**: 178-182
  94. Burn P (1988) *Trends Biochem Sci* **13**: 79-83
  95. Heizmann CW (red) (1991) *Novel Calcium-Binding Prote-*

ins. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, str 624

96. Luna EJ, Hitt AL (1992) *Science* **258**: 955-964

97. Pumphlin DW, Bloch RJ (1993) *Trends Cell Biol* **3**: 113-117

98. Sikorski AF, Białkowska K, Bisikirska B, Szopa J (1993) *Post Biochem* **3**: 50-59

99. Sikorski AF, Diakowski W, Kuczek M (1993) *Post Biol Kom* **20**: 93-110

100. Isenberg G (1991) *J Muscle Res Cell Motil* **12**: 136-144

101. Bazzi MD, Nelsestuen GL (1987) *Biochemistry* **26**: 115-122.

102. Reithmeier RAF (1991) W: Vance DE, Vance J (red) *New Comprehensive Biochemistry* t 20. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, str 525-578

103. Marsh D (1993) W: Watts A (red) *New Comprehensive Biochemistry* t 25. *Protein-Lipid Interactions*. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, str 41-66

104. Sankaram MB, Marsh D (1993) W: Watts A (red) *New Comprehensive Biochemistry* t 25. *Protein-Lipid Interactions*. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, str 127-162

## Rola allosterycznej RNazy L w indukowanym przez interferon układzie obronnym komórki

### The role of allosteric RNase L in interferon-induced defence system of the cell

ANDRZEJ WIERZBICKI\*

#### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Występowanie układu 2-5A/RNaza L
- III. Zmiany aktywności RNazy L w czasie wzrostu i różnicowania komórki
- IV. Budowa RNazy L
- V. Aktywacja enzymu i budowa liganda 2-5A
- VI. Oddziaływanie strukturalne aktywator — enzym
- VII. Swoistość substratowa
- VIII. Lokalizacja genu RNazy L — RNS4
- IX. Wykorzystanie RNazy L w diagnostyce medycznej i leczeniu niektórych schorzeń

#### Contents:

- I. Introduction
- II. Distribution of the 2-5A/RNase L system
- III. Changes in activity of the 2-5A system during cell growth and differentiation
- IV. Structure of RNase L
- V. Activation of the enzyme and structure of the ligand
- VI. Structural interactions between the enzyme and the activator
- VII. Substrate specificity
- VIII. Localization of the RNase L gene
- IX. Medical correlations

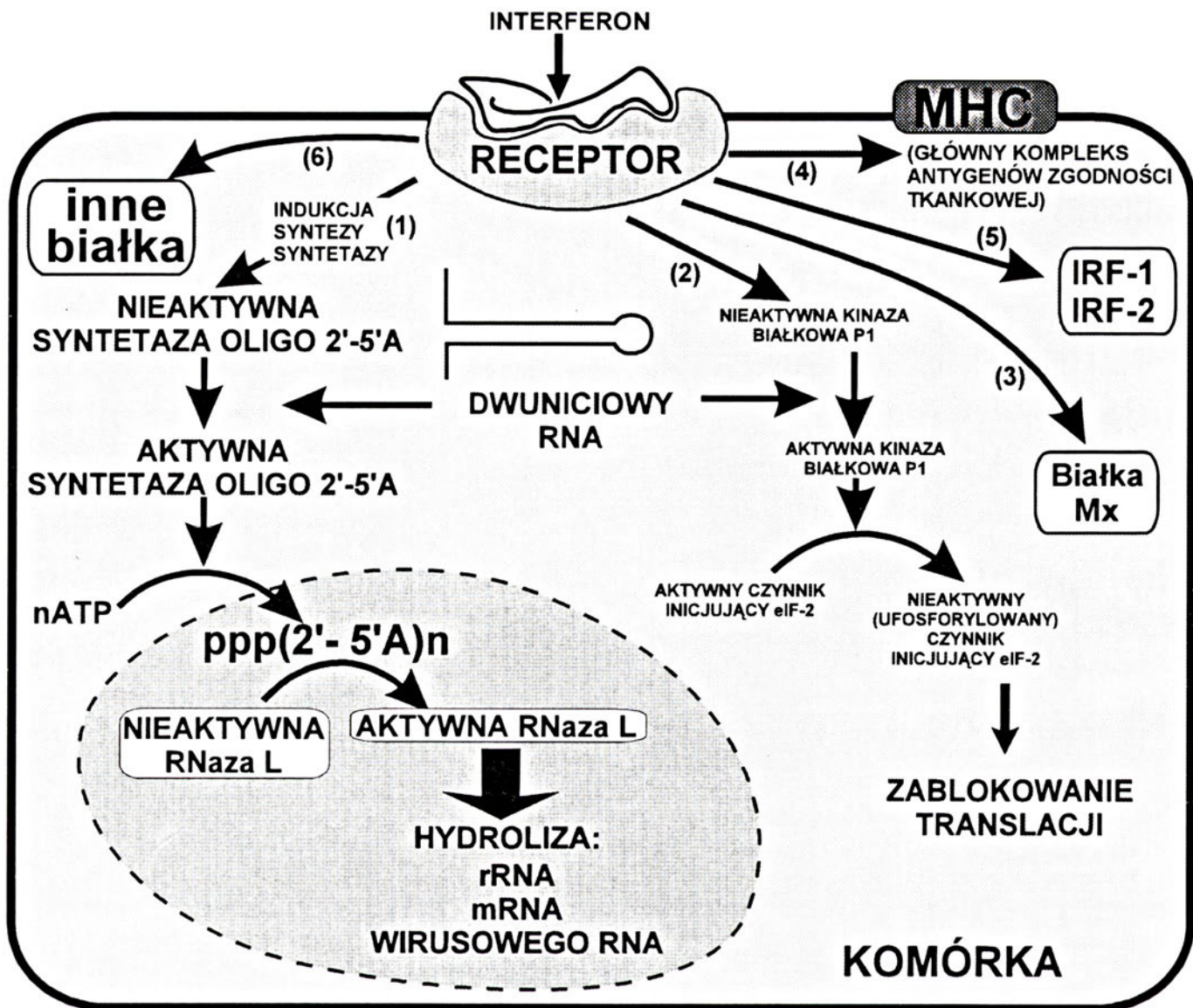
**Wykaz stosowanych skrótów:** 2-5A — oligonukleotyd o budowie  $p_x(A)_2p_5'(A)_n$ , gdzie  $x = 1 \div 3$ ,  $n = 2 \div 4$ ; jeżeli w tekście nie jest to osobno zaznaczone, 2-5A oznacza  $p_3(A)_2p_5'(A)_2$ , czyli 5' trifosfo-adenylo-(2'-5')-adenylo-(2'-5')-adenozynę; AS RNA — antysensowny RNA; 2-5AS — syntetaza 2-5A (ATP: (2'-5')oligo(A) adenylotransferaza, EC 2.7.7.1); cDNA — DNA komplementarny do mRNA; dsRNA — dwuniciowy RNA; EBV — wirus Epsteina-Barr (*Epstein-Barr virus*, herpesowirus) HBV — wirus zapalenia wątroby typu B (*hepatitis B-virus*); eIF2 $\alpha$  — eukariotyczny czynnik inicjacji translacji (podjednostka alfa); EMCV — wirus zapalenia mięśnia sercowego i mózgu (*encephalomyocarditis virus*, pikornawirus); HSV — wirus opryszczki (*herpes simplex virus*, herpesowirus), HIV — wirus nabytego zespołu niedydolności immunologicznej (*human immunodeficiency virus*, retrowirus); IFV — wirus grypy (*influenza virus*, ortomyksowirus), MGV — wirus Mengo (*mengovirus*, pikornawirus); MHC — główny kompleks antygenów zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex*); PK-1 (PKR) — aktywowana przez dsRNA kinaza białkowa fosforylująca podjednostkę  $\alpha$  czynnika eIF-2 (2-go eukariotycznego czyn-

nika inicjującego translację); RNaza L (= RNaza F, DRNaza) — nukleaza hydrolizująca jednoniciowy RNA aktywowana przez oligonukleotyd 2-5A [EC 3.1.27]; RNS4 — ludzki gen kodujący 2-5A zależną RNazę L; SFV — wirus lasu Semliki (*Semliki Forest virus*); VSV — wirus pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej (*vesicular stomatitis virus*).

## I. Wprowadzenie

Interferony indukują działanie układu obronnego kręgowców przed wirusami, bakteriami, pasożytami i niektórymi nowotworami [1-3]. Działanie interferonów wywołuje w metabolizmie komórki docelowej szereg zmian, polegających na rozpoczęciu lub wzmożeniu syntezy wielu różnych białek (do tej pory wykryto ich ponad 30 — roli części z nich jeszcze nie znamy) (Ryc. 1) [1-4]. Interferon pobudza wewnątrzkomórkowy układ obronny indukując lub zwiększając syntezę jego części składowych: (1) syntetazy oligo-(2-5A) i RNazy L; (2) kinazy białkowej P1; (3) białek

\*Mgr, Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej, A.M. im. Karola Marcinkowskiego, ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań



Ryc. 1 Miejsce RNazy L w układzie obronnym komórki (zakreślone linią przerywaną). Interferon powoduje indukcję lub zwiększenie syntezy szeregu białek: (1) syntetazy oligonukleotydów 2'-5'A, (2) kinazy białkowej P1, (3) białek Mx, (4) głównego kompleksu antygenów zgodności tkankowej (MHC), (5) czynników IRF, (6) innych białek; roli części z nich dotychczas nie znamy. (1) i (2) do swej aktywności wymagają obecności aktywującego je dwuniciowego RNA. Wynikiem działania interferonu jest zahamowanie namnażania wirusa bądź podziałów komórki.

Mx; (4) głównego kompleksu antygenów zgodności tkankowej (MHC); (5) czynników transkrypcyjnych interferonów (IRF); (6) białek innych niż w/w; funkcji niektórych z nich dotychczas bliżej nie określono [3]. Ponieważ, wymienione wyżej jako (1)-(6), części wewnątrzkomórkowego układu obronnego działają w ramach komórki jako odrębne całości, dlatego nazywane są układami, np. syntetaza 2-5A wytwarzająca oligo 2'-5'A i zależna od niej RNaza L są określane jako układ 2-5A/RNaza L (ang. *system 2-5A lub system 2-5A/RNaza L*), dalej: układ 2-5A. Części wewnątrzkomórkowego układu obronnego (1)-(6) uzupełniają wzajemnie swoje działania, przy czym każda z nich przypuszczalnie zwalcza inne wirusy. Układ 2-5A/RNaza L: (1) hamuje (i) namnażanie MGV i EMCV (pikornawirusy); (ii) wirusa ospy bydłowej (poxowirus) [2,5-8] i HIV (retrowirus) [3a, 9, 9a]; (iii) w ograniczonym stopniu opryszczki (HSV, herpetowirus) i pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV, rabdowirus)

[6-8, 10]; (2) bierze udział w degradacji mRNA, rRNA oraz kontroli wzrostu i różnicowania komórek [1-3, 11-13]; (3) odgrywa rolę w zwalczaniu nowotworów [14, 15]. Ludzkie białko MxA hamuje namnażanie wirusa grypy (IFV; ortomyksowirus) [12] i VSV, nie działa natomiast na pikornawirusy (MGV i EMCV) i wirusa lasu Semliki (SFV). U myszy białko Mx1 wykazuje wybiórcze działanie przeciw IFV [2].

Kinaza białkowa P1 występuje w niewielkich ilościach w komórkach nie poddanych działaniu interferonu. Jego działanie wywołuje znaczny przyrost ilości tego enzymu. Wirusowy dwuniciowy RNA aktywuje kinazę P1, w wyniku czego najpierw ulega ona autofosforylacji, a następnie fosforyluje podjednostkę eIF-2 $\alpha$  unieczynnając ją i hamując w ten sposób syntezę białka w komórce. W taki sposób hamowane jest namnażanie VSV [16], pikornawirusów (np. Mengo), reowirusów i adenowirusów. Substancje hamujące aktywność kinazy P1 wytwarzane są przez wirusy IFV,

polio, HIV, ospy i adenowirusy [2, 9a]. Mechanizmu hamowania replikacji wirusów SV40, HBV (*hepatitis type—B virus*) i HSV (*herpes simplex virus*) nadal nie znamy [2].

Dwuniciowy RNA — jeden z produktów pośrednich replikacji RNA wirusów aktywuje indukowane przez interferon syntetazy oligonukleotydów 2-5A (Ryc. 1). Występują one w komórce w postaci kilku (do 4) izoenzymów, o masie cząsteczkowej ( $M_w$ ) 40 do 100 kDa [3, 3a, 6, 11, 17-20]. Syntetyzowane przez syntetazy oligonukleotydy 2-5A już w stężeniach nanomolowych aktywują nieaktywną RNazę L (m.in. [2, 3, 13, 21, 22]). W komórkach HeLa poddanych działaniu interferonu i zakażonych wirusem EMCV stwierdzono obecność dwuniciowego RNA tego wirusa związanego z syntetazą 2-5A [21]. Podanie interferonu powoduje w komórkach mysich linii L929 ok. 3-krotny wzrost ilości RNazy L i kodującego ją mRNA, z maksymalnym efektem po ok. 14 godzinach [24]. W przypadku komórek niepoddanych działaniu interferonu i zakażonych EMCV zaktwowana przez dwuniciowy RNA wirusa syntetaza wytwarza zwiększone ilości 2-5A, jednak hamowana przez wirusa RNaza L pozostaje nieaktywna [23]. Ciągła ekspresja kodowanej przez cDNA 2-5A syntetazy hamuje replikację pikornawirusów i namnażanie się komórek [21]. Ekspresja nieaktywnej formy RNazy L, wiążącej 2-5A w mysich komórkach linii SVT2 powoduje, że podanie interferonów  $\alpha$  i  $\beta$  nie chroni komórek przed zakażeniem wirusem EMCV. Produkowana w dużych ilościach uszkodzona, lecz nadal wiążąca 2-5A forma enzymu wychwytuje specyficznie swój normalnie aktywujący ją ligand nie dopuszczając do pełnej aktywacji układu 2-5A [16].

## II. Występowanie układu 2-5A/RNaza L

Układ 2-5A/RNaza L występuje u gadów, ptaków i ssaków [1, 2, 4, 13, 24-26]. Jego obecności nie stwierdzono u ryb, owadów i roślin [25, 27]. RNaza L występuje w niewielkich ilościach (ok. 0,44 mg/kg w wątrobie myszy [18], w nieco większych ilościach w śledzionie — 3,7 mg/kg białka [28]) w komórkach większości tkanek jako enzym konstytutywny [2, 9, 16, 18, 29-31]. W większych ilościach RNaza L występuje w trofoblastach łożyska, gdzie stanowi składnik bariery ochronnej pomiędzy organizmem matki i płodu [32]. Aktywność układu 2-5A/RNaza L zmienia się z wiekiem: w wątrobie starych szczurów aktywność RNazy L jest 5-6 krotnie niższa niż w wątrobie zwierząt dorosłych, choć ilość enzymu zmienia się tylko nieznacznie. Również aktywność syntetazy 2-5A zmienia się w czasie życia: silnie wzrasta po urodzeniu, osiąga maksimum u osobników młodych i w wieku średnim, a później spada. Natomiast aktywność 2'-3' egzonukleazy hydrolizującej 2-5A [EC 3.1.13.4] i hamującej w ten sposób układ 2-5A wzrasta w ciągu życia (ok. 3-krotnie) [33, 33a].

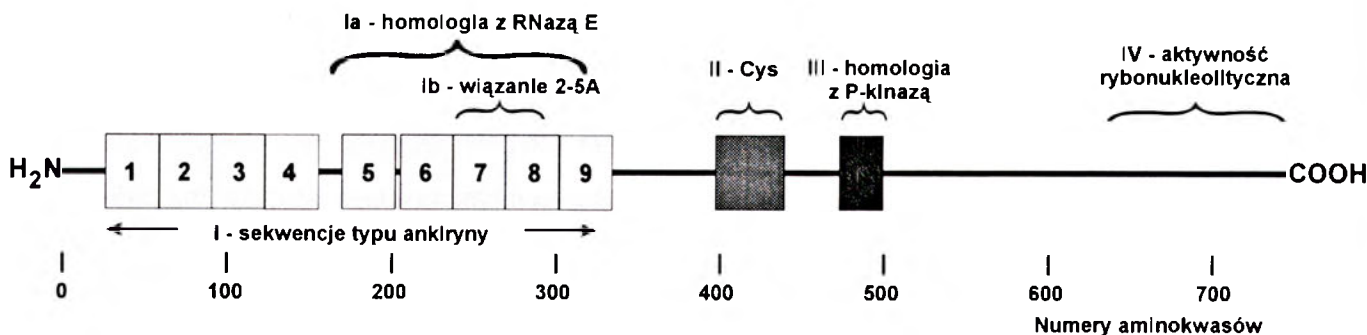
## III. Zmiany aktywności RNazy L w czasie wzrostu i różnicowania komórki

W komórkach niektórych typów ilość RNazy L podlega niewielkim wahanom (zmienia się do 2 razy w czasie cyklu komórkowego) [34]; w innych zmienia się podczas wzrostu i różnicowania: jest najniższa (lub prawie niewykrywalna) w komórkach różnicujących się, a najwyższa w komórkach zróżnicowanych (komórki linii nowotworowych PC 13, F9 i L myszy, zróżnicowanie wywołane zostało kwasem retinowym) [9, 34, 35]. Równoczesne podanie interferonu i aktynomycyny D nie powoduje wzrostu ilości RNazy L, co sugeruje udział transkrypcji w procesie wzrostu aktywności tej nukleazy w komórce [34].

RNaza L występuje zarówno w cytoplazmie (ok. 80% [30], 55% [9] całkowitej ilości enzymu), jak i w jądrze komórkowym (zarówno związana z matriks jądrową, jak i wolna) [5, 9, 33]. W cytosolu rosnących komórek białaczki limfatycznej (CEM i Jurkat) ilość RNazy jest stała, a w ich jądrze komórkowym zmienna. Enzym w cytoplazmie występuje w postaci wolnej, a w jądrze 75% enzymu jest związane z oligo 2-5A. W jądrze komórkowym enzym występuje jako związany z matriks jądrową (70%) oraz wolny. Po zakażeniu wirusem HIV-1 ludzkich komórek T linii H9 wzrost aktywności enzymu w jądrze tłumaczony jest związaniem enzymu przez matriks [9]. Znajdujące się na terenie jądra, zawierające sekwencję TAR mRNA wirusa HIV aktywują syntetazę 2-5A, a równocześnie oddziałują z białkiem Tat hamującym tę aktywację i łączącym wirusowe mRNA z matriks jądrową [3a, 9a, 36]. Ograniczona proteoliza wskazuje na odmienną formę jądrowej i cytosolowej (powstają różniące się elektroforetycznie fragmenty) [30]. Stwierdzono odmiennie wzorce trawienia rRNA przez enzymy z retikulocytów królika i mysich komórek L [37]. W różnych tkankach tego samego organizmu mogą występować izoenzymy RNazy L, różniące się swoistością substratową i budową aktywującego je oligo 2-5A (patrz — podrozdział VI) [31].

## IV. Budowa RNazy L

Zarówno ludzka, jak i mysia RNaza L składa się z ok. 740 aminokwasów i ma masę cząsteczkową ok.  $M_w = 80$  kDa [13, 16, 18, 24]. Analiza sekwencji aminokwasowej (na podstawie sekwencji z baz danych i informacji dotyczących struktury przestrzennej) pozwoliła wyodrębnić: (1) część o sekwencji podobnej do RNazy E z *E. coli* (nukleazy związanej z metabolizmem mRNA i rRNA), (2) region bogaty w cysteinę, (3) 9 sekwencji ankiryno-podobnych, (4) domenę C-kończącą o aktywności RNazy [16, 24, 26, 38], (5) domenę o budowie kinazy białkowej (wiążąca ATP) [24, 38] (Ryc. 2 i 5). Domenę odpowiedzialną za aktywność rybonukleolityczną RNazy L tworzy ok. 130 C-końcowych aminokwasów. Region bogaty w Cys może być

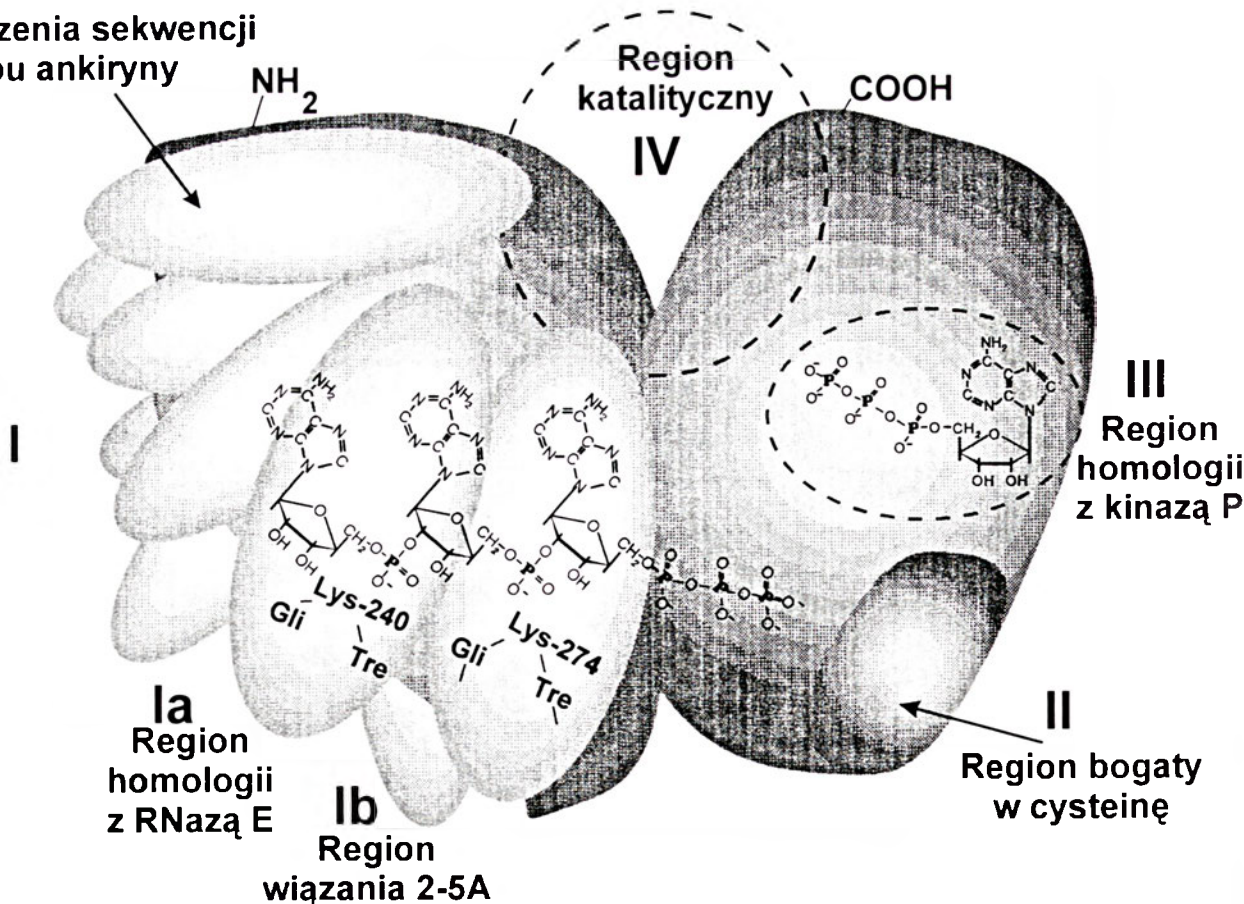


Ryc. 2 Schemat budowy łańcucha białkowego RNazy L. Zaznaczono części sekwencji o znanej bądź przewidywanej funkcji: I — homologiczna do sekwencji ankiryny (9 powtórzeń); Ia — homologiczna do RNazy E z *E. coli*; Ib — wiążąca oligo 2'-5'A (aktywator RNazy L); II — bogata w cysteinę; III — homologiczna z kinazami białkowymi; IV — C-końcowa o aktywności rybonukleolitycznej.

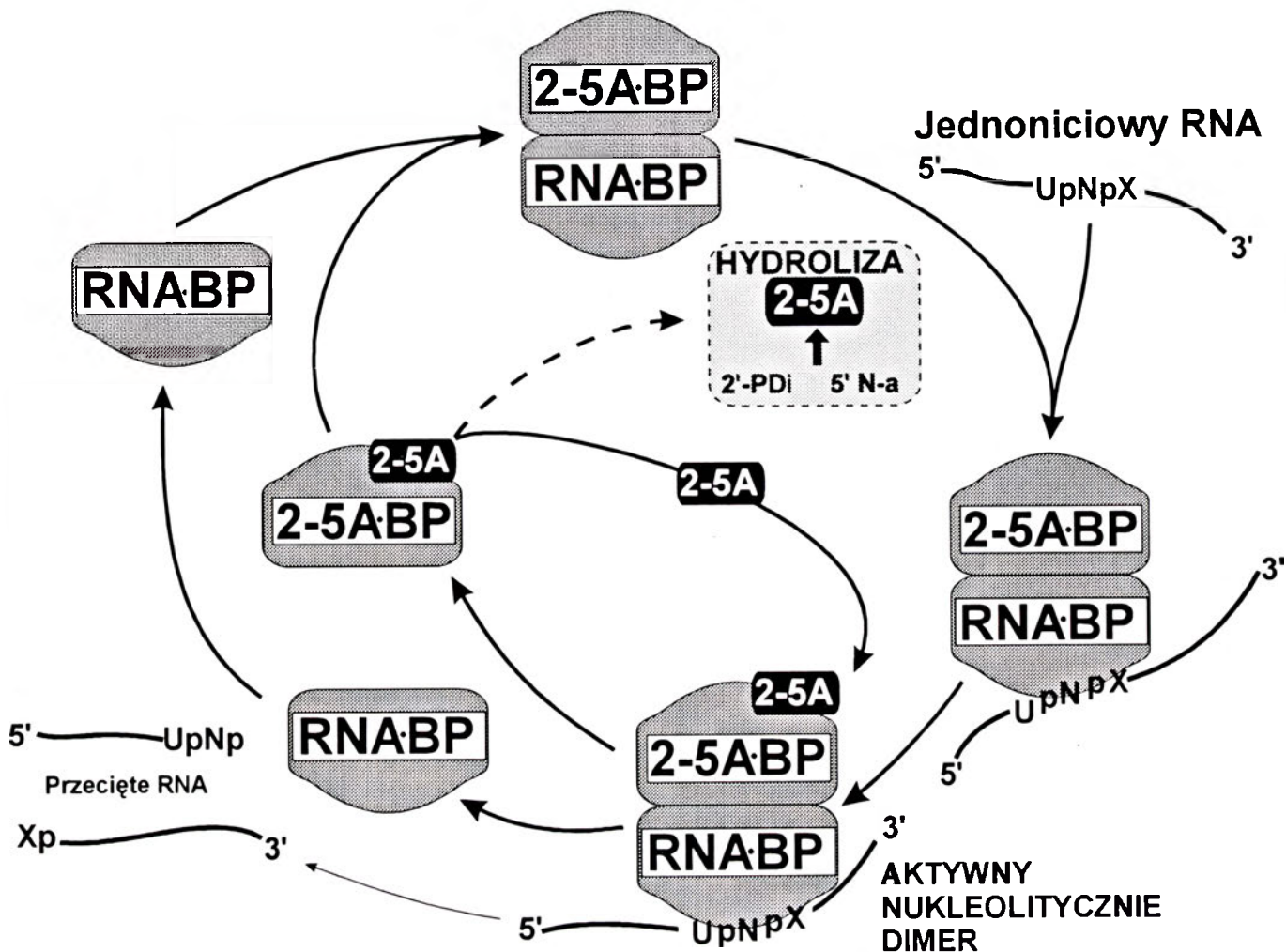
odpowiedzialny za dimeryzację enzymu, lub tworzyć palce cynkowe biorące udział w przyłączaniu substratu [24]. Domena ankiryny to 320 aminokwasów N-końcowych. Tworzy ją 9 powtórzeń sekwencji „ankirynopodobnych”, wykazujących ok. 35% identyczności aminokwasów z sekwencją ankiryny z erytrocytów [38]. Sekwencje „ankirynopodobne” RNazy L są prawdopodobnie odpowiedzialne za oddziaływanie z innymi białkami (wiele białek regulujących cykl komórkowy i różnicowanie się komórek posiada sekwencje tego typu) [16]. W 7 i 8 powtórzeń ankiryny występuje sekwencja: glicyna-lizyna (w poz. 240 i 274) — treonina poprzedzona sekwencją bogatą w glicynę (Ryc. 5). Ta sekwencja aminokwasowa określana jako

pętla P (wiążąca fosforan) jest znana jako wiążąca nukleotydy adeninowe i guaninowe w wielu białkach. W RNazie L obie pętle P (aminokwasy 229-241 i 253-275) wiążą aktywujące ten enzym oligo 2-5A [16, 24, 26]. Ekspresja zmodyfikowanego genu kodującego RNazę L, z którego usunięto 7 i 8 powtórzeń ankiryny, daje w efekcie enzym niezdolny do wiązania 2-5A [24]. Za obszarem ankirynopodobnym znajduje się region o sekwencji wykazującej homologię z sekwencją kinaz białkowych. Zachowane są w nim wszystkie (jedenaście) obszary charakterystyczne dla kinaz białkowych; najbardziej podobna jest drożdżowa kinaza KIN82 [38]. W nieaktywnej formie enzymu występują przypuszczalnie oddziaływania pomiędzy

### Powtórzenia sekwencji typu ankiryny



Ryc. 5 Schemat budowy cząsteczki RNazy L. Zaznaczono regiony: I — sekwencji typu ankiryny (9 powtórzeń), obejmujący obszary: Ia — homologii z RNazą E, Ib — wiązania oligo 2-5A; II — bogaty w cysteinę, prawdopodobnie odpowiedzialny za dimeryzację; III — homologiczny z kinazą P, wiążący ATP; IV — katalityczny, zawarty pomiędzy C-końcem a regionem I.



Ryc. 3 Proponowany schemat działania RNazy L jako heterodimeru podjednostek (i) RNA·BP — katalitycznej, hydrolizującej RNA i (ii) 2-5A·BP — regulatorowej, aktywowanej przez 2-5A (wg [13, 28], zmodyf.). Heterodimer przyłącza jednoniciowy RNA do podjednostki RNA·BP i hydrolizuje go po przyłączeniu oligo 2-5A do podjednostki 2-5A·BP. Hydroliza RNA następuje swoiście po stronie 3' sekwencji UA lub UU (N = U lub A, X = dowolna zasada). Oligo 2-5A są hydrolizowane przez 2' fosfodiesterazę i 5' nukleotydzę.

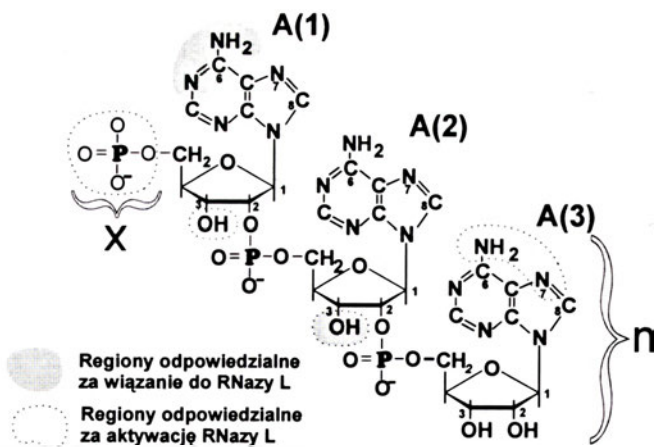
domeną ankiryny i wykazującym (po aktywacji) aktywność rybonukleolityczną C-końcem: związanie 2-5A powoduje zmiany konformacyjne uzewnętrzniające się aktywnością enzymatyczną [16, 22].

Według [13, 28] aktywny enzym z komórek HeLa (Ryc. 3) składa się z dwóch podjednostek o masie cząsteczkowej ok. 80 kDa każda: (1) katalitycznej, wiążącej i hydrolizującej RNA (RNA·BP — RNA Binding Protein) i (2) regulatorowej (2-5A·BP — 2-5A Binding Protein), wiążącej specyficznie pppA(2'p5'A)<sub>n</sub>. *In vivo* hydrolizę RNA przeprowadza tylko aktywowany dimer 2-5A·BP RNA·BP, związany z pppA(2'p5'A)<sub>n</sub>; *in vitro* właściwość hydrolizowania RNA wykazuje oczyszczona podjednostka RNA·BP, nie podlega ona jednak regulacji przez 2-5A [13, 28]. Oczyszczona podjednostka 2-5A·BP nie hydrolizuje RNA nawet po dodaniu 2-5A. RNaza L w formie natywnej ma masę cząsteczkową 185.000 [22], 160 kDa [13, 28], lub 78-80 kDa [24]. Natomiast wg [26] RNaza L jest monomerym o wszystkich właściwościach charakterystycznych dla tego enzymu. Na przykład ekspresja ludzkiego genu RNazy L w komórkach owadzych (normalnie nie posiadających tego enzymu) dała w efekcie enzym o pełnych właściwościach katalitycznych i regu-

lacyjnych. Rozbieżności, czy RNaza L w formie natywnej jest mono-, czy też dimerem można by wyjaśnić dimeryzacją cząsteczek enzymu w warunkach natywnych (np. oddziaływaniem regionów bogatych w cysteinę).

## V. Aktywacja enzymu i budowa liganda 2-5A

*In vivo* RNaza L jest aktywowana przez oligonukleotydy o budowie p<sub>x</sub>(2'p5') (A)<sub>n</sub>, gdzie x = 1 ÷ 3, n = 3 + 15 (Ryc. 4), w stężeniu rzędu nanomoli [m.in. 7, 25, 27, 29, 39]. Aktywacja RNazy L przez 2-5A jest odwracalna: oddysocjowanie związanego liganda powoduje zanik aktywności, a jego ponowne przyłączenie aktywuje enzym [2, 13, 22, 40, 41]. Ilość enzymu mierzy się najczęściej określając stopień związania znakowanego izotopowo oligonukleotydu 2-5A. Metoda ta oczywiście nie wykrywa cząsteczek enzymu już związanych z oligonukleotydem. W celu określenia całkowitej ilości enzymu stosuje się procedurę denaturacji i renaturacji [24, 30]. Oligonukleotyd ppp(2'-5'A)<sub>3</sub> wiąże się z enzymem w pojedynczym miejscu związania specyficznie i b. silnie z K<sub>d</sub> rzędu 10<sup>-11</sup> M [18, 28].



Ryc. 4 Schemat struktury aktywatorów RNazy L — oligonukleotydów o budowie typu  $p(A)2'p5'(A)_n$ , gdzie  $n \geq 3$ ;  $x$  = reszty kwasu fosforowego 1–3; charakterystyczne są nietypowe wiązania 2'-5'. (A)1-(A)3: adeniny kolejne od 5' końca. Zaznaczono obszary decydujące o (i) wiązaniu z RNazą L (zaciemnione) i (ii) aktywacji RNazy L (obwiedzione linią przerywaną). Grupa 3'OH przy A(2) wpływa zarówno na wiązanie, jak i na aktywację.

Struktura 2-5A przedstawiona jest na rycinie 4 (m.in.: [11, 27, 39, 42, 43]). Oligonukleotydy  $ppp(2'p5')(A)_n$  składające się z więcej niż 3 nukleotydów adeninowych są lepszymi aktywatorami RNazy L niż 2-5A<sub>3</sub>, chociaż ulegają wielokrotnie szybszemu rozkładowi przez nukleazy [44]. Ludzka RNaza L aktywowana jest przez oligonukleotydy 2-5A posiadające przynajmniej 1 resztę fosforanową na końcu 5' [20, 42], a mysia wymaga obecności na 5' końcu trifosoranu [42]. RNaza L nie jest aktywowana ani przez dimery, ani przez nieufosforylowane na końcu 5' trimery 2-5A (tzw. „rdzeń”) [18], lub aktywacja jest stukrotnie mniejsza niż trimerów ufosforylowanych na końcu 5' [26]. Retikulocyty królika zawierają izoenzym RNazy L wymagający do aktywacji tetrameru 2-5A [31, 37, 45], a jego nerki izoenzym aktywowany przez trimer [31].

Półokres trwania oligonukleotydów  $ppp2-5A_n$  wynosi ok. 50 min [2]. Są one rozkładane przez: (1) 2'-5' fosfodiesterazę do ATP i 5'AMP; (2) 5' nukleotydazę do nieaktywnego „rdzenia” 2-5A<sub>3</sub>, (3) niespecyficzną fosfatazę. Fosfodiesteraza hydrolizująca preferencyjnie od końca 2' wiązania fosfodiesterowe 2'-5' to enzym konstytutywny; interferon powoduje 4-5 krotny wzrost aktywności tej hydrolazy [33, 41]. Jej aktywność wzrasta z wiekiem, obniżając sprawność systemu 2-5A [33, 33a]. Oprócz hydrolizy 2-5A enzym ten hydrolizuje również koniec -CCA w tRNA, blokując w ten sposób translację. Proces ten jest odwracalny w wyniku działania nukleotydylotransferazy tRNA [41]. Ponieważ RNaza L jest aktywowana tylko w obecności 2-5A, jej aktywność jest ograniczona do przedziału komórki w którym powstał 2-5A. Działanie enzymów hydrolizujących 2-5A może zabezpieczyć własny RNA komórki przed całkowitą degradacją, ograniczając hydrolizę RNA do miejsc występowania dwuniciowego RNA aktywowanego syntetazę 2-5A. Oligonukleotydy typu  $ppp2-5A$  z powodu dużego ujemnego ładunku nie przechodzą przez błony komór-

kowe i są szybko hydrolizowane. Dlatego w celach badawczych i docelowo leczniczych syntetyzowane są różne ich pochodne i analogi, m.in. 2'-O-fosfoglicerylowe pochodne 2-5A odporne na hydrolizę przez 2'-fosfodiesterazę [18, 20, 43, 46-51]. Opracowywane są różne sposoby dostarczania ich do komórek: (1) przez koprecypitację z  $Ca^{2+}$ , (2) mikroiniekcję [8, 46], (3) dostarczenie analogów 2-5A za pomocą liposomów z białkiem A do komórek rozpoznanych przez przeciwciała przeciwko MHC [46], (4) w postaci koniugatu z poli(l-lizyną) ułatwione działaniem lizolecytyny (ułatwiającej przenikanie przez błonę komórkową). Związek powstały ze sprzężenia 2-5A z poli(l-lizyną) bardzo dobrze wiąże się z RNazą L i aktywuje ją, jest też odporny na działanie 2'-fosfodiesterazy [2, 10]. Trimery o budowie typu 2'-5'A w których zamiast adeniny występuje cytozyna, uracyl lub inozyna bardzo słabo wiążą się z RNazą L (np.  $pppl(2'-5'A)_2$  — ok. 10 razy słabiej [26]). Pochodne 2-5A podstawione w pozycji 8 pierścienia purynowego: bromowe, hydroksypropyloadenozynowe i -OH wiążą się do RNazy L z  $K_m$  rzędu  $10^{-9}$  M [50], a pochodne 8-SH znacznie słabiej — z  $K_m = 1 \cdot 10^{-6}$  M. W warunkach doświadczenia półokres trwania 2-5A wynosi ok. 50-60 min., natomiast jego syntetyczne pochodne są znacznie trwalsze, np. 8-OH pochodne podstawione w pozycji 8 pierścienia purynowego po 3 godz. inkubacji są rozkładane tylko w 8-10% [48]. Duża aktywność biologiczna i trwałość tych 2-5A analogów powoduje, że są one badane jako ewentualne środki przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe.

## VI. Oddziaływania strukturalne aktywator — enzym

W strukturze 2-5A grupa aminowa i azot 1 (N1) pierwszej adeniny (A(1), (Ryc. 4) decydują o wiązaniu z RNazą L (np.  $pppl(2'p5'A)_2$  — czyli analog 2-5A bez grupy aminowej wiąże się z enzymem 10 razy słabiej; 1 = inozyna). Brak grup aminowych przy adeninie 2 i 3 (czyli A(2) i A(3)) tylko nieznacznie zmniejsza wiązanie ligandu. Brak grupy aminowej w A(3) powoduje zmniejszenie aktywacji RNazy L o ok.  $10^4$  razy [42, 47]. Analogi zbudowane z 7-deazaadenozyny (tuberycydyny) wiązały się z enzymem z mysich komórek L równie silnie jak 2-5A, lecz nie aktywowały go, natomiast enzym z retikulocytów królika wiązał tetramer tuberycydyny ( $ppp5'(c^7A)_4$ ) i był przez niego aktywowany. Trimery i tetramery zbudowane z tuberycydyny są antagonistami 2-5A w aktywacji RNazy L w ekstraktach komórkowych mysich komórek L: azot 7 nie jest konieczny do wiązania z enzymem, lecz jest niezbędny do jego aktywacji [52]. Podstawienie w 2-5A w miejsce pierwszej lub drugiej adenozyny od końca 5' jej pochodnej bromowanej w poz. 8 (= Br<sup>8</sup>A) powoduje gwałtowny spadek zdolności wiązania się ligandu z enzymem. Podstawienie Br<sup>8</sup>A na końcu 2' nie zmienia wiązania, natomiast 10 krotnie wzrasta zdol-



ność hamowania translacji (przy niezmiennym półokresie trwania) [50].

Bardzo duży wpływ na wiązanie 2-5A i aktywację RNazy L z mysich komórek L ma także grupa 3'-OH przy resztach rybozy oligonukleotydu 2-5A: jej brak przy 5' końcowej adenozyne (A(1), Ryc. 4) powoduje 3-krotne osłabienie aktywacji, lecz nie zmienia wiązania tego liganda do RNazy L. Brak 3'-OH przy środkowej rybozie powoduje ok. 8-krotne osłabienie wiązania i prawie 1000-krotne osłabienie aktywacji, natomiast brak grupy 3'-OH przy rybozie 2' końcowej adenozyne powoduje znaczny wzrost zarówno wiązania, jak i aktywacji [53]. Według [44] obecność grup 3'-OH nie jest niezbędna do aktywacji RNazy L; tetramery zsyntetyzowane z kordycepiny (3'dA analogi 2-5A) wykazują bowiem zwiększoną aktywność w hamowaniu translacji i zwiększoną oporność na trawienie przez nukleazy. Ponieważ warunkiem podatności 2-5A na hydrolizę przez 2'-5' fosfodiesterazę jest obecność wolnych końcowych grup 2' i/lub 3' i 3'-OH drugiej rybozy, dlatego badane są również fluorowe pochodne 2-5A (podstawione w miejscu tych grup -OH) [47].

Analogi 2-5A zbudowane z nukleozydów kordycepiny 2-5(3'dA)<sub>3</sub> („rdzeń”) połączone tiofosforanem, niezależnie od chiralności położenia atomu siarki (Rp lub Sp) wiążą się z RNazą L z mysich komórek linii L 929, lecz jej nie aktywują. Analogi 2-5A<sub>3</sub> połączone tiofosforanem wiążą się z nukleazą i aktywują ją podobnie jak monofosforany 2-5p(3'dA)<sub>3</sub> RpRp i SpRp; podczas gdy 2-5p(3'dA)<sub>3</sub> RpSp i SpSp nie wiążą się i nie aktywują enzymu [49]. Podobnie nie aktywował go (5'p)2-5p(A)<sub>4</sub> — tetramer pSpSpSp [39].

W lecznictwie duże nadzieje wiąże się z (3'dA) analogami 2-5A z uwagi na ich równoczesną zdolność do hamowania aktywności odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1, aktywację RNazy L i większą odporność na hydrolizę [51].

## VII. Swoistość substratowa

Mysia i ludzka RNaza L hydrolizują jednoniciowy RNA (mRNA, rRNA, RNA wirusowy) po stronie 3' sekwencji UU i UA (m.in. [24, 26, 29]), a ludzka RNaza L również po stronie 3' reszt adenyłowych nie poprzedzonych przez U [26]. Aktywacja enzymu zarówno trimerem, jak tetra i pentamerem 2-5A [26] wywołuje hydrolizę poli(rU) i poli(rA) na fragmenty o określonej długości (*discrete*), np. poli(rU) na odcinki o długości 5, 7, 8, 12, 16 i 22 zasad, a poli(rA) przy 10-100 krotnie wyższym stężeniu 2-5A na odcinki długości 13, 21 i 22 zasad. RNaza L nie hydrolizuje poli(rG), poli(dA), poli(dT) [26] i poli(C) [24]. Do swojej pełnej aktywności enzym ten wymaga równoczesnej obecności ATP i jonów Mg<sup>2+</sup> lub Mn<sup>2+</sup>, a także Ca<sup>2+</sup> [26, 40]. W obecności 100 nM 2-5A następuje hydroliza poli(rU) nawet przy całkowitym braku jonów dwuwartościowych i ATP, przy czym ATP wydaje się pełnić

rolę wyłącznie strukturalną. Jony cynku hamują aktywność rybonukleolityczną nawet w obecności ATP, równocześnie bardzo silnie zwiększając wiązanie się 2-5A z enzymem (zestawienie funkcjonalnych obszarów enzymu przedstawione jest na rycinie 5) [26].

rRNA całych rybosomów jest trawiony przez RNazę L specyficznie na fragmenty o stałej długości, które po elektroforezie dają ściśle określony wzór (podobnie jak poli (rU) i poli(rA) [26]) [16, 24, 29, 34, 37, 39, 52, 54]. W tych samych warunkach produkty działania rybonukleazy T1 i RNazy trzustkowej były inne. Produkty trawienia nie odzwierciedlają wyłącznie obecności miejsc odsłoniętych i eksponowanych [37]: hydrolizowane są tylko niektóre miejsca o preferowanej sekwencji [29]. Poza tym RNaza L wiąże się wybiórczo z polisomami [2, 13].

W wyciągach z komórek HeLa poddanych działaniu interferonu RNaza L preferencyjnie hydrolizuje jednoniciowy RNA połączony kowalencyjnie z dwuniciowym RNA. Przypuszczalnym powodem tego jest sąsiedztwo miejsca aktywacji (dsRNA aktywuje syntetazę 2-5A) i miejsca znajdowania się substratu (czyli jednoniciowego RNA). W komórce RNaza L może być aktywowana i działać głównie w miejscu występowania wirusowego dwuniciowego RNA, będącego produktem pośrednim replikacji wirusa (por. rozdz. V) [40]. To zjawisko może być odpowiedzialne za hamowanie przez układ 2-5A namnażania tylko niektórych wirusów. Wynika to być może z różnic w ich cyklach życiowych i wiąże się z różną lokalizacją komórkową poszczególnych etapów ich namnażania. Tak np. dsRNA powstający podczas namnażania wirusa SV40 występuje głównie w jądrze komórkowym, VSV występuje w cytoplazmie w powiązaniu z układem mikrotubul komórki, a dsRNA pikornawirusów (np. EMCV i polio) w powiązaniu z gładkim retikulum endoplazmatycznym [2, 55].

## VIII. Lokalizacja genu RNazy L — RNS4

Ludzki gen kodujący RNazę L (RNS4) zlokalizowano za pomocą metody hybrydyzacji i fluorescencji *in situ* (FISH) w chromosomie 1 (1q32). Występowanie aberracji w regionie 1q związane jest z częstymi przypadkami nowotworów u ludzi, np.: rak żołądka (*gastric adenocarcinoma*), rak jamy ustnej (*oral squamous cell carcinomas*) i rak sutki (*breast carcinomas*). To pozwala wnioskować, że RNS4 jest być może genem supresorowym nowotworów [14].

## IX. Wykorzystanie RNazy L w diagnostyce medycznej i leczeniu niektórych schorzeń

Wirusy atakując organizmy wyższe potrafią zablokować skierowane przeciwko nim działanie układu 2-5A. Wirus EMCV po zakażeniu komórki hamuje RNazę L, przed czym można zabezpieczyć komórki zapobiegawczo podając interferon [3, 23]. W hodowli

ludzkich komórek Chang wirus HSV tworzy kompetycyjne inhibitory RNazy L (pochodne 2-5A<sub>n</sub> o strukturze na razie bliżej nieokreślonej), hamujące jej aktywację przez 2-5A [7]. W małych komórkach CV-1 zakażonych wirusem SV-40 występują inhibitory RNazy L o budowie oligonukleotydów 2-5A [55], podobnie w komórkach HeLa zakażonych EMCV [23] i HIV [56].

mRNA wirusa HIV-1 zawierają po stronie 5' sekwencję TAR tworzącą dwuniciową strukturę typu „hairpin”. Może ona aktywować wewnątrzkomórkowe enzymy uaktywniane przez dsRNA, jednak efekt ten jest znoszony przez wirusowe białko TAT wiążące się z sekwencją TAR i osłaniające ją przed rozpoznaniem [3a, 9a, 5, 32, 57-59]. W limfocytach osób chorych na AIDS stwierdzono zwiększone stężenie 2-5A; pomimo tego RNaza L z tych komórek była nieaktywna. Ponieważ w badaniach *in vitro* wykazano, że podanie 2-5A w stężeniu 10<sup>-8</sup> M nie wywołało aktywacji RNazy L, może to wskazywać, że w zainfekowanych komórkach występuje inhibitor (o niezidentyfikowanej strukturze) tej nukleazy. Podanie Ampligenu („niedopasowanego” dsRNA (rI<sub>13</sub>:rC<sub>12</sub>U<sub>1</sub>)<sub>n</sub>, n = 20 ÷ 30) przejściowo odtwarza jej aktywność i zmniejsza ilość wykrywanego RNA wirusa oraz polepsza stan zdrowia pacjentów [56]. Podobnie zastosowanie AZT (3'-azydo 3'-deoksytymidyny) wydłuża czas aktywności tej nukleazy [9]. Aktywność RNazy L (mierzona zdolnością do trawienia transkryptów HIV) po zakażeniu HIV komórek linii H9 rosła do 3 dnia po infekcji, a następnie wracała do poziomu wyjściowego; równocześnie komórki wydalały wirusy HIV. Piątego dnia po infekcji RNaza L była już nieaktywna i nie dawało się już stwierdzić charakterystycznych dla jej działania produktów trawienia transkryptów wirusa HIV [9].

Planując wykorzystanie układu 2-5A w zwalczaniu zakażenia wirusem HIV proponuje się m.in.: (1) wytwarzanie i podawanie analogów 2-5A (por. — punkt IV — Aktywacja i budowa liganda); (2a) immunizację wewnątrzkomórkową (*intracellular immunization*) — np. przez wprowadzenie do komórki hybrydowego genu ludzkiej 2-5A syntetazy pod kontrolą HIV 3' LTR — rycina 6 [5, 59, 60], (2b) wprowadzenie genu α<sub>2</sub>-interferonu (również pod kontrolą HIV-1 3' LTR) [61].

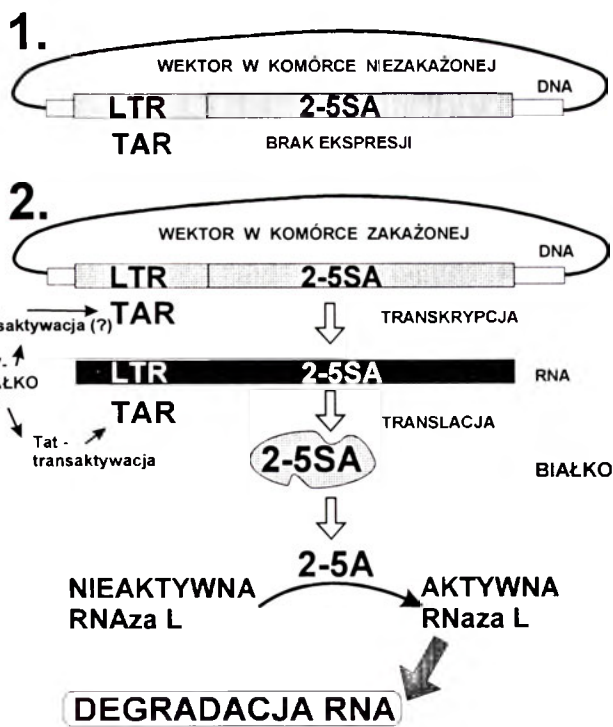
Niektóre wirusy hamują aktywację układu obronnego gospodarza poprzez wytwarzanie białek hamujących ekspresję wielu genów indukowanych przez interferon [62, 63]. Na przykład HBV (*hepatitis B-virus*) hamuje indukcję syntetazy 2-5A i kinazy P1 [64]. Wirus ospy hamuje równocześnie układ 2-5A i kinazy P1, produkując białka będące inhibitorami kinazy P1 i indukując fosfatazę hydrolizującą 2-5A [2]. Wspomniany już Ampligen wykazuje silne działanie przeciwwirusowe i osłaniające komórki. W zainfekowanych wirusem HIV-1 limfocytach T CEM i T H9 (*human T-lymphoblastoid CEM cells and human T-cell line H9*) komórki bez dodatku Ampligenu zaczynają

wydalać wirusy 3 dni po infekcji, a potraktowane nim po 5-6 dniach. Ampligen wiąże się z syntetazą 2-5A aktywując ją i powodując syntezę dłuższych (≥3) oligomerów 2-5A, będących lepszymi (niż trimery) aktywatorami RNazy L [57].

Tak zwany zespół przewlekłego zmęczenia (CSF — *Chronic Fatigue Syndrome*), to schorzenie towarzyszące zakażeniu różnymi wirusami (HHV-6 *human herpesvirus-6*, wirus Epstein-Barr). U chorych stwierdzono zwiększone: (1) aktywność RNazy L (2-5 razy), (2) aktywność syntetazy 2-5A (3) stężenie 2-5A (do 220 razy). Podwyższona aktywność układu 2-5A wynika przypuszczalnie z przewlekłej infekcji wirusem, a zatem ciągłej aktywacji enzymu. Stosowanie Ampligenu w tych przypadkach spowodowało spadek aktywności (1) syntetazy 2-5A, (2) RNazy L, (3) stężenia 2-5A do wartości normalnych (mierzonych w leukocytach jędnokądrzastych krwi obwodowej) i poprawę samopoczucia pacjentów [65, 66]. Ampligen działając jako allosteryczny modyfikator aktywności 2-5A syntetazy zmniejsza aktywność tego enzymu i w efekcie zmniejsza aktywność RNazy L. W przypadku zakażenia wirusem HIV sytuacja jest odwrotna: (1) aktywność syntetazy 2-5A jest obniżona (do 40 razy), (2) niewykrywalne 2-5A i aktywność RNazy L. Zastosowanie Ampligenu powoduje aktywację syntetazy i powrót do normy: (1) stężenia 2-5A, (2) aktywności RNazy L [56, 66].

Prowadzone są próby zwalczania zakażenia wirusami (m.in. HIV-1) poprzez aktywację RNazy L przy użyciu związków chemicznych będących chimerami typu: oligo 2-5A-antysensowny RNA. Związki te umożliwiają swoiste hydrolizowanie RNA dzięki temu, że ich część antysensowna (AS RNA) łączy się z komplemmentarnym RNA, a część 2-5A aktywuje RNazę L, która hydrolizuje rozpoznany RNA. Poza swoistością taki hybrydowy oligonukleotyd jest bardziej odporny na trawienie przez nukleazy. Planowane wykorzystanie tych związków to: (1) zwalczanie zakażenia wirusowego (m.in. HIV-1 [20, 68]), (2) posttranskrypcyjna kontrola ekspresji genów przez swoistą hydrolizę mRNA [67]. Na przykład chimera 2-5A z antysensownym RNA komplemmentarnym wobec mRNA dla kinazy białkowej PK-1 zahamowała ekspresję tej kinazy w komórkach HeLa [67].

Duże znaczenie układu 2-5A powoduje zainteresowanie nim zarówno ze względów poznawczych, jak i z uwagi na możliwe zastosowania w leczeniu zakażeń wirusami (m.in. [2, 9, 20, 51]) i zwalczaniu nowotworów (np.: [14, 15]). Obiecujące są zwłaszcza próby wykorzystania samego efektora układu 2-5A, czyli RNazy L, z pominięciem wcześniejszych etapów aktywacji. Strategie wiodące do tego celu to: (1) synteza analogów 2-5A odpornych na hydrolizę przez wewnątrzkomórkowe nukleazy, równocześnie posiadających silniejsze właściwości aktywacyjne, (2) spowodowanie syntezy elementów układu przeciwwirusowego w momencie zakażenia wirusem (Ryc. 6) [5, 59, 60], (3)



Ryc. 6 Schemat doświadczenia w którym przeprowadzono wewnątrzkomórkową immunizację przeciwko wirusowi HIV. Wprowadzono do komórki hybrydowy gen ludzkiej syntetazy 2-5A, znajdujący się pod kontrolą HIV 3'LTR. Prowadzi to do aktywacji RNazy L w chwili zakażenia wirusem HIV (wg [5], zmodyf.).

synteza związków o budowie chimer 2-5A: AS RNA [20, 67, 68].

Artykuł otrzymano 18 kwietnia 1995 r.  
Zaakceptowano do druku 28 sierpnia 1995 r.

## Piśmiennictwo

- Farrel PJ, Sen GC, Dubois MF, Ratner L, Slatery E, Lengyel P (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 5893-5897
- Fujii N (1994) *Progress in Molec and Subcell Biol* **14**: 150-175
- Sen CG, Lengyel P (1992) *J Biol Chem* **267**: No. 8, 5017-5020
- Müller WE, H Ushijima, Schröder HC (1994) *Progr Molec Subcell Biol* **14**: 66-88
- Lengyel P (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**(13): 5893-5895
- Schröder HC, Suhadolnik RJ, Pfeiderer W, Charubala R, Müller WE (1992) *Int J Biochem* **24**(1): 55-63
- Chebath J, Benech P, Revel M, Vigneron M (1987) *Nature (Lond)* **330**: 587-588
- Cayley PJ, Davies JA, McCullagh KG, Kerr IM (1984) *Eur J Biochem* **143**: 165-174
- Defilippi P, Huez G, Verhaegen-Lewalle M, de Clercq E, Imai J, Torrence P, Content J (1986) *FEBS* **198**(2): 326-332
- Schröder HC, Wenger R, Kuchino Y, Müller W (1989) *J Biol Chem* **264**(10): 5669-5673
- Schröder HC, Kelve M, Müller W (1994) *Progr Molec Subcell Biol* **14**, 176-197
- Bayard B, Bisbal C, Lebleu B (1986) *Biochemistry* **25**: 3730-3736
- Kerr IM, Brown RE (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* **75**(1): 256-260
- De Benedetti A, Pytel AB, Baglioni C (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 658-662
- Salehzada T, Silhol M, Steff AM, Lebleu B, Bisbal C (1993) *J Biol Chem* **268**(11): 7733-7740

- Squire J, Zhou A, Hassel BA, Nie H, Silverman RH (1994) *Genomics* **19**(1): 174-175
- Knight E, Anton ED, Fahey D, Friedland BK, Jonak G (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 1151-1154
- Hassel BA, Zhou A, Sotomayor C, Maran A, Silverman RH (1993) *EMBO-J* **12**(8): 3297-3304
- Hovanessian AG, Svab J, Marie I, Robert N, Chamaret S, Laurent A (1988) *J Biol Chem* **263**(10): 4945-4949
- Silverman RH, Jung DD, Nolan-Sorden NL, Dieffenbach CW, Kedar VP, Sen Gupta DN (1988) *J Biol Chem* **263**(15): 7336-7341
- Gosh SK, Kusari J, Bandyopadhyay S, Samanta H, Kumar R, Sen GC (1991) *J Biol Chem* **266**(23): 15293-15299
- Lesiak K, Khamnei S, Torrence PF (1993) *Bioconjug Chem* **4**(6): 467-472
- Gribaudo G, Lembo D, Cavallo G, Landolfo S, Lengyel P (1991) *J Virol* **65**(4): 1748-1757
- Slattery E, Ghosh N, Samanta H, Lengyel P (1979) *Proc Acad Sci USA* **76**(10): 4778-4782
- Cayley PJ, Knight M, Kerr IM (1982) *Biochem Biophys Res Comm* **104**(2): 376-381
- Zhou A, Hassel BA, Silverman RH (1993) *Cell* **72**(5): 753-765
- Cayley PJ, White RF, Antoniow JF, Walesby NJ, Kerr IM (1982) *Biochem Biophys Res Comm* **108**(3): 1243-1250
- Dong B, Xu L, Zhou A, Hassel BA, Lee X, Torrence PF, Silverman RH (1994) *J Biol Chem* **269**(19): 14153-14158
- Devash Y, Gera A, Willst DH, Reichmann M, Pfeleiderer W, Charubala R, Sela I, Suhadolnik (1984) *RJ J Biol Chem* **259**: 3482-3486
- Bayard B, Bette Bobillo P, Aliau S (1994) *Eur J Biochem* **223**(2): 403-410
- Wreschner D, McCauley J, Skehel J, Kerr I (1981) *Nature (Lond)* **289**: 414-417
- Bayard BA, Gabrion JB (1993) *Biochem J* **296**(Pt 1): 155-160
- Krause D, Silverman R (1993) *J Interferon Res* **13**: 13-16
- Zhang GY, Beltchev B, Fournier A, Zhang YH, Malassine A, Bisbal C, Ehressmann B, Darlix JL, Thang MN (1993) *Aids Res and Human Retroviruses* **9**(2)
- Pfeifer K, Ushijima H, Lorenz B, Müller WE, Schröder HC (1993) *Mech Ageing Dev* **67**(1-2): 101-114
- Schröder HC, Kelve M, Pfeifer K, Flögel-Mrsic M, Müller WEG (1993) *Z Gerontol* **26**: 232-237
- Krause D, Silverman R, Jacobsen H, Leisy S, Diefenbach C, Friedman R (1985) *Eur J Biochem* **146**: 611-618
- Jacobsen H, Krause D, Friedman RM, Silverman RH (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 4954-4958
- Müller WEG, Wegner R, Reuter P, Renneise K, Schröder H (1989) *Biochem Biophys Acta* **1008**: 208-212
- Wreschner TH, James TC, Silverman TH, Kerr IM (1981a) *Nucleic Acids Research* **9**: 1571-1581
- Bork P, Sander C (1993) *FEBS Lett* **334**(2): 149-152
- Charachon G, Sobol R, Bisbal C, Salehzada T, Silhol M, Charubala M, Pfeleiderer W, Lebleu B, Suhadolnik RJ (1990) *Biochemistry* **29**: 2550-2556
- Nilsen TW, Baglioni C (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* **76**(6): 2600-2604
- Schmidt A, Chernajowsky Y, Sculman L, Federman P, Berissi H, Revel M (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* **76**(10): 4788-4792
- Imai J, Lesiak K, Torrence PF (1985) *J Biol Chem* **260**(3): 1390-1393
- Bayard B, Bisbal C, Silhol M, Cnockaert J, Heez G, Lebleu B (1984) *Eur J Biochem* **142**: 291-298
- Suhadolnik RJ, Devash Y, Reichenbach NL, Flick MB, Wu JM (1983) *Biochem Biophys Res Comm* **111**(1): 205-212
- Williams BRG, Golgher RR, Brown RE, Gilbert CS, Kerr IM (1979) *Nature (Lond)* **282**: 582-586
- Bayard B, Leserman LD, Bisbal C, Lebleu B (1985) *Eur J Biochem* **151**: 319-325
- Van-den-Boogaart JE, Kalinichenko EN, Pod-

- kopaeva TL, Mikhailopulo IA, Altona C (1994) *Eur J Biochem* **221**(2): 759-768
48. Nagai K, Kanbara K, Nakashima H, Yamamoto N, Suhadolnik RJ, Takaku H (1993) *Biochim Biophys Acta* **1156**(3): 321-326
49. Sobol RW, Charubala R, Pfeiderer W, Suhadolnik RJ (1993) *Nucleic Acids Res* **21**(10): 2437-2443
50. Lesiak K, Torrence PF (1987) *J Biol Chem* **262**(5): 1961-1965
51. Monterfiori DC, Sobol RW, Shi Wu Lit, Reichenbacht NL, Suhadolnik RJ, Charubala R, Pfeiderer W, Modliszewski A, Robinson WE, Mitchell WM (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 7191-7194
52. Jamouille JC, Imai J, Lesiak K, Torrence PF (1994) *Biochemistry* **23**: 3063-3069
53. Torrence P, Brozda D, Alster D, Charubala R, Pfeiderer W (1988) *J Biol Chem* **263**(3): 1131-1139
54. Hubbell HR, Kariko K, Suhadolnik RJ, Brodsky I (1994) *Anticancer Res* **14**(2A): 341-346
55. Hersh LC, Brown ER, Roberts KW, Swyryd EA, Kerr MI (1984) *J Biol Chem* **259**(10): 1731-1737
56. Carter WA, Brodsky I, Pellegrino MG, Henriques HF, Parenti DM, Schulof RS, Robinson WE, Volsky DJ, Paxton H, Kariko K, Suhadolnik RJ, Strayer DR, Lewin M, Einck L, Simmon GL, Scheib RG, Monterfiori DC, Mitchell WM, Paul D, Meyer WA III, Reichenbach N, Gillespie DH (1987) *Lancet* **June 6**: 1286-1292
57. Ushijima H, Rytik PG, Schacke H, Scheffer U, Müller WE, Schröder HC (1993) *J Interferon Res* **13**(2): 161-171
58. Maitra RK, McMillan NA, Desai S, McSwigen J, Hovanessian A, Sen G, Williams B, Silverman R (1994) *Virology* **204**: 823-827
59. Müller WE, Okamoto T, Reuter P, Ugarkovic D, Schröder H (1990) *J Biol Chem* **265**(7): 3803-3808
60. Schröder HC, Ugarkovic D, Merz H, Kuchino Y, Okamoto T, Müller W (1990) *FASEB J* **4**: 3124-3130
61. Bednarik DP, Mosca JD, Raj NBK, Pitha PM (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 4958-4962
62. Kalvakolanu DVR, Bandyopadhyay SK, Harter ML, Sen GC (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7459-7463
63. Gutch MJ, Reich NC (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7913-7917
64. Foster GR, Ackrill AM, Goldin RD, Kerr IM, Thomas HC, Stark GR (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2888-2892
65. Suhadolnik RJ, Reichenbach NL, Hitzges P, Sobol RW, Peterson DL, Henry B, Ablashi DV, Müller WE, Schröder HC, Carter WA, Strayer DR (1994) *Clin Infect Dis* **Jan 18** Suppl 1: S 96-104
66. Suhadolnik RJ, Reichenbach NL, Hitzges PM, Ablashi DV, Strayer DR, Carter WA (1993) *Ann N Y Acad Sci* **685**: 756-757
67. Maran A, Maitra RK, Kumar A, Dong B, Xiao W, Li G, Williams BR, Torrence PF, Silverman RH (1994) *Science* **265**: 789-792
68. Torrence PF, Maitra RK, Lesiak K, Khamnei S, Zhou A, Silverman RH (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**(4): 1300-1304

## Struktura i funkcja syntetaz aminoacylo-tRNA

### Structure and function of aminoacyl-tRNA synthetases

MIROŚŁAWA SIATECKA<sup>1</sup>,  
JAN BARCISZEWSKI<sup>2</sup>

#### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Struktura i organizacja syntetaz aminoacylo-tRNA
- III. Funkcje syntetaz aminoacylo-tRNA
  - III-1. Aminoacylacja tRNA
  - III-2. Autoregulacja
  - III-3. Udział w dojrzewaniu RNA
  - III-4. Biosynteza alarmonów
  - III-5. Udział w biosyntezie chlorofilu
  - III-6. Udział w powstawaniu chorób autoimmunologicznych

**Wykaz stosowanych skrótów:** tRNA — transferowy kwas rybonukleinowy; mRNA — informacyjny kwas rybonukleinowy; AARS — syntetazy aminoacylo-tRNA; koniec N i C — koniec aminowy i karboksylowy polipeptydu; mtRNA — mitochondrialny RNA; RNP — rybonukleoproteiny; NADP — fosforan dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego.

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

#### Contents:

- I. Introduction
- II. Structure and organization of aminoacyl-tRNA synthetases
- III. Functions of aminoacyl-tRNA synthetases
  - III-1. tRNA aminoacylation
  - III-2. Autoregulation
  - III-3. RNA splicing
  - III-4. Alarmone biosynthesis
  - III-5. Role in chlorophyll biosynthesis
  - III-6. Autoimmunological diseases with autoantibodies against human AARS

#### I. Wstęp

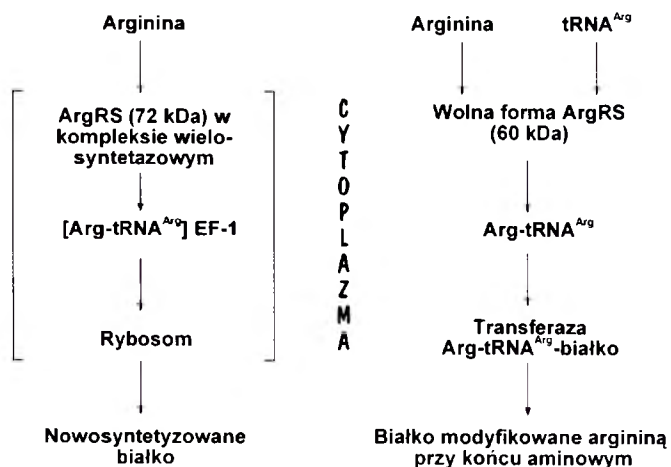
Dokładność mechanizmu biosyntezy białka, jednego z najważniejszych procesów komórkowych, polega nie tylko na specyficznym oddziaływaniu informacyjnego RNA z transferowym RNA, ale także na przyłączeniu swoistego aminokwasu do tRNA. Etap ten katalizowany jest przez niezwykle zróżnicowane strukturalnie syntetazy aminoacylo-tRNA (ligazy ami-

noacylo-tRNA; E.C.6.1.1.-), które rozpoznają strukturalnie podobne, specyficzne tRNA. Bardzo duża różnorodność budowy syntetaz, przy tak dużym podobieństwie katalizowanej reakcji aminoacylacji-tRNA jest fascynującym problemem badawczym. Ponieważ niektóre aspekty tego zagadnienia były już omawiane na łamach *Postępów Biochemii* (H. J a k u b o w s k i — *Post. Bioch.* 21,95,1975), w niniejszym artykule ograniczymy się do przedstawienia nowych danych, unikając powtarzania informacji zawartych w poprzednim opracowaniu. Intensywne badania biochemiczne i strukturalne prowadzone w ciągu kilku ostatnich lat, doprowadziły do rozwiązania struktury kryształów i poznania budowy przestrzennej kilku syntetaz oraz ich kompleksów z tRNA. Analiza tych kryształów przybliżyło poznanie i zrozumienie mechanizmu rozpoznawania kwasu nukleinowego przez białko.

## II. Struktura i organizacja syntetaz aminoacylo-tRNA

W komórce prokariotycznej występuje 20 syntetaz aminoacylo-tRNA (AARS) specyficznych dla określonego aminokwasu. Katalizują one reakcję przyłączenia swoistego aminokwasu do wszystkich izoakceptorowych tRNA o danej specyficzności. Komórki eukariotyczne, ze względu na obecność organelli komórkowych takich jak mitochondria i chloroplasty, zawierają kilka syntetaz dla jednego aminokwasu. Organellowe AARS kodowane są w genomie jądrowym. Cytoplazmatyczna i mitochondrialna forma syntetazy histydylo-tRNA u drożdży kodowana jest przez jeden gen, przy czym mitochondrialny enzym ma przy końcu aminowym 20 dodatkowych aminokwasów. Jest to sygnałowa sekwencja niezbędna dla transportu enzymu do mitochondriów [1, 2]. Podobnie gen syntetazy izoleucylo-tRNA (Ile RS) *ilsA* u *Tetrahymena thermophila* koduje dwa białka, cytoplazmatyczną i mitochondrialną formę IleRS, różniące się dodatkowym 20 aminokwasowym peptydem przy N-końcu [3]. Natomiast cytoplazmatyczne i mitochondrialne syntetazy treonylo-tRNA u drożdży kodowane są przez dwa oddzielne geny jądrowe [1].

Znane są również przykłady występowania syntetaz aminoacylo-tRNA w kilku formach molekularnych dla tego samego aminokwasu. U ssaków znaleziono dwie formy syntetazy arginylo-tRNA (ArgRS), z których jedna występuje w postaci wolnej, a druga jest składnikiem wysokocząsteczkowego kompleksu syntetaz i zawiera 100 dodatkowych aminokwasów na końcu aminowym. Enzym znajdujący się w kompleksie katalizuje syntezę arginylo-tRNA, który wykorzystywany jest następnie w biosyntezie białka, podczas gdy produkt reakcji aminoacylacji katalizowanej przez enzym nie zaangażowany w tworzenie kompleksu jest substratem w potranslacyjnej reakcji modyfikacji białek. Modyfikacja ta stanowi sygnał dla ich degradacji w reakcji zależnej od ubikwityny (Ryc. 1) [4]. Zapo-



Ryc. 1. Udział syntetazy arginylo-tRNA w procesach komórkowych. Wolna forma ArgRS (60kDA) katalizuje syntezę Arg-tRNA<sup>Arg</sup>, substratu do modyfikacji białek, natomiast forma wchodząca w skład kompleksu wielosyntetazowego katalizuje syntezę Arg-tRNA<sup>Arg</sup> (72kDA) do rybosomalnej biosyntezy białek. Nawias kwadratowy oznacza, że utworzony Arg-tRNA<sup>Arg</sup> tworzy natychmiast kompleks z czynnikiem elongacyjnym 1 (EF1) bez uwalniania do cytoplazmy.

trzebowanie komórki na arginylo-tRNA jako substrat w reakcji modyfikacji białek sugeruje, że aminoacylo-tRNA (AA-tRNA) biorący udział w rybosomalnej biosyntezie białka jest niedostępny dla innych procesów komórkowych [5]. Różnicowa synteza arginylo-tRNA jest przykładem ukierunkowanego przepływu produktów reakcji (ang. *channeling*) występującego w komórkach.

Występowanie kilku syntetaz aminoacylo-tRNA dla danego aminokwasu stwierdzono również u prokariotów. U *E. coli* występują dwie syntetazy lizylo-tRNA o różnej sekwencji aminokwasowej, stanowiące produkt dwóch genów. Ekspresja jednego z tych genów, *LysS*, zachodzi konstytutywnie (w sposób ciągły), podczas gdy ekspresja drugiego *LysU* odbywa się pod kontrolą promotora wrażliwego na szok temperaturowy lub oksydacyjny [6-8]. U *Bacillus subtilis* znaleziono dwie syntetazy treonylo-tRNA, z których każda oddzielnie jest wystarczająca dla wzrostu komórki. Jedna z nich występuje głównie w wegetatywnej fazie wzrostu, druga natomiast podczas sporulacji [6, 9].

Geny kodujące AARS u niższych eukariotów zasadniczo nie zawierają intronów. Wyjątkiem są: cytoplazmatyczna *LeuRS* oraz mitochondrialne *LeuRS* i *TyrRS* u *Neurospora crassa* [10]. Sekwencje kodujące geny AARS u wyższych eukariotów zbudowane są z kilku eksonów oskrzydłonych dużymi intronami. U chomika *Mesocricetus auratus* gen *AspRS* składa się z 16 eksonów a *HisRS* z 13 eksonów [10].

Na podstawie analizy dotychczas poznanych sekwencji aminokwasowych prokariotycznych i eukariotycznych syntetaz aminoacylo-tRNA można stwierdzić, że podobieństwo enzymów swoistych dla tego samego aminokwasu jest stosunkowo duże i wynosi około 60%, natomiast dla różnych aminokwasów nie przekracza 20% i ogranicza się jedynie do identyczno-

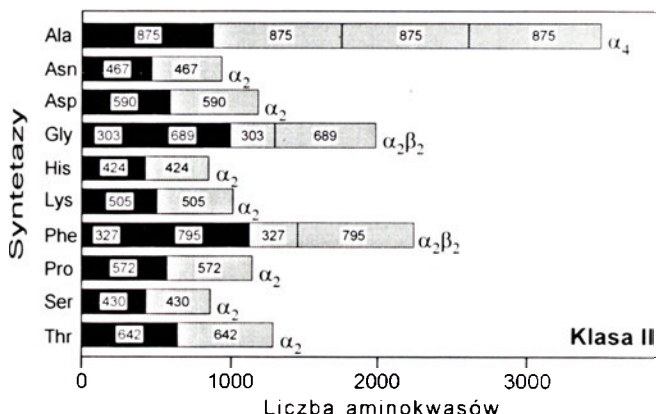
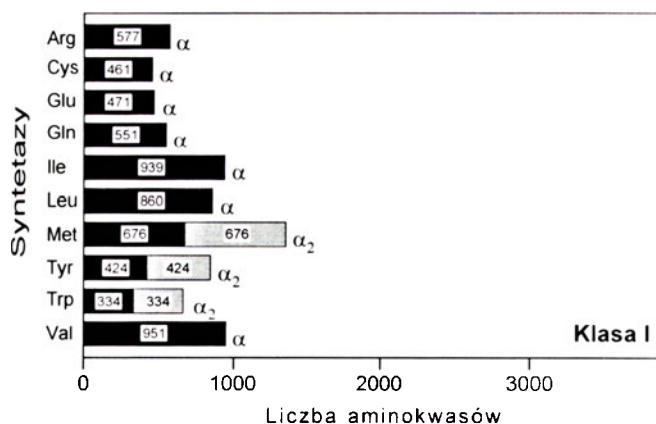
ści zachowywanych (*conserved*) fragmentów (motywów) [1, 6, 10, 11].

Syntetazy aminoacylo-tRNA eukariontów mają masę cząsteczkową większą od ich homologów prokariotycznych np. LeuRS: *E. coli*-97 kDa, *S. cerevisiae*-124 Da; ArgRS: *E. coli*-64 kDa, *M. auratus*-75,5 kDa; HisRS: *E. coli*-47 kDa, *S. cerevisiae*-58 kDa [11]. Przyczyną tej różnorodności jest występowanie dodatkowych peptydów na końcu karboksylowym lub aminowym. Sekwencje te wydają się być istotne dla przebiegu procesów komórkowych innych niż reakcja aminoacylacji, np. mogą determinować rodzaj hydrofobowych oddziaływań podczas tworzenia wysoko-cząsteczkowych kompleksów enzymatycznych [12-14].

Syntetazy aminoacylo-tRNA mogą występować w postaci dwóch rodzajów kompleksów. Jeden z nich złożony jest z syntetazy oraz innych białek np. syntetaza walilo-tRNA występuje w kompleksie z eukariotycznym czynnikiem elongacyjnym eEF-1 [15]. Drugi kompleks, określany jako kompleks wielosyntetazowy, zawiera dziewięć AARS specyficznych dla Pro, Glu, Ile, Leu, Met, Gln, Lys, Arg, Asp [13]. W jego skład mogą również wchodzić inne makrocząsteczki, np. kompleks 5S rRNA z białkiem rybosomalnym dużej podjednostki — L5 (7S RNP-7S rybonukleoproteina) [16]. Składnik ten stymuluje prawdopodobnie aktywność niektórych syntetaz głównie MetRS i IleRS [17]. W kompleksie wielosyntetazowym wykrytym u *Drosophila* zaobserwowano, że dziewięć aktywności syntetaz aminoacylo-tRNA było związane z występowaniem ośmiu polipeptydów. Jeden z nich wykazywał jednocześnie aktywność dwóch różnych syntetaz: GluRS i ProRS. Jest to pierwszy znany przykład chimerycznej syntetazy określanej jako syntetaza gluprolilo-tRNA [13]. Funkcjonalne znaczenie kompleksowej organizacji syntetaz nie jest do końca poznane, chociaż jest zrozumiałe z punktu widzenia ukierunkowanego przepływu substratów (ang. *channeling*). Prawdopodobnie istnienie takich wieloenzymatycznych kompleksów jest konieczne dla wydajnego funkcjonowania aparatu translacyjnego [14].

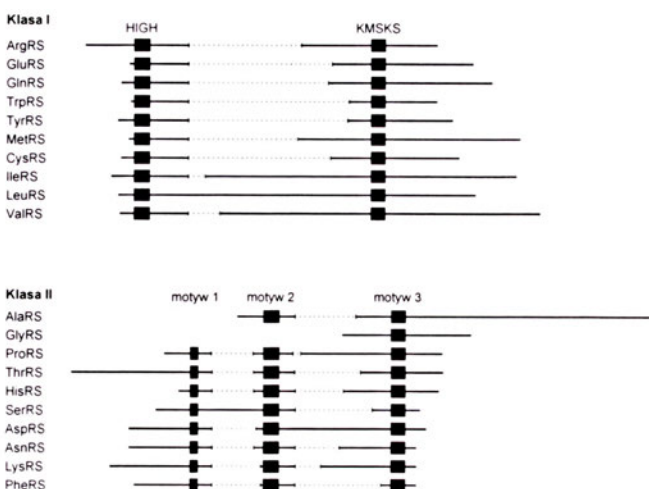
Syntetazy aminoacylo-tRNA wykazują olbrzymie zróżnicowanie zarówno w sekwencji aminokwasowej jak i strukturze przestrzennej. Łańcuchy polipeptydowe zawierają od 334 reszt aminokwasowych dla TrpRS *E. coli* do 1112 dla PheRS *E. coli*. Ich masa cząsteczkowa waha się od 51 kDa dla CysRS *E. coli* do 384 kDa dla AlaRS *E. coli*. Syntetazy aminoacylo-tRNA są monomerami, homo i heterodimerami, a także homotetramerami (Ryc. 2) [11, 18, 19].

Opierając się na wynikach analiz sekwencji aminokwasowych znanych syntetaz aminoacylo-tRNA, oraz na porównaniu struktur kryształów TyrRS i TrpRS z *Bacillus stearothermophilus* [20, 21], MetRS z *E. coli* [22], LysRS z *E. coli* [23], SerRS z *Thermus thermophilus* [24] i *E. coli* [25] oraz kompleksów GlnRS-tRNA<sup>Gln</sup> z *E. coli* [26] oraz AspRS-tRNA<sup>Asp</sup> z drożdży [27] oraz SerRS-tRNA<sup>Ser</sup> z *Thermus thermophilus* [28]



Ryc. 2. Strukturalna różnorodność dwóch klas syntetaz aminoacylo-tRNA. W ramkach podano liczbę aminokwasów w podjednostce lub w całym enzymie.

wszystkie syntetazy aminoacylo-tRNA podzielono na dwie klasy w zależności od zachowywanych aminokwasów lub peptydów występujących w strukturze tych białek. Każda z klas obejmuje dziesięć różnych syntetaz [18] (Ryc. 3). Do klasy I należą syntetazy: ArgRS, GluRS, GlnRS, TrpRS, TyrRS, MetRS, CysRS, IleRS, LeuRS, ValRS. Zawierają one dwa stałe peptydy pentapeptyd Lys-Met-Ser-Lys-Ser (KMSKS) oraz tzw. sekwencję znacznikową (ang. *signature sequ-*



Ryc. 3. Występowanie konserwatywnych fragmentów polipeptydów w sekwencji aminokwasowej syntetaz aminoacylo-tRNA klasy I i II. HIGH i KMSKS oznaczają sekwencje aminokwasowe (zob. tekst).

ence), którą stanowi dodekapeptyd, zakończony najbardziej zachowawczym tetrapeptydem His-X-Gly-His (HXGH), gdzie X oznacza hydrofobowy aminokwas, którym jest najczęściej izoleucyna. Oba motywy HXGH i KMSKS tworzą centrum aktywne (tzw. „Rossmann fold”), w którym występują na przemian odcinki helikalne ( $\alpha$ -helisy) i struktury  $\beta$ -daszkowe (ang.  $\beta$ -sheet) [19]. Podobne motywy obserwowane są w wielu innych białkach wiążących mono i dwunukleotydy np. w dehydrogenazach [29]. Prawdopodobnie dwie reszty histydyny tetrapeptydu HXGH oddziałują z resztami fosforanowymi ATP, a pentapeptyd KMSKS, oprócz wiązania ATP, jest miejscem wiązania (lub zakotwiczenia) końca 3' cząsteczek tRNA [6].

Na podstawie rozwiązanych dotychczas struktur kryształów enzymów klasy I, czyli TryRS, TyrRS z *B. stearothermophilus* oraz MetRS i GlnRS z *E. coli* wyróżniono trzy podklasy syntetaz. Pozostałe enzymy o nieznanym dotychczas strukturze przestrzennej, można zakwalifikować do jednej z tych trzech podklas. Podklasę Ia tworzą syntetazy aminoacylo-tRNA swoiste dla aminokwasów hydrofobowych oraz zawierających siarkę. Są to: MetRS, CysRS, ValRS, IleRS, LeuRS. Podklasę Ib stanowią syntetazy aminokwasów aromatycznych TyrRS, TrpRS, natomiast podklasę Ic syntetazy dla aminokwasów obdarzonych ładunkiem ArgRS, GlnRS, GluRS (Tab. 1) [18].

Klasa II syntetaz aminoacylo-tRNA obejmuje enzymy swoiste dla kwasu asparaginowego, asparaginy, glicyny, fenyloalaniny, proliny, seryny, treoniny, histydyny, alaniny, lizyny. Enzymy te zawierają trzy zachowawcze konserwatywne fragmenty sekwencji zwane motywami (Ryc. 3). Motyw 1 stanowi 18 aminokwasowy peptyd odpowiedzialny za dimeryzację. Syntetazy GlyRS i AlaRS nie posiadają motywu 1.

**Tabela 1.**

Klasyfikacja syntetaz aminoacylo-tRNA. Charakterystyczne sekwencje aminokwasowe przedstawiono w kodzie jednoliterowym, podklasy w kodzie trójliterowym.

Klasa AARS	I			II			
Miejsce aminoacylacji na końcowej rybozie tRNA	2'OH			3'OH			
Charakterystyczna sekwencja aminokwasowa	HIGH KMSKS			(1) ...P...	(2) ...FRXE...	(3) ...GXGXGER...	
Podklasy	a	b	c	a	b	c	d
	LeuRS	TyrRS	ArgRS	HisRS	AspRS	GlyRS	PheRS
	IleRS	TrpRS	GlnRS	ProRS	AsnRS	AlaRS	
	ValRS		GluRS	SerRS	LysRS		
	CysRS			ThrRS			
	MetRS						

U *E. coli* AlaRS występuje on jako tetramer, chociaż monomer jest również aktywny. U organizmów wyższych np. u *Bombyx mori*, AlaRS występuje jako monomer [30]. Motyw 2 obejmujący 23-31 aminokwasów z charakterystycznym tetrapeptydem Phe-Arg-Asp-Glu (FRNE) i motyw 3, liczący 29-34 aminokwasów z konserwatywną sekwencją Gly-Leu-Glu-Arg (GLER) stanowią aktywne miejsca enzymów klasy II [31]. Wydaje się, że aminokwasy w motywie 2 oddziałują z ramieniem akceptorowym tRNA, a aminokwasy w motywie 3 zaangażowane są w wiązanie ATP i aminokwasu [32] (Ryc. 3.). Syntetazy aminoacylo-tRNA należące do klasy II można podzielić na kilka podklas różniących się konserwatywnymi motywami sekwencyjnymi (Tab. 1). Podklasę IIa stanowią enzymy ProRS, ThrRS, HisRS, SerRS, podklasę IIb AspRS, AsnRS i LysRS, a podklasę IIc syntetazy dla Gly i Ala, nie posiadające wszystkich charakterystycznych motywów strukturalnych. Do podklasy II d należy PheRS [18].

Podział syntetaz aminoacylo-tRNA na dwie klasy, w zależności od występowania charakterystycznych elementów strukturalnych, związany jest także z mechanizmem działania tych enzymów. Dotyczy to miejsca acylacji rybozy adenosyny znajdującej się przy końcu 3' tRNA. Wszystkie syntetazy klasy I przyłączają aminokwas w pozycji 2' rybozy, podczas gdy syntetazy klasy II z wyjątkiem PheRS w pozycji 3' (Tab. 1) [6, 18]. Interesująca pod tym względem jest syntetaza fenyloalanylo-tRNA z *T. thermophilus*, przyłącza ona jednocześnie dwie cząsteczki fenyloalaniny do rybozy w pozycji 2' i 3' [33].

Jednym z kluczowych zagadnień w badaniach syntetaz jest mechanizm działania tych enzymów. Na drodze do rozszyfrowania tego problemu poznano organizację domen funkcjonalnych dla syntetazy tyrozylo-tRNA z *Bacillus stearothermophilus*, [34] należącej do klasy I i syntetazy alanylo-tRNA z *E. coli*, [35] należącej do klasy II. Analizowano je wykorzystując różne mutanty delecyjne. Stwierdzono, że na końcu aminowym enzymu znajduje się domena aktywacji aminokwasu oraz sekwencja, która oddziałuje z ramieniem akceptorowym tRNA. Dalej, w kierunku końca C-występuje fragment wiążący tRNA, głównie poprzez ramię i pętlę D oraz ramię antykodonowe. Karboksylowy koniec enzymu odpowiedzialny jest za dimeryzację podjednostek (Ryc. 4) [31, 34, 35]. Syntetazy aminoacylo-tRNA klasy II wydają się mieć bardziej zróżnicowaną strukturę niż syntetazy klasy I. Obserwuje się w nich odstępstwa od przedstawionej liniowej organizacji domen funkcjonalnych (Ryc. 4).

### III. Funkcje syntetaz aminoacylo-tRNA

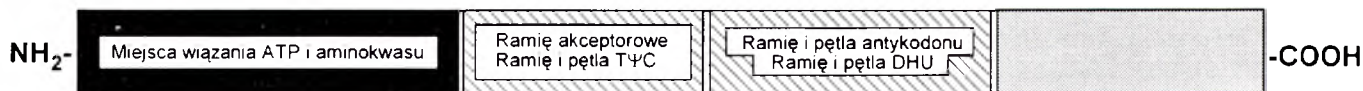
#### III-1. Aminoacylacja tRNA

Podstawową funkcją syntetaz aminoacylo-tRNA jest katalizowanie reakcji przyłączania aminokwasu

## Kataliza

## Wiązanie i rozpoznanie tRNA

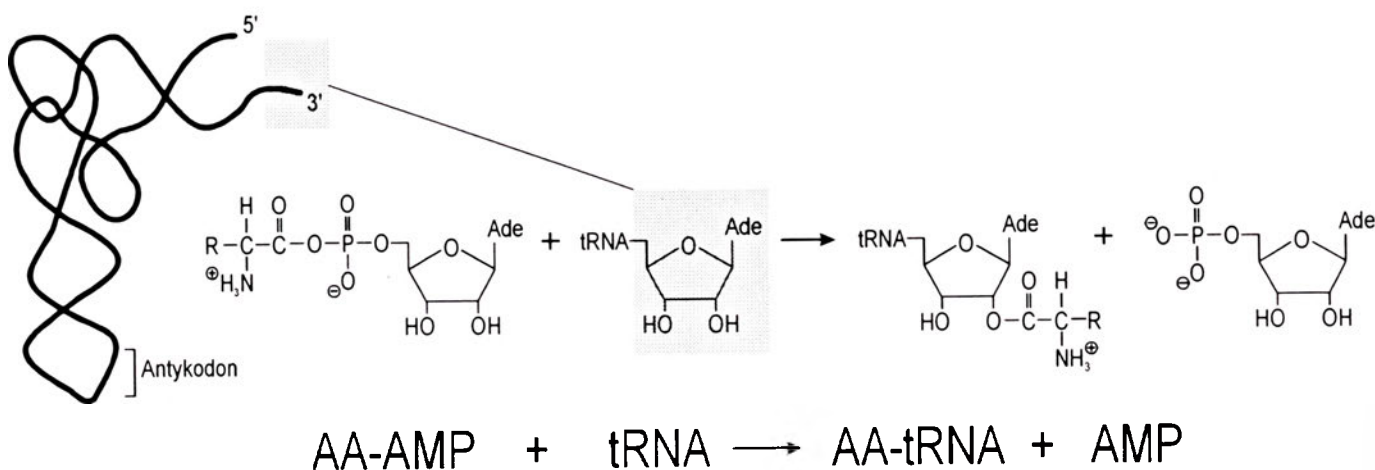
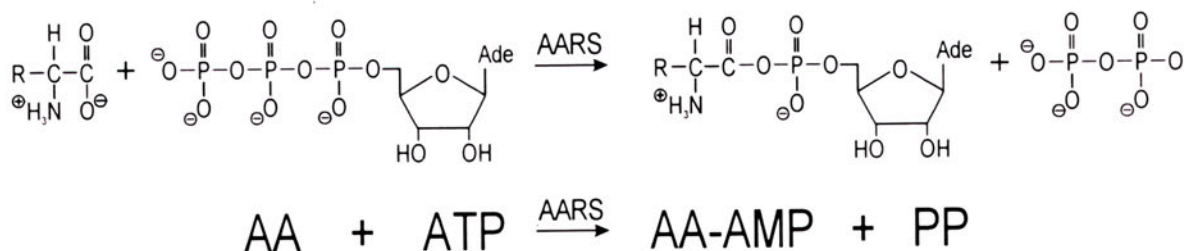
## Oligomeryzacja



Ryc. 4. Schemat budowy syntetaz aminoacylo-tRNA. N-koniec odpowiedzialny jest za katalizę reakcji aminoacylacji, a C-koniec za oligomeryzację podjednostek enzymu.

do cząsteczki tRNA. Reakcja aminoacylacji jest dwuetapowa (Ryc. 5). W pierwszym etapie następuje aktywacja aminokwasu (AA) przez AARS, w obecności ATP i powstanie aminoacyloadenylationu. Jest to mieszanina bezwodnik, w którym grupa karboksylowa aminokwasu połączona jest z grupą fosforanową AMP. W drugim etapie aminokwas zostaje przeniesiony na cząsteczkę odpowiedniego tRNA. W większości przypadków pierwszy etap może odbywać się bez tRNA. Wyjątkami są ArgRS, GluRS, GlnRS, gdzie dla reakcji wymiany  $\text{PPi-ATP}$  konieczna jest obecność tRNA [6, 18]. Procesowi syntezy aminoacylo-tRNA towarzyszy naprawa błędów (ang. *proofreading*) [36, 37]. IleRS oprócz syntezy izoleucylo-tRNA, może również aktywować walinę tworząc związek z enzymem walilo-AMP. Jednakże aktywowana walina nie zostaje przeniesiona na tRNA<sup>Ile</sup>, ponieważ właśnie tRNA<sup>Ile</sup> katalizuje hydrolizę walilo-AMP, co zapobiega wbudowaniu błędnego aminokwasu. W procesie syntezy aminoacylo-tRNA, etap przeniesienia aminokwasu jest bardziej specyficzny niż etap aktywacji [38]. Selekcja odpowiedniego tRNA i swobodnego aminokwasu odbywa się poprzez tworzenie unikatowego, specyficznego kompleksu tRNA — syntetaza aminoacylo-tRNA. O swoistości tego procesu decydują dwa

czynniki: rozpoznawanie i identyczność tRNA. Rozpoznawanie odnosi się do identyfikacji danego tRNA przez odpowiednią syntetazę na podstawie specyficznych elementów strukturalnych tRNA (ang. *recognition elements*). Identyczność tRNA obejmuje elementy rozpoznawalne przez swoistą syntetazę i jednocześnie cechy strukturalne, które uniemożliwiają rozpoznawanie tRNA przez niehomologiczną syntetazę (ang. *discrimination elements*) [39]. Większość elementów tRNA rozpoznawanych przez syntetazy aminoacylo-tRNA znajduje się w ramieniu akceptorowym i antykodonie. Do wyjątków należą: tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>Leu</sup>, których antykodon nie jest zaangażowany w bezpośrednie oddziaływanie z AARS. W antykodonie LAU w tRNA<sup>Ile</sup> z *E. coli* występuje modyfikowana cytozyna-lizydyna, uniemożliwiająca przyłączenie metioniny. W drożdżowym tRNA<sup>Asp</sup> dla uniknięcia przyłączenia błędnego aminokwasu zasada w pozycji 37 jest modyfikowana. W tRNA<sup>His</sup> istotnym elementem strukturalnym jest guanozyna w pozycji G<sub>(-1)</sub>. Brak jest jednak bezpośredniej korelacji między ważnymi dla rozpoznawania przez enzym pozycjami nukleotydów w tRNA, a podziałem syntetaz aminoacylo-tRNA na klasy (Tab. 2) [40].



Ryc. 5. Schemat dwuetapowej reakcji aminoacylacji tRNA w obecności syntetazy AARS. W pierwszym etapie następuje aktywacja aminokwasu z wytworzeniem aminoacyloadenylationu, w drugim aminoacylacja tRNA.



**Tabela 2.**

Elementy strukturalne tRNA zaangażowane w rozpoznawaniu przez syntetazy.

Aminokwas										
Klasa I AARS	Met	Cys	Leu	Ile	Val	Trp	Tyr	Arg	Glu	Gln
Antykodon	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+
Pętla dodatkowa w tRNA	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–
Nukleozyd w pozycji 73	A	U	A	A	A	G	A	A/G	G	G
Aminokwas										
Klasa II AARS	Asp	Asn	Lys	His	Ser	Thr	Pro	Ala	Gly	Phe
Antykodon	+	+	+	+	–	+	+	–	+	+
Pętla dodatkowa w tRNA	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
Nukleozyd w pozycji 73	G	G	A	G-1	G	A	A	A	U	A

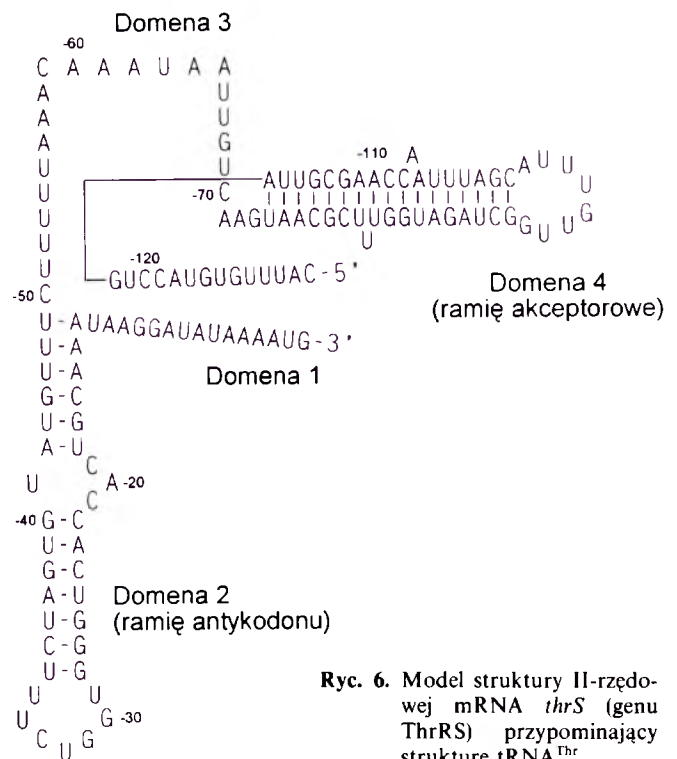
### III-2. Autoregulacja

Znaleziono dowody wskazujące, że syntetazy aminoacylo-tRNA autoregulują ekspresję swoich genów, zarówno na poziomie transkrypcji jak i translacji. Ekspresja genu *thrS* *E. coli*, kodującego syntetazę treonylo-tRNA (ThrRS) regulowana jest na poziomie translacji, pod wpływem produktu końcowego [41]. Gdy poziom ThrRS jest zbyt wysoki w porównaniu z zapotrzebowaniem komórkowym, wówczas powstające w nadmiarze białko wiążąc się do tzw. sekwencji liderowej zlokalizowanej przed startem translacji własnego mRNA blokuje miejsce wiązania rybosomu i zatrzymuje biosyntezę. Odcinek liderowy mRNA wykazuje sekwencyjne i strukturalne podobieństwo do cząsteczki tRNA. Wyróżnić w nim można 4 elementy (domeny) struktury II-rzędowej. Domena 1 zawiera tzw. sekwencję Shine-Dalgarno, czyli miejsce wiązania do rybosomu, oraz kodon inicjacji translacji. Domena 2 podobna jest do siedmionukleotydowej pętli antykodonowej tRNA<sup>Thr</sup>, zawiera antykodon treoniny CGU pętli. Domena 3 rozdziela domeny 2 i 4 i utrzymuje je w odpowiedniej odległości przestrzennej. Domena 4 wykazuje podobieństwa do ramienia akceptorowego i zawiera sekwencję CCA (Ryc. 6). tRNA<sup>Thr</sup> podobnie jak odcinek liderowy mRNA wykazuje powinowactwo do syntetazy treonylo-tRNA i działa jako antyrepresor translacji. Usuwa on ThrRS z mRNA i umożliwia prawidłowe funkcjonowanie rybosomu. System represji i derepresji inicjacji translacji pozwala na utrzymanie równowagi między biosyntezą syntetazy aminoacylo-tRNA a ilością tRNA i uniknięcie kumulowania się wolnego tRNA w komórce [6, 41, 42].

Podobną funkcję regulatorową wykazano dla syntetazy alanylo-tRNA z *E. coli*, która wiąże się specyficznym do palindromowej sekwencji otaczającej miejsce startu transkrypcji własnego genu. Wydaje się, że

domena AlaRS zaangażowana w oddziaływanie z DNA nie jest konieczna dla katalizowania reakcji aminoacylacji [1, 6].

Poziom drożdźowej syntetazy lizylo-tRNA zależy od ilości enzymu i tRNA<sup>Lys</sup> w komórce [43]. Przy obniżonej aktywności LysRS i niepełnej aminoacylacji tRNA<sup>Lys</sup> następuje aktywacja białka GCN2. Analiza jego sekwencji aminokwasowej wskazuje, że białko to zawiera domenę podobną do syntetazy histydylo-tRNA. Przypuszcza się, że niezaminoacylowany tRNA wiąże się do regionu podobnego do HisRS i w ten sposób wpływa na wzrost aktywności domeny kinazowej białka GCN2. Domena HisRS w GCN2 może wiązać też inne tRNA. Aktywne białko GCN2 fosforyluje podjednostkę  $\alpha$  czynnika inicjatorowego eIF-2, powodując obniżenie jego aktywności oraz



**Ryc. 6.** Model struktury II-rzędowej mRNA *thrS* (genu ThrRS) przypominający strukturę tRNA<sup>Thr</sup>

zwiększenie syntezy innego białka GCN4. GCN4 jest transkrypcyjnym aktywatorem genu GCD5, kodującego syntetazę lizylo-tRNA. Synteza białka GCN4 kontrolowana jest na poziomie translacji przez 4 krótkie, otwarte ramki odczytu znajdujące się w kierunku 5' od startu translacji (uORF-upstream open reading frame) [43]. Przy obniżonej aktywności eIF-2 $\alpha$ , inicjacja translacji jest mniej wydajna i większość krótkich uORF jest omijana, a translacji ulega właściwa ramka odczytu białka GCN4. Wynika z tego, że ufosforylowana forma czynnika inicjatorowego eIF-2 $\alpha$  powoduje derepresję translacji GCN4. Białko GCN4 wiąże się do sekwencji TGACTC genu GCD5, aktywując transkrypcję. Zwiększenie ilości LysRS powoduje podwyższenie poziomu Lys-tRNA<sup>Lys</sup> i jednocześnie zmniejszenie ilości nieaminoacylowanego tRNA<sup>Lys</sup>. W konsekwencji zredukowany poziom wolnego tRNA<sup>Lys</sup> prowadzi do spadku aktywności kinazy GCN2, przez co fosforylacja eIF2 $\alpha$  powraca do poziomu wyjściowego, a translacja GCN4 ulega ponownej represji (Ryc. 7) [43].

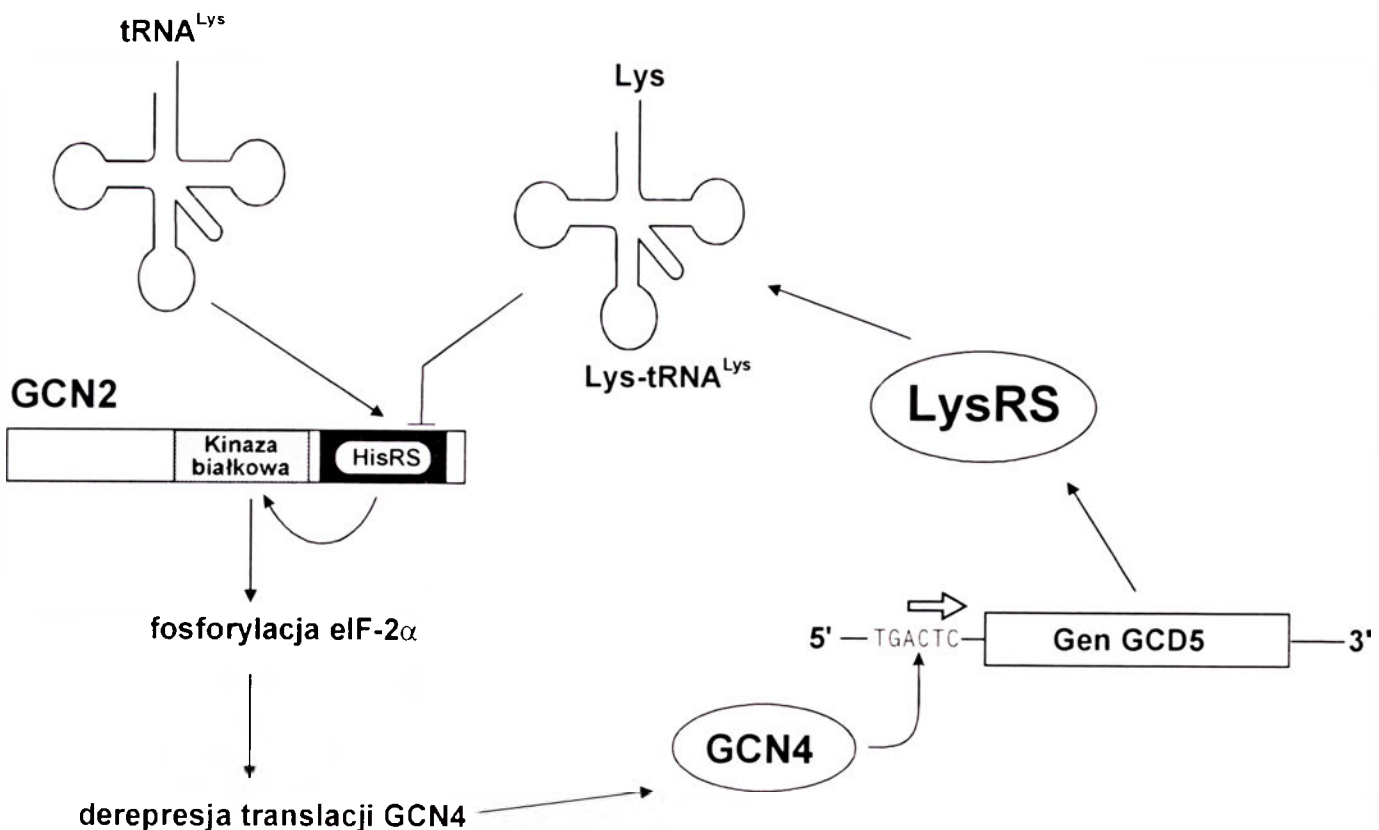
### III-3. Udział w dojrzewaniu RNA

Niektóre geny mitochondrialne zawierają introny, które ulegają samowycinaniu *in vitro*. Jednak *in vivo* wydajność procesu dojrzewania RNA (ang. *splicing RNA*) zależy od obecności specyficznych czynników białkowych. Mogą to być maturazy, białka kodowane przez introny, lub też białka kodowane przez genom jądrowy. Wśród tych białek są również syntetazy

aminoacylo-tRNA [44, 45].

U *Neurospora crassa* białko Cyt-18, produkt genu *cyt-18*, niezbędne jest do składania mtRNA. Białko to zostało zidentyfikowane jako mitochondrialna syntetaza tyrozylo-tRNA [46, 47]. Zawiera ona na N-końcu istotną dla procesu dojrzewania RNA domenę, której nie zawierają syntetazy tyrozylo-tRNA z bakterii czy drożdży. Nie jest ona istotna dla katalizowania reakcji aminoacylacji. Występowanie tej domeny sugeruje, że mitochondrialna syntetaza tyrozylo-tRNA z *N. crassa* nabyła zdolność wycinania intronów stosunkowo późno w ewolucji lub też, że inne AARS podczas ewolucji utraciły tę końcową domenę. Białko Cyt-18 zaangażowane jest w wycinanie wielu różnorodnych intronów grupy I, które wykazują minimalną homologię w sekwencji nukleotydowej. Motywami rozpoznawanymi przez białko wydają się być wysoko konserwatywne elementy strukturalne katalitycznego rdzenia tych intronów, które przypominają strukturę tRNA. Introny RNA oraz tRNA<sup>Tyr</sup> wykazują powinowactwo do miejsca wiązania w białku Cyt-18. Sugeruje się, że białko Cyt-18 wiążąc się do intronu formuje i stabilizuje go w konformacji wymaganej dla katalitycznej aktywności rdzenia intronu [44, 46-48]. Mutacje TyrRS w domenie odpowiedzialnej za wiązanie tRNA hamują zarówno reakcję aminoacylacji jak i proces dojrzewania RNA, jednakże bez utraty zdolności białka do formowania tyrozylo-adenylanu.

U *Podospora anserina* znaleziono również dwufunkcyjne mitochondrialne białko YST1, które wykazuje aktywność syntetazy tyrozylo-tRNA i jest zaangażo-

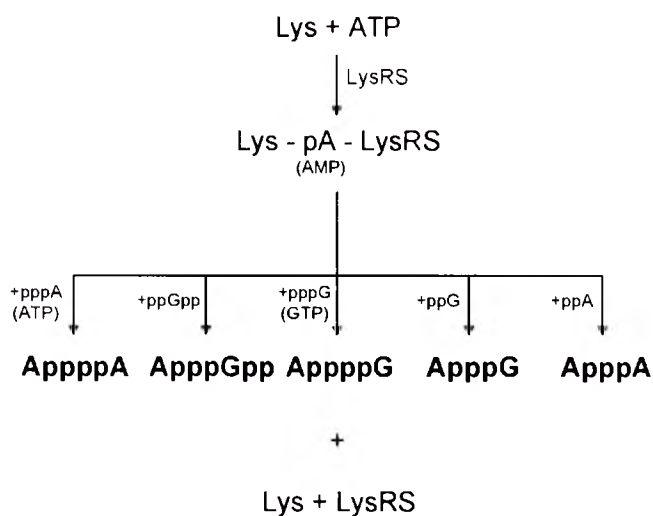


Ryc. 7. Model autoregulacji ekspresji genu kodującego LysRS (GCD5) u drożdży. GCN2 — białko wykazujące aktywność kinazy oraz strukturalne podobieństwo do HisRS, eIF — eukariotyczny czynnik inicjatorowy, GCN4 — aktywator transkrypcji.

wane w dojrzewaniu RNA [49].

### III-4. Biosynteza alarmonów

W każdym organizmie eukariotycznym i prokariotycznym znajdującym się w warunkach stresowych spowodowanych np. podwyższoną temperaturą, wysokim stężeniem alkoholu lub utleniacza, następuje indukcja syntezy białek szoku. Wśród nich u *E. coli* zidentyfikowano syntetazę lizylo-tRNA [7]. Niektóre syntetazy mają zdolność katalizowania reakcji syntezy alarmonów, czyli cząsteczek regulatorowych, które są „czujnikami szoku” i informują komórkę o zmienionych warunkach, powodując rozpoczęcie tzw. „odpowiedzi na stres”. Do alarmonów zalicza się dwunukleotydowe oligofosforany: Ap<sub>4</sub>A, Ap<sub>3</sub>Gpp, Ap<sub>4</sub>G, Ap<sub>3</sub>G, Ap<sub>3</sub>A, których syntezę przedstawia (Ryc. 8). Jedną z cząsteczek ATP (pppA) w tych dwunukleotydach może być zastąpiona przez ppGpp, GTP, GDP, ADP. Mikromolarne stężenie jonów cynku stymuluje syntezę alarmonów przez niektóre syntetazy np. AlaRS, PheRS, ProRS a zwłaszcza LysRS u *E. coli* [50]. Sugeruje się, że syntetazy aminoacylo-tRNA mogą być wrażliwe na stres oksydacyjny, ponieważ niektóre z tych enzymów posiadają grupy tiolowe łatwo ulegające utlenieniu. Takie utlenienie może obniżać aktywność syntetaz w reakcji aminoacylacji tRNA, natomiast podwyższona zostaje wówczas aktywność syntezy dwunukleotydowych oligofosforanów [50]. Inna hipoteza zakłada, że cząsteczki tRNA mogą być czujnikami stresu. Zmiany w modyfikowanych nukleotydach tRNA spowodowane warunkami

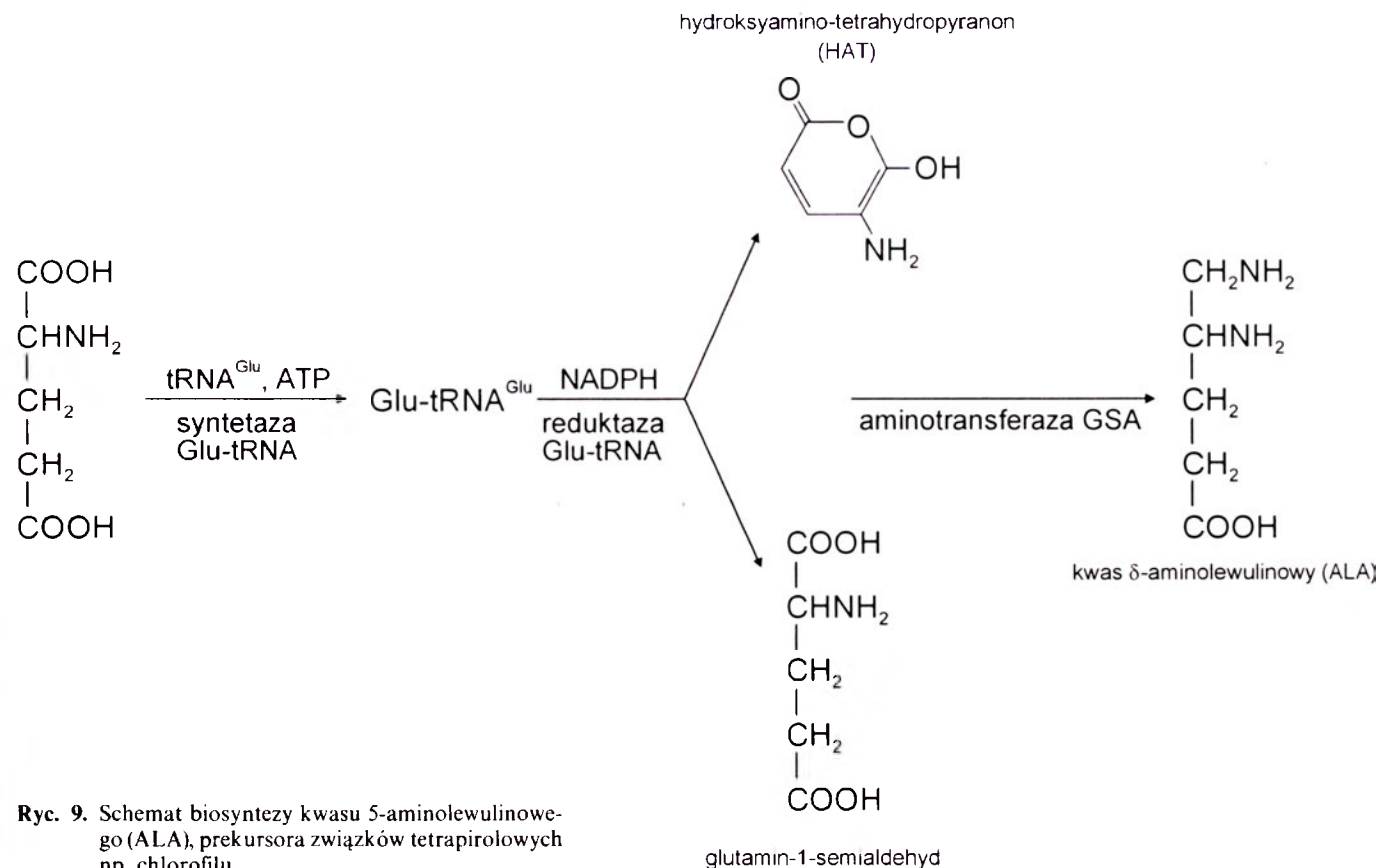


Ryc. 8. Schemat biosyntezy alarmonów. W reakcji aminokwasu z ATP katalizowanej przez syntetazę AARS powstaje aminoacyloadenyln jako produkt przejściowy. Może on ulegać reakcji z różnymi pochodnymi ATP i GTP z wytworzeniem odpowiednich dwunukleotydów oligofosforanów uwalniając aminokwas i enzym.

stresowymi mogą aktywować odpowiednią syntetazę do katalizowania reakcji syntezy alarmonów [51].

### III-5. Udział w biosyntezie chlorofilu

Syntetaza glutamyl-tRNA (GluRS) jest zaangażowana w proces biosyntezy chlorofilu u roślin wyższych, glonów, cyjanobakterii i niektórych fotosyntetyzujących i niefotosyntetyzujących bakterii [52]. Biosynteza chlorofilu rozpoczyna się od utworzenia glutamyl-tRNA<sup>Glu</sup> (Glu-tRNA<sup>Glu</sup>) przy udziale syntetazy gluta-



Ryc. 9. Schemat biosyntezy kwasu 5-aminolewulinowego (ALA), prekursora związków tetrapiolowych np. chlorofilu.

mylo-tRNA. W następnym etapie reduktaza glutamylotRNA (GluTR) przekształca glutamylotRNA<sup>Glu</sup> do glutamino 1-semialdehydu. Następnie cząsteczka ta ulega transaminacji, a powstający kwas 5-aminolewulinowy (ALA) jest prekursorem związków tetrapiroloowych m.in. chlorofilu (Ryc. 9). U zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii* wykazano, że syntetaza glutamylotRNA tworzy stabilny kompleks z reduktazą glutamylotRNA. Kompleks ten umożliwia bezpośrednio przeniesienie utworzonego glutamylotRNA<sup>Glu</sup> z GluRS na GluTR. Jest to mechanizm ukierunkowania GluTR dla biosyntezy chlorofilu umożliwiający uniknięcie współzawodnictwa o produkt reakcji aminocyklacji ze szlakiem biosyntezy białek w chloroplastach [52-54].

### III-6. Udział AARS w powstawaniu chorób autoimmunologicznych

Wydaje się, że jedną z przyczyn chorób związanych z autoimmunoagresją jest występowanie przeciwciał dla syntetaz aminoacylotRNA (anty-AARS). Niektóre syntetazy aminoacylotRNA np. AlaRS, GlyRS, HisRS, IleRS, SerRS, ThrRS są antygenami dla przeciwciał znajdujących się w surowicy pacjentów cierpiących na myositis (zapalenie mięśni), polimyositis (zapalenie wielomięśniowe) oraz dermatomyositis (zapalenie skórno-mięśniowe) [55-61]. Przeciwciała te hamują reakcję aminocyklacji tRNA poprzez wysoce specyficzne wiązanie się do centrum aktywnego enzymu [55-61]. Wydaje się, że są one skierowane przeciwko konformacyjnemu epitopom pojedynczych syntetaz, ponieważ anty-AARS nie wiążą się do termicznie zdenaturowanych enzymów [56]. Większość przeciwciał tworzy swoiste kompleksy z jedną syntetazą aminoacylotRNA, ale w przypadku przeciwciał skierowanych przeciwko syntetazie izoleucylotRNA (anty-OJ), która jest składnikiem kompleksu wielosyntetazowego, immunoprecypitacji ulega cały kompleks. Jest to wyjątek, w którym jeden rodzaj przeciwciał rozpoznaje więcej niż jedną syntetazę [55, 56]. Ponadto znaleziono anty-AARS skierowane jednocześnie przeciwko AlaRS i tRNA<sup>Ala</sup> [56, 57]. Najczęściej spotykanymi w surowicy są przeciwciała anty-Jo-1, skierowane przeciwko HisRS, występujące u 35-45% cierpiących na myositis [56]. Pomimo, że surowice poszczególnych pacjentów zawierają zróżnicowane spektrum poliklonalnych anty-Jo-1, wszystkie one rozpoznają prawdopodobnie ten sam fragment struktury HisRS. Surowice zawierające przeciwciała anty-Jo-1, oprócz immunoprecypitacji HisRS, wytrącają także tRNA<sup>His</sup>. Przypuszcza się, że anty-Jo-1 uniemożliwiają dysocjację AARS-tRNA i w ten sposób inhibują działanie HisRS [58]. Przeciwciała anty-Jo-1 obniżają katalityczną aktywność ludzkiej syntetazy histydylotRNA o 90%. U innych kręgowców inhibicja wynosi: 89% dla gadów, 83% dla ptaków i 52% dla ryb. Jak z tego wynika spadek aktywności HisRS powodowany

przez anty-Jo-1 maleje wraz ze wzrostem odległości filogenetycznej danej gromady systematycznej od człowieka. Wiadomo również, że aktywność syntetaz histydylotRNA z drożdży, glonów i bakterii nie zmienia się pod wpływem anty-Jo-1, co jednoznacznie sugeruje, że epitopy HisRS rozpoznawane przez anty-Jo-1 są stałe dla enzymów zwierzęcych.

Dotychczas niewiele wiadomo o molekularnym mechanizmie powstawania myositis. Przypuszcza się, że przeciwciała powstają początkowo jako wynik immunologicznej odpowiedzi organizmu na obecność obcego antygeny, który na zasadzie molekularnej mimikry przypomina strukturę białek gospodarza. Potwierdzeniem tego może być tworzenie kompleksu syntetaz aminoacylotRNA i wirusowych RNA, które mają strukturę podobną do cząsteczek tRNA (ang. *tRNA-like structure*) [57].

Artykuł otrzymano 15 lutego 1995 r.

Zaakceptowano do druku 20 sierpnia 1995 r.

### Piśmiennictwo

- Schimmel P (1987) *Ann Rev Biochem* 56: 125-158
- Chiu MI, Mason TL, Fink GR (1992) *Genetics* 132:
- Csank C, Martindale DW (1992) *J Biol Chem* 267: 4592-4599
- Ferber S, Ciechanover A (1987) *Nature (Land)* 326: 808-811
- Sivaram P, Deutscher MP (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3665-3669
- Lapointe J, Giege R (1991) w: Translation In Eukariotes, H. Trachsel wyd., 35-51
- Charlier J, Sanchez R (1987) *Biochem J* 248: 43-51
- Ito K, Kawakami K, Nakamura Y (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 302-306
- Putzer H, Brakhage A, Grunberg-Manago M (1990) *J Bacteriol* 172: 4593-4602
- Mirande M (1991) *Progress in Nucl Acids Res & Mol Biol* 40: 95-142
- Meinell T, Mechulam Y. and Blanquet S (1995) W: In Soll, D., RajBhandary, U. (ed.), tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function. American Society for Microbiology, Washington, pp. 251-292.
- Sivaram P, Vellekamp G, Deutscher MP (1988) *J Biol Chem* 263: 18891-18896
- Cerini C, Kerjan P, Astier M, Gratecos D, Mirande M, Semeriva M (1991) *EMBOJ* 10: 4267-4277
- Clemens MJ (1990) *Trends Biochem Sci* 15: 172-175
- Motorin YA, Wolfson AD, Orlovsky AF, Glandilin KL (1988) *FEBS Lett* 238: 262-264
- Ogata K, Kurakashi A, Tanaka S, Ohsue H, Terao K (1991) *J Biochem* 110: 1030-1036
- Ogata K, Kurahashi A, Keumochi N, Terao K (1991) *J Biochem* 110: 1037-1044
- Moras D (1992) *Trends Biochem Sci* 17: 159-164
- Schimmel P (1991) *Trends Biochem Sci* 16: 1-3
- Brick P, Bhat TN, Blow DM (1989) *J Mol Biol* 208: 83-98
- Double S, Bricogne G, Gilmore C, Carter CW (1995) *Structure* 3: 17-31
- Brunie S, Zelwer C, Risler JL (1990) *J Mol Biol* 216: 411-424
- Onesti S, Miller AD, Brick P (1995) *Structure* 3: 163-176
- Fujinaga M, Berthet-Colominas C, Yaremchuk AD, Tukali MA, Cusack S (1993) *J Mol Biol* 234: 222-233

25. Cusack S, Berthet-Colominas C, Hartlein M, Nassar N, Leberman R (1990) *Nature (Lond)* **347**: 249-255
26. Rould MA, Perona JJ, Soll D, Steitz TA (1989) *Science* **246**: 1135-1142
27. Ruff M, Kirshnaswamy S, Boeglin M, Poterszman A, Mitschler A, Podjarny A, Rees B, Thierry JC, Moras D (1991) *Science* **252**: 1682-1689
28. Bion V, Yaremchuk AD, Tukali MA, Cusack S (1994) *Science* **263**: 1404-1410
29. Moras D (1990) *Nature (Lond)* **344**: 195-197
30. Chang PK, Dignam JD (1991) *J Biol Chem* **265**: 20898-20906
31. Burbaum JJ, Schimmel P (1991) *J Biol Chem* **266**: 16965-16968
32. Cusack S, Hartlein M, Leberman R (1991) *Nucl Acids Res* **419**: 3489-2498
33. Stepanov VG, Moor NA, Ankilova VN, Lavrik OI (1992) *FEBS Lett* **311**: 192-194
34. Waye MMW, Winter G, Wilkinson AJ, Fersht AR (1983) *EMBO J* **2**: 1827-1829
35. Jasin M, Regan L, Schimmel P (1983) *Nature (Lond)* **306**: 441-447
36. Jakubowski H (1991) *EMBO J* **10**: 593-598
37. Cramer F, Freist W (1987) *Acc Chem Res* **20**: 79-84
38. Stryer L (1988) W: Biochemistry wyd. W.H. Freeman and Company New York
39. Schulman LH (1991) *Progress in Nucl Acids Res & Mol Biol* **41**: 23-88
40. Delarue M, Moras D (1993) *BioEssays* **15**: 675-687
41. Moine H, Ehresmann B, Romby P, Ebel JP, Grunberg-Manago M, Springer M, Ehresmann C (1990) *Biochem Biophys Acta* **1050**: 343-350
42. Romby P, Brunel C, Caillet J, Springer M, Grunberg-Manago M, Westhof E, Ehresmann C, Ehresmann B (1992) *Nucleic Acids Res* **20**: 5633-5640
43. Lanker S, Bushman JL, Hinnebusch AG, Trachsel H, Mueller PP (1992) *Cell* **70**: 647-657
44. Lambowitz AM, Perlman PS (1990) *Trends Biochem Sci* **15**: 440-444
45. Mans RM, Pleij CWA, Bosch L (1991) *Eur J Biochem* **201**: 303-324
46. Cherniack AD, Garriga G, Kittle JD, Akins RA, Lambowitz AM (1990) *Cell* **62**: 745-755
47. Guo Q, Lambowitz AM (1992) *Genes & Development* **6**: 1357-1372
48. Mohr G, Lambowitz AM (1991) *Nature (Lond)* **354**: 164-167
49. Kamper U, Kuck U, Cherniack AD, Lambowitz AM (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 499-511
50. Zamecnik P (1983) *Anal Biochem* **134**: 1-10
51. Lee PC, Bochner BR, Ames BN (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 7496-7500.
52. Jahn D, O'Neill GP, Verkamp E, Soll D (1992) *Plant Physiol Biochem* **30**: 245-253
53. Jahn D (1992) *FEBS Lett* **314**: 77-80
54. Chng TE, Wegmann B, Wang W (1990) *Plant Physiol* **93**: 1641-1649
55. Targott IN, Trien EP, Miller FW (1993) *J Clin Invest* **91**: 2556-2564
56. Targott IN (1993) *J Invest Dermatol* **1**: 1165-1235
57. Targott IN, Arnett FC, Reichlin M (1988) *Arthritis & Rheumatism* **31**: 515-524
58. Mathews MB, Bernstein RM (1983) *Nature (Lond)* **304**: 177-179
59. Bunn CC, Mathew MB (1987) *Science* **238**: 1116-1119
60. Targoff IN, Thien EP, Plotz PH, Miller FW (1992) *Arthritis & Rheumatism* **35**: 821-830
61. Salomon R, Littaver UZ (1974) *Nature (Lond)* **249**: 32-34

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

**Obecny adres:**

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

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

# Serynowo/treoninowe fosfatazy fosfoproteinowe w tkance mózgowej

## Serine/Threonine phosphoprotein phosphatases in brain tissue

LUDMIŁA ŻYLIŃSKA<sup>1</sup>,  
LILLA LACHOWICZ<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Charakterystyka fosfataz fosfoproteinowych w tkance nerwowej
  - II-1. Fosfataza PP1
    - II-1A. Regulacja aktywności PP1 przez DARPP-32
  - II-2. Fosfataza PP2A
  - II-3. Fosfataza PP2B
  - II-4. Fosfataza PP2C
  - II-5. Fosfataza PP3
  - II-6. Inhibitory fosfataz fosfoproteinowych
- III. Udział defosforylacji białek w procesach neuronalnych

**Wykaz stosowanych skrótów:** NMDA — kwas N-metylo D-asparaginowy; PKA — kinaza białkowa zależna od cAMP; PKC — kinaza białkowa zależna od  $Ca^{2+}$  i fosfolipidów; CaM-kinaza II — wielofunkcyjna kinaza białkowa zależna od  $Ca^{2+}$  i kalmoduliny; LTP — długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. *long-term potentiation*); LTD — długotrwałe osłabienie synaptyczne (ang. *long-term depression*); cAMP — cykliczny adenozymonofosforan; cGMP — cykliczny guanozymonofosforan; CaM — kalmodulina; DARPP-32 — (ang. *dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein*), naturalny białkowy inhibitor fosfatazy PP1; OA — kwas okadejowy (ang. *okadaic acid*); D-APV — kwas D-amino-5-fosfonowalerianowy, antagonist receptorów NMDA.

### I. Wstęp

Odwracalna fosforylacja białek w tkance nerwowej uważana jest obecnie za jeden z głównych mechanizmów kontrolujących wewnątrzkomórkowe procesy takie jak: transport błonowy, neurosekrecja, przewodnictwo kanałów jonowych czy sekwencja wydarzeń odpowiedzialnych za zjawisko pamięci. Fosforylacja seryny, treoniny lub reszt tyrozylowych przez specyficzne kinazy białkowe moduluje ich funkcje biologiczne, na skutek zmiany konformacji białek. W większości białek neuronalnych fosforylowana jest seryna, w niektórych treonina, w niewielu natomiast tyrozyna. Często także występuje w białkach kilka miejsc fosforylacji. Poszczególne z nich mogą być fosforylowane

### Contents:

- I. Introduction
- II. Characterization of phosphoprotein phosphatases in nervous tissue
  - II-1. Phosphatase PP1
    - II-1A. Regulation of PP1 activity by DARPP-32
  - II-2. Phosphatase PP2A
  - II-3. Phosphatase PP2B
  - II-4. Phosphatase PP2C
  - II-5. Phosphatase PP3
  - II-6. Inhibitors of phosphoprotein phosphatases
- III. The evidence of proteins dephosphorylation in neural processes

przez jedną kinazę, choć wykazano też, że pojedyncze miejsca ulegają fosforylacji katalizowanej przez różne kinazy białkowe. Aktywność kinaz białkowych regulowana jest przez wiele czynników m.in. wtórne przekaźniki, allosteryczne efektory oraz fosforylację.

Defosforylacja białek, stanowiąca mechanizm wyłączający procesy uruchamiane przez kinazy białkowe, przeprowadzana jest przez specyficzne fosfatazy fosfoproteinowe, jednak ich rola w tkance nerwowej nie jest, jak dotąd, w pełni poznana. W 1989 r. w tomie 39 *Post Biochem* [1] ukazała się praca przeglądowa poświęcona fosfatazom białkowym, natomiast niniejszy artykuł ma na celu podsumowanie obecnie dostępnych informacji, dotyczących występowania i udziału serynowo/treoninowych fosfataz białkowych w procesach zachodzących w tkance nerwowej.

Pierwszym kryterium podziału fosfataz białkowych była ich zdolność do specyficznej defosforylacji podjednostki  $\beta$  kinazy fosforylazowej oraz wrażliwość na inhibicję powodowaną przez nanomolarne stężenia dwóch małych, termo- i kwasoodpornych białek, nazywanych inhibitorem 1 i inhibitorem 2. Cechy te wykazywał typ 1 fosfataz (PP1). Typ 2 (PP2) preferencyjnie defosforylował podjednostkę  $\alpha$  kinazy fosforylazowej oraz wykazywał brak wrażliwości na inhibitory 1 i 2. Podział typu 2 na podtypy 2A, 2B i 2C nastąpił na podstawie kolejnego kryterium, jakim była obecność jonów dwuwartościowych, niezbędnych do aktywacji poszczególnych fosfataz. PP2A nie wymaga żadnych jonów, PP2B osiąga pełną aktywność w obecności  $Ca^{2+}$ , natomiast PP2C zależna jest od jonów  $Mg^{2+}$ .

<sup>1</sup> Dr, <sup>2</sup> prof. dr hab., II Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii, A.M. ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

Należy podkreślić, że ze względu na wszechobecność fosfataz białkowych, kryteria te mają zastosowanie dla enzymów występujących w różnych tkankach i organizmach.

Dotychczas poznano około 100 fosfataz białkowych, przy czym około 1/3 stanowią fosfatazy serynowo/treoninowe [2, 3]. Klasyfikacja fosfataz fosfoproteinowych oraz wymienione wyżej kryteria, zaproponowane przez Ingebritsen a i w s p. [4, 5], mimo upływu lat nie straciły swojej aktualności. Z wyjątkiem PP2B, pozostałe fosfatazy defosforylują dość dużą ilość substratów. W przeciwieństwie do kinaz białkowych, nie została wyodrębniona charakterystyczna sekwencja aminokwasowa, ulegająca specyficznej defosforylacji. W oparciu o dość dużą homologię sekwencji podjednostek katalitycznych czterech typów fosfataz uważa się, że wywodzą się one z tego samego drzewa genealogicznego [6]. Największą zbieżność sekwencji posiadają PP1 i PP2A, mniejszą PP2B, natomiast największe różnice obserwuje się dla typu PP2C. Z tego powodu PP2C często traktowana jest, jako niezależna rodzina enzymów. Dość ciekawą informacją uzyskaną w ostatnich latach, choć na razie nie dotyczącą tkanki nerwowej, było wykazanie, że dla obu głównych typów fosfataz, równie dobrym substratem jak fosfoseryna czy fosfotreonina, może być fosfohistydyna [7].

W ostatnich latach zidentyfikowano także kilka nowych, serynowo/treoninowych enzymów, nie spełniających klasycznych kryteriów opracowanych przez Ingebritsen a i w s p. Przykładem może być fosfataza PP3, aktywowana w obecności inhibitora 2 [8].

## II. Charakterystyka fosfataz fosfoproteinowych z tkanki nerwowej

### II-1. Fosfataza PP1

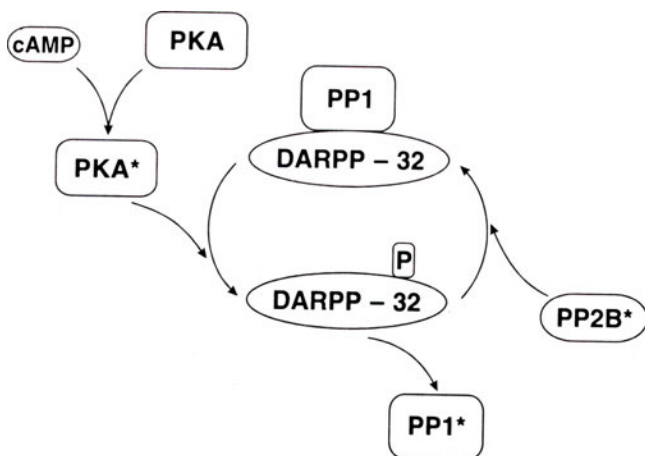
Fosfataza PP1 występuje głównie jako forma związana z błonami (ang. *particulate fraction*). W homogenatach mózgowych 50% aktywności fosfatazowej sedimentuje przy  $10.000 \times g$ , a do 70% przy  $100.000 \times g$  [6]. Obecność fosfatazy PP1 wykryto we frakcji określanej jako połączenia synaptyczne (ang. *synaptic junction*), którą uzyskiwano w procesie różnicowego ultrawierowania homogenatów z różnych obszarów mózgowia [9]. Frakcja ta zawiera błony synaptyczne, materiał obecny w szczelinach synaptycznych oraz tzw. gęstości postsynaptyczne. Z ostatnich badań wynika, że fosfataza PP1 występuje głównie w gęstościach postsynaptycznych, gdzie stwierdzono także duże ilości kinazy białkowej zależnej od  $Ca^{2+}$  i CaM [10]. Wykazano ponadto udział PP1 w procesie endogennej defosforylacji podjednostki  $\alpha$  CaM-kinazy II. Tak więc wcześniejsze obserwacje zostały rozszerzone o dokładniejszą lokalizację fosfatazy PP1, co pozwala na bardziej precyzyjną analizę procesów neurotransmisji. Z badań Cohena i w s p. [11]

wynika, że ponad 90% aktywności fosfatazowej typu I w ekstraktach z tkanki mózgowej, a także z wątroby i mięśni szkieletowych królika, ulegało zahamowaniu po 15 min. inkubacji w obecności  $0.1 \mu M$  stężenia inhibitora 1 oraz  $0.2 \mu M$  stężenia inhibitora 2.

Oprócz aktywnej formy PP1 w cytozolu komórek nerwowych stwierdzono także występowanie nieaktywnej fosfatazy białkowej, nazwanej PP 1-I [12]. Początkowo określana była jako fosfataza zależna od MgATP, gdyż do aktywacji niezbędny był ten kompleks, a także czynnik regulatorowy FA. Czynnik ten został zidentyfikowany jako zależna od cAMP i niezależna od  $Ca^{2+}$  kinaza białkowa [13]. W synaptosomach kory mózgowej Yang i w s p. [14] wykazali obecność w cytozolu nieaktywnej formy PP1, natomiast w błonach synaptosomalnych — nieaktywnego czynnika FA. Według autorów, aktywacja FA następuje poprzez uwolnienie go do synaptozolu, wskutek obniżenia procentowego udziału anionowych fosfolipidów błonowych, głównie fosfatydyloinozytolu (PI) oraz fosfatydyloseryny (PS). Nie wyklucza się możliwości, że te fosfolipidy wiążą się z domeną katalityczną czynnika FA, powodując jego dezaktywację. Za degradację PS i PI w błonie odpowiedzialna jest fosfolipaza C, dlatego też autorzy sugerują, że uruchomienie przez ten enzym dalszych etapów kaskady przemian fosfolipidowych, może stanowić skuteczny mechanizm kontrolujący transdukcję sygnałów w centralnym układzie nerwowym. Również badania Yanga i w s p. [15] wykazały, że czynnik FA jest potencjalną i unikatową kinazą białek MAP 2 i tau, regulującą funkcje mikrotubul mózgowych.

### II-1A. Regulacja aktywności PP1 przez DARPP-32

Cytosolowe białko DARPP-32 (ang. *dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein*), występujące głównie w tkance nerwowej jest specyficzną formą inhibitora 1, hamującego fosfatazę PP1 [16]. W porównaniu z inhibitorem 1, białko to zawiera dodatkowo 36 reszt aminokwasowych w karboksylowym końcu cząsteczki i składa się z 202 aminokwasów. Ciężar molekularny w żelu poliakryloamidowym z SDS oszacowano na 32 kDa, wyznaczony natomiast z sekwencji aminokwasowej wynosi 22.1 kDa. Forma aktywna inhibitora powstaje po ufosforylowaniu przez PKA pojedynczej reszty treoniny (Thr-34). (Ryc. 1). Specyficzna defosforylacja tego miejsca przez fosfatazę PP2B, zlokalizowaną w tych samych obszarach mózgowia co DARPP-32, powoduje zniesienie własności inhibitorowych i pośrednio aktywację fosfatazy PP1 [6]. DARPP-32 występuje przede wszystkim w neuronach posiadających receptory dopaminowe D-1 [17, 18]. W ekstraktach jąder ogoniastych wołu stanowi około 0.25% całkowitego białka. Jego obecność wykazano również w zwojach podstawy mózgu, splocie naczyniówkowym, prążkowiu, istocie szarej pnia mózgu, korze



**Ryc. 1.** Schemat regulacji fosfatazy PP1 przez DARPP-32. Białko DARPP-32 związane z fosfatazą PP1 utrzymuje enzym w formie nieaktywnej. Fosforylacja białka przez kinazę A powoduje jego odłączenie i tym samym uaktywnia fosfatazę. Defosforylację DARPP-32 do postaci łączącej się ponownie z PP1 przeprowadza kalcyneuryna (PP2B). Aktywne formy enzymów biorących udział w regulacji zaznaczono gwiazdką. PKA—kinaza białkowa zależna od cyklicznego AMP (cAMP), PP2B—fosfataza fosfobiałkowa typu 2, regulowana przez kalmodulinę. Pozostałe objaśnienia w tekście. Wg [27], [44], [47] zmodyfikowane.

mózgowej oraz — na niższym poziomie — w mózdku [19]. Stała inhibicji dla DARPP-32 wynosi  $\sim 1$  nM. W centralnym układzie nerwowym szczura, w przeciwieństwie do powszechnie występującego inhibitora 1, DARPP-32 w bardzo dużym stężeniu znajduje się przede wszystkim w zwojach podstawy mózgu. Z porównania stężenia obu białek w cyklu rozwojowym szczura wynika, że ich ekspresja zależna jest od wieku [19]. Ponieważ inhibitor 1 i DARPP-32 mają różną, choć nakładającą się lokalizację, może to sugerować, że ich funkcje nie są w pełni identyczne.

## II-2. Fosfataza fosfoproteinowa PP2A

Badania ostatnich lat pozwoliły na dokładniejszą charakterystykę tego enzymu. PP2A stanowi kompleks trzech podjednostek: katalitycznej C (36-38 kDa), podjednostki towarzyszącej A (60-65 kDa) (ang. *accessory*) i podjednostki regulatorowej B (54-74 kDa). Heterogenność PP2A, jak wykazano na podstawie analizy cDNA, wynika z obecności różnych podjednostek B (B-55 kDa, B'-54 kDa, B''-74 kDa) oraz wielu izoform podjednostek A i C [21]. Ostatnie prace sugerują, że podjednostka B reguluje aktywność katalityczną i specyficzność substratów kompleksu AC [22, 23]. Izofornie podjednostki katalitycznej C kodowane są przez co najmniej dwa geny. mRNA kodującego PP2A  $\alpha$  jest około 10 razy więcej, niż mRNA dla PP2A  $\beta$ , natomiast mRNA dla PP2A  $\alpha$  i PP2A  $\beta$ , jest dziesięciokrotnie więcej w mózgowiu i sercu, niż w innych tkankach [6, 21]. Obie izofornie charakteryzuje wysoki stopień homologii, osiągający 97% oraz niezależność od jonów dwuwartościowych. Badania D o b r o w s k y ' e g o i w s p. [24] wykazały natomiast, że ceramid, produkt metabolizmu sfingolipidów, może

być specyficznym aktywatorem fosfatazy PP2A z mózgowia szczura. Wzrost aktywności enzymu obserwowano w błonach synaptosomalnych inkubowanych w obecności polikationów takich, jak histon H1 i spermina. Sperminie, obecnej w komórce w dość dużym stężeniu ( $\sim 1$  mM), przypisuje się rolę modulatora komórkowej aktywności fosfatazowej [25]. Warto podkreślić, że aktywność PP1 zwykle jest przez te związki hamowana.

PP2A występuje w synaptosomach zarówno jako forma cytozolowa, jak i związana z błonami. Z szeregu badań przeprowadzonych na błonach kory mózgowia wynika, że aktywność PP2A stanowi 15-20% całkowitej aktywności fosfatazowej obecnej w tej frakcji, choć generalnie jest niższa, niż fosfatazy PP1. Stosunek aktywności fosfatazy PP1 do PP2A w błonach synaptosomalnych jest średnio 10 razy większy, niż obserwowany dla synaptozolu [9]. Takie zagęszczenie fosfataz wskazuje na istotny udział tych enzymów w regulacji stanu ufosforylowania białek w zakończeniach nerwowych.

## II-3. Fosfataza fosfoproteinowa PP2B

Spośród wszystkich fosfataz, PP2B zwana także kalcyneuryną, wydaje się być najlepiej zbadanym enzymem w tkance nerwowej. Kalcyneuryna wyizolowana z ekstraktów mózgowych jest heterodimerem, składającym się z podjednostki katalitycznej kalcyneuryny A (61 kDa) oraz podjednostki regulatorowej — kalcyneuryny B (19 kDa), podobnej do kalmoduliny (CaM) i zawierającej 4 miejsca wiążące  $\text{Ca}^{2+}$  [21, 26]. Identyczność sekwencji aminokwasowej między CaM i kalcyneuryną B wynosi  $\sim 35\%$  [6]. W obecności fizjologicznego stężenia wapnia, kalmodulina także aktywuje PP2B, tworząc stechiometryczny kompleks 1:1, ze stałą powinowactwa  $K_a = 0.1$  nM [27]. Choć PP2B stanowi około 1% całkowitego białka w ekstraktach mózgowia, to posiada aktywność porównywalną z enzymem mięśni szkieletowych, gdzie jego ilość szacuje się na około 0.3% białka. Sugeruje to, że aktywność specyficzna enzymu w mózgowiu może być niższa.

Kalcyneuryna A występująca w tkance nerwowej różnych ssaków wykazuje immunologiczną heterogenność i obecna jest w postaci przynajmniej trzech izoform [28]. Dwie z nich — kalcyneuryna A  $\alpha$  i A  $\beta$  — są produktami dwóch różnych genów. U człowieka i wołu występuje natomiast forma  $\beta$  II, różniąca się sekwencją w N- i C-terminalnych fragmentach cząsteczki.

Funkcjonalne domeny podjednostki katalitycznej wykazują dość konserwatywny charakter. W N-końcowej części występuje domena regulatorowa, posiadająca subdomeny wiążące CaM i kalcyneurynę B oraz subdomenę autoinhibitorową. W C-terminalnej części podjednostki A występuje miejsce, które *in vitro* ulega fosforylacji przy udziale PKC i CaM-kinazy II



[29]. Proces ten zwiększa  $K_m$  dla substratów. W reakcji defosforylacji kalcyneuryny fosfataza PP2A była zdecydowanie bardziej skuteczna niż PP1. Ponieważ w oczyszczonej kalcyneurynie znajduje się około 0.6 równoważników endogennego fosforanu na 1 mol podjednostki A [29], powyższe obserwacje mogą sugerować, że *in vivo* procesy odwracalnej fosforylacji stanowią rzeczywisty mechanizm regulacji aktywności PP2B.

Kalcyneuryna B i CaM pełnią różną rolę w mechanizmie aktywacji PP2B przez jony wapnia. Wapń związany z CaM wymusza przemieszczenie subdomeny autoinhibitorowej i zwiększa  $V_{max}$ , zaś związany z kalcyneuryną B, zwiększa powinowactwo fosfatazy do substratu [30]. Sekwencje aminokwasowe kalcyneuryny B oraz domeny wiążącej ją w kalcyneurynie A są jedynymi z bardziej konserwatywnych obszarów w PP2B.

W N-terminalnej części kalcyneuryny B mózgowia wołu występuje mirystylowana glicyna, ułatwiająca łączenie się enzymu z błonami [6]. Zaproponowano dość interesującą hipotezę, przypisującą kalcyneurynie B rolę regulatora w oddziaływaniach z fosfolipidami [31]. Proces zachodzący dwustopniowo w pierwszym etapie powodowałby wiązanie natywnej kalcyneuryny z fosfolipidami w sposób zależny od wapnia, w drugim zaś, konformacyjna zmiana podjednostki B, specyficzna wobec substratu, zmieniałyby aktywność enzymu.

Fosfataza PP2B znajduje się przede wszystkim w neuronach, choć w różnym stężeniu, w zależności od subpopulacji poszczególnych neuronów. Wewnątrz komórki, w perikarionie, dendrytach, aksonach i zakończeniach aksonów, występuje w porównywalnych ilościach. Generalnie zaś tkanka mózgowa zawiera 10 do 20 razy więcej PP2B niż inne tkanki. Wysoki poziom obserwuje się w prądkowiu, jądrze ogoniasym, gałce błodej, oraz istocie szarej pnia mózgu, umiarkowana ilość znajduje się w warstwach korowych. Dość obficie natomiast kalcyneuryna występuje w zakończeniach nerwowych wzgórza. W hipokampie najwięcej PP2B jest w komórkach piramidalnych regionu CA1-CA2 oraz w komórkach granularnych zakrętu zębatego. W mózdzku najintensywniej występuje w warstwie molekularnej, a w mniejszym stężeniu w cytoplazmie komórek Purkiniego [28].

#### II-4. Fosfataza fosfoproteinowa PP2C

Ten enzym jest najmniej poznana fosfatazą serynowo/treoninową. Występuje jako monomer o ciężarze molekularnym 43 kDa i do pełnej aktywacji wymaga jonów  $Mg^{2+}$  [6]. Maksymalną aktywność w warunkach *in vitro* osiąga przy 2 mM  $Mg^{2+}$ . Dotychczas zidentyfikowano dwie izoformy tego enzymu — PP2C  $\alpha$  i PP2C  $\beta$  [3]. Sekwencja aminokwasowa PP2C wykazuje brak homologii z podjednostkami katalitycznymi innych typów fosfataz, jak również brak jest typowej domeny katalitycznej. W mózgowiu królika

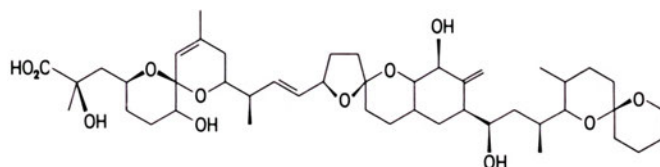
PP2C posiada wyższą aktywność niż w mięśniach szkieletowych, co może sugerować jej specyficzną rolę w układzie nerwowym [5].

#### II-5. Fosfataza fosfoproteinowa PP3

Przykładem serynowo/treoninowej fosfatazy białkowej, wykraczającej nieco poza klasyczne kryteria Ingebritsena jest enzym wyizolowany z mózgu wołu, nazwany PP3 [8]. Białko o ciężarze molekularnym 36 kDa nie wymagało do swej aktywności dwuwartościowych kationów. Zarówno kwas okadejowy jak i mikrocytin — LR hamowały PP3 w sposób analogiczny do omówionych wyżej typów fosfataz. Interesującym spostrzeżeniem był fakt nietypowego, bo aktywującego działania inhibitora 2. Podjednostka  $\beta$  kinazy fosforylazowej była natomiast specyficznie defosforylowana przez ten enzym. Charakterystyka przy użyciu specyficznych przeciwciał, sekwencja aminokwasowa oraz badanie specyficzności substratowej, wykluczyły możliwość, że PP3 jest izoformą innych, poznanych dotychczas fosfataz serynowo/treoninowych.

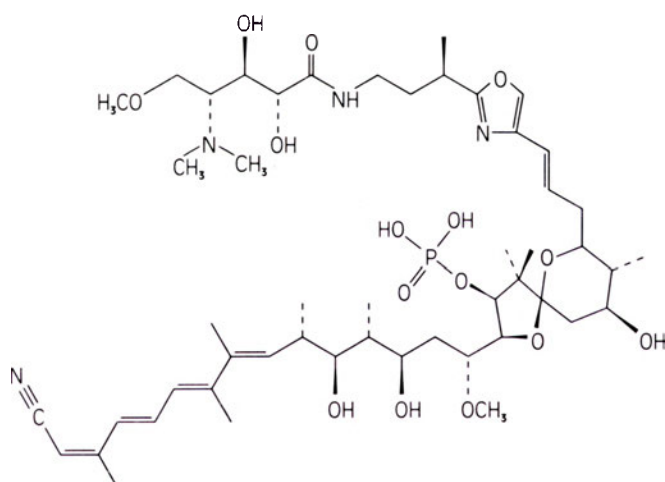
#### II-6. Inhibitory fosfataz fosfoproteinowych

Oprócz naturalnych białek — inhibitorów 1 i 2 oraz DARPP-32 — regulujących aktywność fosfatazy fosfobiałkowej PP1, dodatkowym, wyjątkowo użytecznym narzędziem w identyfikacji poszczególnych typów fosfataz okazał się kwas okadejowy (OA). Jest to polieterowy kwas tłuszczowy wyizolowany z gąbki *Halichondria okadaei* (Ryc. 2). Sposób jego działania polega na hamowaniu aktywności PP1 oraz PP2A [32]. Z dotychczasowych badań wynika, że kwas okadejowy nie wiąże się z centrum katalitycznym fosfataz, a łączy się prawdopodobnie z C-terminalną domeną cząsteczki obu enzymów. Jako związek hydrofobowy łatwo przechodzi przez błony komórkowe, jednak molekularny mechanizm inhibicji pozostaje niewyjaśniony. Aktywność PP2A ulega całkowitemu zahamowaniu już przy 1 nM stężeniu kwasu okadejowego.  $IC_{50}$  dla PP1 wynosi 10-15 nM, zaś przy 1  $\mu M$  OA obserwuje się całkowity brak aktywności fosfatazy [33]. Interesującą informacją jest spostrzeżenie, że inhibitor 2 oraz kwas okadejowy działają addytywnie [11]. Wewnątrzkomórkowe stężenie PP1 i PP2A mieści się w zakresie 0.1-1.0  $\mu M$ , dlatego w badaniach *in vitro* stosowane są często wyższe stężenia kwasu okadejowego [34]. Przy stężeniu nie przekraczającym 5  $\mu M$  OA, fosfataza PP2B wykazuje brak wrażliwości



Ryc. 2. Wzór kwasu okadejowego.

na ten inhibitor [35]. W ocenie aktywności fosfatazy PP2C często wykorzystywany jest fakt całkowitej oporności tego enzymu na kwas okadejowy [33]. W podobnym celu używana jest też kalikulina A (Ryc. 3), toksyna izolowana z gąbki *Discodermia calyx*, specyficznie blokująca aktywności fosfataz PPI i PP2 [36]. Mimo odmiennej struktury, efekt hamowania aktywności PP2A jest analogiczny, natomiast w przypadku PPI skuteczność kalikuliny jest nawet 100-krotnie większa. PPI i PP2A skutecznie hamowane są także przez nodularin, cykliczny pentapeptyd syntetyzowany przez glony [37]. Dość precyzyjnie pozwala różnicować fosfatazy trifluoperazyna, antagonistą kalmoduliny, stanowiącej naturalny aktywator fosfatazy PP2B [38]. Ostatnio często stosowane są podczas badania aktywności kalcyneuryny leki immunosupresyjne takie, jak cyklosporyna A i FK-506, będące wysoce specyficznymi inhibitorami tego enzymu [39, 40]. Należy dodać, że omówione przykłady inhibitorów fosfataz białkowych stanowią użyteczne narzędzie nie tylko w badaniu układu nerwowego, ale powszechnie są stosowane do hamowania aktywności fosfatazowych w innych tkankach i organizmach.



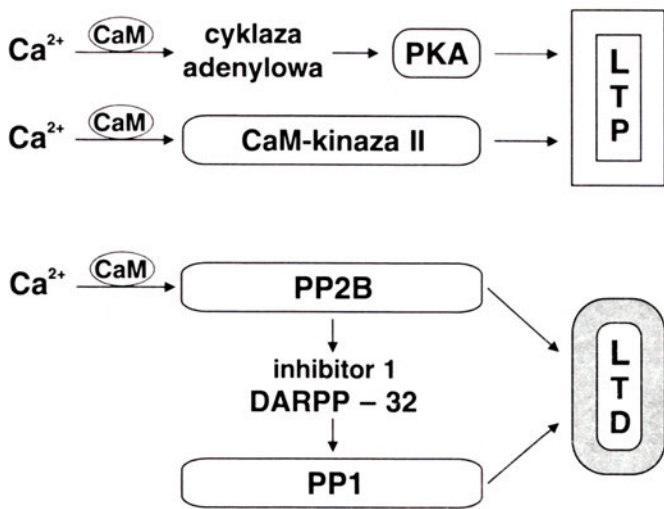
Ryc. 3. Wzór kalikuliny A.

### III. Defosforylacja białek w procesach neuronalnych

Zewnątrzkomórkowe sygnały wywołują szereg molekularnych wydarzeń poprzez regulację stanu ufosforylowania mniej lub bardziej wyspecjalizowanych białek w układzie nerwowym. W świetle dostępnej wiedzy trudno jest wyjaśnić wszystkie mechanizmy i etapy prowadzące do powstania końcowej odpowiedzi komórki nerwowej, lecz część procesów należy w tej chwili do nieco bardziej poznanych. Badania H a a v i k a i w s p. [41] wykazały wpływ fosfatazy PP2A na aktywność kluczowego enzymu w procesie biosyntezy katecholamin — hydroksylazy tyrozynowej, ulegającej *in vitro* fosforylacji przez kinazę A, CaM-kinazę II oraz PKC. Fosfatazy PPI i PP2A defosforylują także neuromodulinę (B-50, GAP-43, F-1) [42]. Białko to spełnia wielorakie funkcje w komórce, począwszy od

regulacji aktywności kinazy fosfatydyloinozytolo-4-fosforanu, uwalnianiu noradrenaliny, aż do udziału w procesie LTP (ang. *long term potentiation*), synaptycznym mechanizmie odgrywającym rolę w procesie uczenia się i pamięci [43].

Proces długotrwałego osłabienia synaptycznego (LTD, ang. *long term depression*) wiązany jest natomiast ze skutecznością przechowywania informacji. Zjawisko to obserwowano w hipokampie, korze mózgowej i mózdzku, choć najbardziej dotychczas poznany przebieg tego procesu opisano dla komórek Purkiniego [44, 45]. Kilka form LTD-homosynaptyczna, heterosynaptyczna czy tzw. typ niewrażliwy na D-APV, wyróżniono w komórkach piramidalnych C1 hipokampa. Na podstawie badań przeprowadzonych na tym regionie M u l k e y i w s p. [46] zaproponowali dość oryginalną koncepcję, według której za wystąpienie LTD odpowiedzialne są głównie fosfatazy białkowe, natomiast kinazy białkowe indukują LTP. Oba procesy mogą stanowić odwracalną modyfikację jednego zjawiska. Krytyczne dla ich przebiegu jest zarówno stężenie, jak i równowaga między kinazami i fosfatazami występującymi w zakończeniach postsynaptycznych oraz obecność kalmoduliny, stymulatora zarówno PP2B jak i CaM-kinazy II. Potencjalnym substratem dla tych oddziaływań może być także receptor glutaminianowy (GluRI). Jedną z form LTD występującą w hipokampie wymaga aktywacji postsynaptycznych receptorów NMDA, zmiany postsynaptycznego stężenia jonów  $Ca^{2+}$  oraz aktywacji fosfataz [27]. Proponowany model zakłada, że po przedłużonej stymulacji niską częstotliwością (1 Hz), wejście wapnia poprzez kanały związane z receptorami NMDA powoduje powstanie kompleksu  $Ca^{2+}/CaM$  (Ryc. 4). Kompleks aktywuje kalcyneurynę, ta zaś defosforyluje inhibitor I reaktywując fosfatazę PPI. Fosfataza PPI, posiadająca szeroki zakres substratów (kinazy białkowe, podjednostki receptorów niezależnych od NMDA, czy fosfobiałka, odpowiedzialne za wytworzenie przypuszczalnych retrogradowych przekazywaczy) uruchamia LTD. Model ten posiada dużo cech prawdopodobieństwa m.in. ze względu na fakt, że kalcyneuryna wykazuje zdecydowanie wyższe powinowactwo do kompleksu  $Ca^{2+}/CaM$  (stała dysocjacji  $K_d = 0.1$  nM), niż CaM-kinaza II ( $K_d = 45$  nM), której przypisuje się główną rolę w wytwarzaniu LTP [27, 47]. Kalcyneuryna może więc być bardzo istotnym elementem kontrolującym bądź różnicującym sekwencję wydarzeń, prowadzących do LTP i/lub LTD. Tę koncepcję potwierdzają wyniki uzyskane przez L i e b e r m a n a i M o d y ' e g o [40]. PP2B aktywowana jonami wapnia wchodzącymi poprzez kanały NMDA skracała czas ich otwarcia, natomiast efekt ten był znoszony w obecności specyficznego inhibitora kalcyneuryny — FK 506. Niezależne badania przeprowadzono na kulturze neuronów hipokampa z zastosowaniem innego inhibitora PP2B — kalikuliny A, a także kwasu okadejowego. Wyniki pozwoliły na stwierdze-



Ryc. 4. Schemat indukcji LTP i LTD.

W warunkach stymulacji wysoką częstotliwością (50 Hz), poprzez kanały związane z receptorami NMDA następuje wejście do komórki dużej ilości jonów wapniowych. Wysokie stężenie powstającego kompleksu  $Ca^{2+}/CaM$  preferencyjnie stymuluje cyklazę adenylową, odpowiedzialną za powstanie cyklicznego AMP. cAMP powoduje w konsekwencji aktywację kinazy białkowej A. Istotnym i bezpośrednim efektem dla kompleksu  $Ca^{2+}/CaM$  jest także CaM-kinaza II. Na skutek fosforylacji — przeprowadzonej przez obydwie kinazy — wielu specyficznych substratów, wytwarzane jest długotrwałe wzmocnienie postsynaptyczne (LTP). Niewielki wzrost wewnątrzkomórkowego  $Ca^{2+}$  zachodzi również poprzez kanały związane z receptorami NMDA, po stymulacji niską częstotliwością (1 Hz). Powstający kompleks  $Ca^{2+}/CaM$  w tych warunkach preferencyjnie stymuluje fosfatazę PP2B. Zaktywowany enzym defosforyluje inhibitor 1 i/lub białko DARPP-32, a tym samym powoduje uaktywnienie fosfatazy PP1. Aktywne formy fosfataz defosforylują szereg substratów, prowadząc w efekcie do wytworzenia zjawiska długotrwałego osłabienia synaptycznego (LTD). Pozostałe objaśnienia w tekście. Wg [27], [44] i [47] zmodyfikowane.

nie, że fosfatazy PP1 i PP2A zmniejszają aktywność kanałów typu NMDA, fosforylowanych przez serynowo/treoninowe kinazy białkowe [48]. W korze wzrokowej wykazano udział fosfataz PP1 i PP2A w wytwarzaniu homosynaptycznego LTD [49]. Obie fosfatazy nie wpływały natomiast na indukcję LTP.

Kalcyneuryna w układzie nerwowym uczestniczy także w procesie wzrostu komórek nerwowych. W kulturze neuronów mózdzku szczura w obecności inhibitora PP2B — cyklosporyny A, następowało zahamowanie wydłużenia aksonów [39]. Wysoki poziom kalcyneuryny w mózgu wskazuje, że prawdopodobnie znajduje się tam wiele substratów dla tego enzymu. Z dotychczas poznanych, oprócz kanałów NMDA, białka MAP-2, białka KF o nieznanym jeszcze funkcji, występuje też tzw. G-substrat, obecny w komórkach Purkiniego i specyficznie fosforylowany przez kinazę zależną od cGMP [6]. Dość dużą grupę stanowią białka regulujące aktywność kinaz i fosfataz. Należą do nich wspomniane już wcześniej inhibitor 1 i DARPP-32, a także podjednostka RII kinazy A [28]. Przeprowadzana *in vitro* przez PP2B defosforylacja zależnej od CaM fosfodiesterazy cAMP aktywuje enzym, ułatwiając degradację cAMP. W hipok-

kampie wysokie stężenie kalcyneuryny oraz CaM-kinazy II dają podstawę do sugestii, że oba enzymy kontrolują procesy wywołane przez neurohormony i neurotransmitery zachodzące przy udziale wapnia [47]. Wysoce prawdopodobne jest istnienie mechanizmu kaskadowego w którym wapń, jako bezpośredni czynnik, aktywuje kalcyneurynę. PP2B poprzez defosforylację dość wąskiej grupy substratów aktywuje (bądź unieczynnia) zarówno kinazy białkowe, jak i inne fosfatazy, wykazujące aktywność wobec szerszej grupy substratów. W komórkach pobudliwych kolejne zjawiska depolaryzacji i repolaryzacji wyrażane są następującymi kolejno po sobie procesami fosforylacji i defosforylacji. Kalcyneuryna, z największą spośród fosfataz specyficznością substratową, moduluje procesy wywołane przy udziale  $Ca^{2+}$  i cAMP zwłaszcza wtedy, gdy te przekaźniki regulują zjawiska antagonistyczne.

W asymetrycznym wzroście neuronów ważną funkcję spełnia białko tau, którego stopień ufosforylowania determinuje prawidłowość tego procesu [50]. W chorobie Alzheimera zaobserwowano natomiast jego hiperfosforylację [51]. Gong i wsp. [52] wykazali, że fizjologiczne białko tau defosforylowane jest przez fosfatazy PP1 i PP2C, natomiast tylko PP1 była aktywna wobec formy występującej w chorobie Alzheimera.

Mimo wielu posiadanych już informacji, udział serynowo/treoninowych fosfataz w defosforylacji szeregu białek istotnych dla prawidłowego funkcjonowania komórek nerwowych, a zwłaszcza określenie fizjologicznego bądź patologicznego znaczenia tych procesów, pozostaje jeszcze do wyjaśnienia.

#### Podziękowanie

Praca dofinansowana w ramach grantu KBN 4PO5A00209 (L.L.) oraz tematu własnego 502-11-260 (L.Ż.).

Artykuł otrzymano 10 kwietnia 1995 r.  
Zaakceptowano do druku 6 września 1995 r.

#### Piśmiennictwo

1. Paleń E (1989) *Post Biochem* 35: 363-369
2. Pinna LA, Donella-Deana A (1994) *Biochem Biophys Acta* 1222: 415-431
3. Walter G, Mumby M (1993) *Biochem Biophys Acta* 1155: 207-226
4. Ingebritsen TS, Cohen P (1983) *Science* 221: 331-338
5. Ingebritsen TS, Stewart AA, Cohen P (1983) *Eur J Biochem* 132: 297-307
6. Cohen P (1989) *Annu Rev Biochem* 58: 453-508
7. Kim Y, Huang J, Cohen P, Matthews HR (1993) *J Biol Chem* 268: 18513-18518
8. Honkanen RE, Zwiler J, Daily SL, Khatra BS, Dukelow M, Boynton AL (1991) *J Biol Chem* 266: 6614-6619
9. Shields SM, Ingebritsen TS, Kelly PT (1985) *J Neurosci* 5: 3414-3422
10. Dosemeci A, Reese TS (1993) *J Neurochem* 61: 550-555
11. Cohen P, Klumpp S, Schelling DL (1989) *FEBS Lett* 250: 596-600

12. Hemmings BA, Yellowlees D, Kernohan JC, Cohen P (1981) *Eur J Biochem* **119**: 443-451
13. Yang S-D, Fong Y-L (1985) *J Biol Chem* **260**: 13464-13470
14. Yang S-D, Yu J-S, Fong Y-L, Liu J-S (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **182**: 129-136
15. Yang S-D, Yu J-S, Fong Y-L, Lai Y-G (1991) *J Prot Chem* **10**: 171-181
16. Walaas SI, Aswad DW, Greengard P (1983) *Nature (Lond)* **301**: 69-71
17. Walaas SI, Greengard P (1984) *J Neurosci* **4**: 84-98
18. Berger B, Febvret A, Greengard P, Goldman-Rakic PS (1990) *J Comp Neurol* **299**: 327-348
19. Nairn AC, Hemmings HC, Walaas SI, Greengard P (1988) *J Neurochem* **50**: 257-262
20. Hemmings HC, Girault JA, Nairn AC, Bertuzzi G, Greengard P (1992) *J Neurochem* **59**: 1053-1062
21. Cohen P, Cohen PTW (1989) *J Biol Chem* **264**: 21435-21438
22. Imaoka T, Imazu M, Usui H, Kinohara N, Takeda M (1983) *J Biol Chem* **258**: 1526-1535
23. Kamibayashi C, Estes R, Slaughter C, Mumby MC (1991) *J Biol Chem* **266**: 13251-13260
24. Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MC, Hannun YA (1993) *J Biol Chem* **268**: 15523-15530
25. Han Y-F, Wang W, Schlender KK, Ganjeizadeh M, Dokas LA (1992) *J Neurochem* **59**: 364-374
26. Stewart AA, Ingebritsen TS, Manalan A, Klee CB, Cohen P (1982) *FEBS Lett* **137**: 80-84
27. Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC (1994) *Nature (Lond)* **369**: 486-488
28. Klee CB, Guerini D, Krinks MH, De Camilli P, Solimena M (1990) W: A. Guidotti (red) *Neurotoxicity of Excitatory Amino Acids*, Raven Press, Ltd, New York, str 95-108
29. Hashimoto Y, Soderling TR (1989) *J Biol Chem* **264**: 16524-16529
30. Stemmer PM, Klee CB (1994) *Biochemistry* **33**: 6859-6866
31. Politino M, King MM (1990) *J Biol Chem* **265**: 7619-7622
32. Bialojan C, Takai A (1988) *Biochem J* **256**: 283-290
33. Haystead TAJ, Sim ATR, Carling D, Honnor RC, Tsukitani Y, Cohen P, Hardie DG (1989) *Nature (Lond)* **337**: 78-81
34. Cohen P, Holmes CFB, Tsukitani Y (1990) *TIBS* **15**: 98-102
35. Sim ATR, Dunkley PR, Jarvie PE, Rostas JAP (1991) *Neurosci Lett* **126**: 203-206
36. Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani N, Watabe S, Hashimoto K, Uemura D, Hartshorne DJ (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **159**: 871-877
37. Matsushima R, Yoshizawa S, Watanabe MF, Harada K, Furusawa M, Carmichael WW, Fujiki H (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **171**: 867-874
38. Ingebritsen TS, Foulkes JG, Cohen P (1983) *Eur J Biochem* **132**: 263-274
39. Ferreira A, Kincaid R, Kosik KS (1994) *Mol Biol Cell* **4**: 1225-1238
40. Lieberman DN, Mody I (1994) *Nature (Lond)* **369**: 235-239
41. Haavik J, Schelling DL, Campbell DG, Anderson KK, Flatmark T, Cohen P (1989) *FEBS Lett* **251**: 36-42
42. Lovinger DM, Colley PA, Akers RF, Nelson RB, Routtenberg A (1986) *Brain Res* **399**: 205-211
43. Sharkey KA, Coggins PJ, Tetzlaff W, Zwiers H, Bisby MA, Davison JS (1990) *Neurosci* **38**: 13-20
44. Malenka RC (1994) *Cell* **78**: 535-538
45. Ito M (1989) *Annu Rev Neurosci* **12**: 85-102
46. Mulkey RM, Herron CE, Malenka RC (1994) *Bio-med Res* **15**: 83-90
47. Klee CB (1991) *Neurochem Res* **16**: 1059-1065
48. Wang L-Y, Orser BA, Brautigan DL, MacDonald JF (1994) *Nature (Lond)* **369**: 230-232
49. Kirkwood A, Bear MF (1994) *J Neurosci* (1994) **14**: 3404-3412
50. Tucker RP (1990) *Brain Res Rev* **15**: 101-120
51. Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Gustke N, Meyer HE, Schmidt B, Mieskes G, Soling HD, Drechsel D, Kirschner MW, Goedert M, Mandelkow E (1990) *EMBO J* **9**: 3539-3544
52. Gong CX, Grundke-Iqbal I, Damuni Z, Iqbal K (1994) *FEBS Lett* **341**: 94-98

## Informacja Redakcji *Acta Biochimica Polonica*

Z satysfakcją informujemy Czytelników *Postępów Biochemii*, że od 1995 roku została przywrócona przez *Current Contents (ISI, U.S.A.)* indeksacja *Acta Biochimica Polonica*.

# Regulacja wewnątrzkomórkowego stężenia $\text{Ca}^{2+}$ w komórkach niebudliwych

## Regulation of intracellular $\text{Ca}^{2+}$ concentration in nonexcitable cells

BARBARA NIEWCZAS\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Wewnątrzkomórkowe magazyny wapniowe
- III. Procesy wychwytu i uwalniania  $\text{Ca}^{2+}$  z wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych
  - III-1. Procesy wychwytu  $\text{Ca}^{2+}$
  - III-2. Procesy uwalniania  $\text{Ca}^{2+}$  ze struktur subkomórkowych szybko wymieniających  $\text{Ca}^{2+}$ 
    - III-2.1. Kanaly zaangażowane w procesie uwalniania  $\text{Ca}^{2+}$
    - III-2.2. Inne czynniki uwalnijające  $\text{Ca}^{2+}$
  - III-3. Procesy uwalniania  $\text{Ca}^{2+}$  ze struktur subkomórkowych wolno wymieniających  $\text{Ca}^{2+}$
- IV. Kontrola napływu  $\text{Ca}^{2+}$ 
  - IV-1. Mechanizmy napływu  $\text{Ca}^{2+}$  zależnego od stopnia opróżnienia wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych
  - IV-2. Charakterystyka pojemnościowego napływu  $\text{Ca}^{2+}$  i  $I_{\text{KWUM}}$
  - IV-3. Czynniki uczestniczące w procesie pojemnościowego napływu  $\text{Ca}^{2+}$ 
    - IV-3.1. Cytochrom P450
    - IV-3.2. Czynniki indukujący napływ  $\text{Ca}^{2+}$
    - IV-3.3. Małe białko G
  - IV-4. Regulacja napływu  $\text{Ca}^{2+}$  przez fosforylację/defosforylację
- V. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Intracellular calcium stores
- III. Calcium uptake and release from intracellular calcium stores
  - III-1. Calcium uptake
  - III-2. Calcium release from rapidly exchanging calcium subcellular structures
    - III-2.1. Channels involved in calcium release
    - III-2.2. Other factors of calcium release
  - III-3. Calcium release from slowly exchanging calcium subcellular structures
- IV. Control of calcium influx
  - IV-1. Mechanisms of store-operated calcium influx
  - IV-2. Characteristic of capacitative calcium influx and  $I_{\text{CRAC}}$
  - IV-3. Factors engaged in capacitative calcium influx
    - IV-3.1. Cytochrome P450
    - IV-3.2. Calcium influx factor
    - IV-3.3. Small protein G
  - IV-4. Regulation of calcium influx by phosphorylation/dephosphorylation
- V. Conclusions

**Wykaz stosowanych skrótów:**  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  — stężenie wolnych  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie;  $I_{\text{KWUM}}$  — przepływ ładunków dodatnich przez kanał wapniowy aktywowany po uwolnieniu  $\text{Ca}^{2+}$  z wewnątrzkomórkowych magazynów; KWUM — kanał wapniowy w błonie plazmatycznej aktywowany przez uwolnienie  $\text{Ca}^{2+}$  z wewnątrzkomórkowych magazynów;  $I_{\text{crac}}\text{-Ca}^{2+}$  — release activated  $\text{Ca}^{2+}$  current; TG — tapsigargina; tBuBHQ — 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydrochinon; SŚ — siateczka śródplazmatyczna; BAPTA — kwas 1,2-bis-(2-aminofenoksy) etano-N,N,N',N'-tetraoctowy;  $\text{IP}_3$ -trisfosfoinozytol;  $\text{IP}_4$  — tetrafosfoinozytol; CNW — czynnik indukujący napływ  $\text{Ca}^{2+}$ ; GTP — guanozynotrójfosforan; GTP ( $\gamma$ ) S-guanozyno-5',3-O-(tris) — trójfosforan; cGMP — 3',5'-cykliczny guanozynomonofosforan; CICR — calcium induced calcium release, czyli proces uwalniania  $\text{Ca}^{2+}$  z wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych (zawierających w swojej błonie receptory rianodino) aktywowany przez sam  $\text{Ca}^{2+}$ .

## I. Wstęp

Kontrola stężenia wolnych  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie,  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , ma zasadnicze znaczenie dla funkcjonowania komórki. Zwykle w komórce niebudzonej  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  nie przekracza  $10^{-7}$  M. Tak niskie stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  jest charakterystyczne dla stanu spoczynkowego komórki. W środowisku zewnątrzkomórkowym stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  jest 10 000-razy wyższe. Wiele czynników swoim działaniem doprowadza do podwyższenia  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Zaliczamy do nich zarówno bodźce natury fizycznej (światło, pole grawitacyjne itd.), jak i chemicznej (hormony, czynniki wzrostu). Komórka o wyższym stężeniu  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie niż to, które występuje w niej w stanie spoczynkowym określana jest mianem komórki zaktywowanej. Aktywacji komórki niebudliwej towarzyszą zmiany w jej metabolizmie (np. aktywacja glikolizy w komórce wątrobowej), przepuszczalności błon, kształcie, a także wydzielaniu substancji magazynowanych w pęcherzykach wydzielniczych (np. uwal-

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

nianie insuliny z komórek  $\beta$  trzustki). Tak więc procesy uczestniczące w kontroli stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie regulują przejście komórki ze stanu spoczynkowego w aktywny i odwrotnie. Utrzymanie właściwego poziomu  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  jest możliwe dzięki działaniu mechanizmów kontrolujących błonowy transport  $\text{Ca}^{2+}$ : kanałów, pomp wapniowych, wymiennicy jonowych, jak również związków i organelli buforujących i wiążących ten kation. Kanały, pompy, wymiennicze jonowe zaangażowane w transporcie  $\text{Ca}^{2+}$  występują zarówno w błonie plazmatycznej, jak i w błonach wielu struktur subkomórkowych. Niektóre z tych struktur uważa się za magazyny  $\text{Ca}^{2+}$ .

## II. Wewnątrzkomórkowe magazyny wapniowe

Lokalizacja magazynów wapniowych w komórkach niepobudliwych nie jest do końca wyjaśniona.  $\text{Ca}^{2+}$  są wychwytywane przez takie struktury i organelle komórkowe jak: siateczka śródplazmatyczna, kompleks Golgiego, pęcherzyki i granule wydzielnicze, endosomy, lizosomy, mitochondria, a także jądro [5-10].

Omawiane magazyny pod względem pełnionych przez nie funkcji, jak i tempa wymiany  $\text{Ca}^{2+}$  pomiędzy kompartmentami komórkowymi są strukturami heterogennymi. Można wyróżnić wśród nich ultrastruktury szybko i wolno wymieniające  $\text{Ca}^{2+}$ . Szybko mobilizujące zmagazynowane  $\text{Ca}^{2+}$  są zdolne do spowodowania wzrostu  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  w czasie rzędu sekundy. Wolno mobilizujące do uwolnienia  $\text{Ca}^{2+}$  potrzebują minut, a nawet godzin [11].

Przestrzenie szybko wymieniające  $\text{Ca}^{2+}$  występują wyłącznie w siateczce śródplazmatycznej. Wyróżnia się w nich subkompartymenty wrażliwe na  $\text{IP}_3$  oraz wrażliwe na rianodinę. Jednak na pytanie — jaki jest związek funkcjonalno-strukturalny pomiędzy nimi nadal nie znamy odpowiedzi [11].

Stwierdzono, że  $\text{IP}_3$  i kofeina uwalniają tylko 30-40% całkowitej ilości  $\text{Ca}^{2+}$  zmagazynowanych w wewnętrznych przestrzeniach komórkowych [12]. Pozostałą część stanowią organelle i struktury wolno wymieniające  $\text{Ca}^{2+}$ . Dawniej uważano, że jedyną ich lokalizacją są mitochondria. Stwierdzono jednak, że ilość  $\text{Ca}^{2+}$  uwolniona przez rozpręgacze (związki niwelujące elektrochemiczny gradient występujący w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej) nie odpowiada oczekiwanej różnicy (60-70% całkowitej ilości  $\text{Ca}^{2+}$  zmagazynowanych w wewnętrznych przestrzeniach komórkowych) [11]. Ultrastruktury wolno wymieniające  $\text{Ca}^{2+}$  lokalizuje się obecnie także w kompleksie Golgiego, w tej części siateczki śródplazmatycznej, która nie zawiera receptorów  $\text{IP}_3$  i rianodiny, w pęcherzykach wydzielniczych, endosomach i lizosomach.

## III. Procesy wychwyty i uwalniania $\text{Ca}^{2+}$ z wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych

### III-1. Proces wychwyty $\text{Ca}^{2+}$

W czasie gromadzenia  $\text{Ca}^{2+}$  w wewnątrzkomórkowych strukturach magazynujących pokonywany jest duży gradient chemiczny. W przypadku siateczki śródplazmatycznej potrzebna energia jest czerpana z hydrolizy ATP, reakcji katalizowanej przez Ca-ATP-azy [14]. W mitochondriach siłą napędową jest potencjał błonowy wytwarzany przez łańcuch oddechowy [13], natomiast w strukturach subkomórkowych o kwaśnym odczynie światła (lizosomach, cysterbach trans Golgiego, granulach wydzielniczych, endosomach) jest nią elektroneutralna wymiana przebiegająca z udziałem antyporterów  $\text{H}^+ - \text{Ca}^{2+}$  (antyporter — jest to białko nośnikowe, wbudowane w dwuwarstwą lipidową błony, które umożliwia transportowanie przez błonę jednej substancji przy jednoczesnym transporcie innej w kierunku przeciwnym) [11].

### III-2. Procesy uwalniania $\text{Ca}^{2+}$ ze struktur subkomórkowych szybko wymieniających $\text{Ca}^{2+}$

#### III-2.1. Kanały zaangażowane w procesie uwalniania $\text{Ca}^{2+}$

Wyróżnia się dwie główne klasy kanałów zaangażowanych w procesie uwalniania  $\text{Ca}^{2+}$  z ultrastruktur szybko wymieniających  $\text{Ca}^{2+}$ . Pierwszy regulowany jest przez wtórny przekaźnik —  $\text{IP}_3$ . Drugi, natomiast jest aktywowany przez rianodinę [15-17].

Kanały te odznaczają się dużym podobieństwem pod względem budowy i pełnionych przez nie funkcji. Otoczone są one czterema polipeptydowymi podjednostkami należącymi do białek receptorowych (odpowiednio do receptora  $\text{IP}_3$  i rianodiny) [18-20].

Kanały receptora stymulowanego przez  $\text{IP}_3$  obecne są w prawie wszystkich komórkach. Oprócz wewnątrzkomórkowych magazynów  $\text{Ca}^{2+}$  receptor  $\text{IP}_3$  o nieco innej strukturze, zlokalizowano także w błonie plazmatycznej [21]. Do aktywacji kanału wapniowego czulego na  $\text{IP}_3$  dochodzi po związaniu  $\text{IP}_3$ . Zwiększa się wówczas prawdopodobieństwo jego otwarcia.

Do niedawna uważano, że receptory rianodiny są zaangażowane głównie w procesie uwalniania  $\text{Ca}^{2+}$  z siateczki sarkoplazmatycznej mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego. Obecnie pojawia się coraz więcej doniesień, że kanały rianodiny są również obecne w komórkach niepobudliwych [22-24]. Wyróżnia się trzy różne podtypy receptora rianodiny:

- $R_{R1}$  — charakterystyczny dla mięśni szkieletowych,
- $R_{R2}$  — charakterystyczny dla mięśnia sercowego i
- $R_{R3}$  — zidentyfikowany w mózgu i innych tkankach [25, 26].

W przeciwieństwie do receptorów rianodiny dwu pierwszych podtypów (informacje dotyczące tego zagadnienia znajdzie czytelnik w *Post Biochem* [27]), o nowo odkrytym receptorze rianodiny typu 3, jak na razie, bardzo mało wiadomo. Jest wrażliwy na

rianodinę, a oporny na kofeinę. Oznacza to, że mobilizacja  $\text{Ca}^{2+}$  z wewnątrzkomórkowych magazynów, w których błonie zawarte byłyby wyłącznie receptory rianodinowe typu 3, następowałyby po podaniu rianodiny, a nie kofeiny. Do tej pory nie wiadomo, czy receptor rianodinowy typu 3 jest aktywowany w procesie CICR (*calcium induced calcium release*) [16, 28-31].

### III-2.2. Inne czynniki uwalniające $\text{Ca}^{2+}$

Fosfolipaza C wyizolowana z płytek krwi uczestniczy w tworzeniu zarówno niecyklicznego, jak i cyklicznego  $\text{IP}_3$ - $\text{cIP}_3$ . Stwierdzono, że  $\text{cIP}_3$  wstrzyknięty do fotoreceptorów *Limulus* uwalnia  $\text{Ca}^{2+}$  [32, 33].

Najsilniejszym znanym czynnikiem uwalniającym  $\text{Ca}^{2+}$  jest cykliczna ADP-ryboza (por. pracę w 4 numerze 39 tomu *Post Biochem* z 1993 r., str.: 210-212).  $\text{EC}_{50}$ , czyli stężenie cyklicznej ADP-rybozy, przy którym wykazuje połowę maksymalnego uwolnienia  $\text{Ca}^{2+}$  z homogenatów komórek jajowych jeżowca wynosi 18nM, a w przypadku  $\text{IP}_3$ ,  $\text{EC}_{50}$  jest dziesięciokrotnie większe. Cykliczna ADP-ryboza wiąże się z kanałami wapniowymi błony siateczki śródplazmatycznej wrażliwymi na rianodinę i aktywuje proces uwalniania  $\text{Ca}^{2+}$ . Cykliczna ADP-ryboza może działać jako endogenny regulator procesu CICR, a także jako wtórny przekaźnik mobilizujący  $\text{Ca}^{2+}$  [34-40].

### III-3. Procesy uwalniania $\text{Ca}^{2+}$ ze struktur subkomórkowych wolno wymieniających $\text{Ca}^{2+}$

$\text{Ca}^{2+}$  ze struktur subkomórkowych wolno wymieniających  $\text{Ca}^{2+}$  uwalniane są na ogół przez odwrócenie mechanizmu, według którego były pobierane [11]. Wyjątkiem są mitochondria, w których proces ten ma bardziej skomplikowany przebieg. Może odbywać się poprzez odwrócenie uniportu, na drodze elektroneutralnego antyportu, lub z udziałem mega kanałów wrażliwych na cyklosporynę [11, 41, 42]. Pojęcia uniport i antyport oznaczają transport bierny. Uniport jest procesem, w którym białko nośnikowe transportuje substancję z jednej strony błony na drugą. Z antyportem mamy natomiast do czynienia, gdy transportowi jednej towarzyszy jednoczesny transport drugiej substancji w przeciwnym kierunku.

## IV. Kontrola napływu $\text{Ca}^{2+}$

### IV-1. Mechanizmy napływu $\text{Ca}^{2+}$ zależnego od stopnia opróżnienia wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych

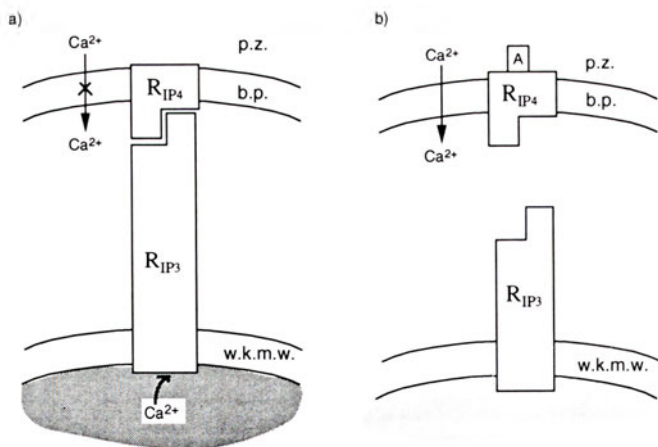
W ostatnich latach we wszystkich badanych komórkach niepobudliwych zaobserwowano związany z opróżnieniem wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych napływ  $\text{Ca}^{2+}$  przez błonę plazmatyczną [43-50]. Zaobserwowanie zbieżności pomiędzy zapeł-

nieniem wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych, a przepuszczalnością błony plazmatycznej potwierdzono przeprowadzając doświadczenia z tapsigarginą i 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydrochinonem [51]. Związki te są inhibitorami ATP-azy wapniowej znajdującej się w błonach wewnątrzkomórkowych struktur magazynujących  $\text{Ca}^{2+}$ . Gdy zahamowany jest proces katalizujący napływ  $\text{Ca}^{2+}$  do ich wewnątrzkomórkowych magazynów zaczyna przeważać proces ich wypływu. Tak więc efektem działania tych inhibitorów jest opróżnienie wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych i aktywacja napływu  $\text{Ca}^{2+}$  do komórki [52].

Mechanizm zakładający przesłanie informacji z opróżnionego wewnątrzkomórkowego magazynu wapniowego do błony plazmatycznej i następująca w konsekwencji tego zmiana jej przepuszczalności w stosunku do  $\text{Ca}^{2+}$ , nazwano procesem pojemnościowego napływu wapnia [46].

P u t n e y w 1986 r. wysunął hipotezę o bezpośrednim strukturalnym połączeniu magazynów wapniowych z błoną plazmatyczną. Obniżenie zawartości  $\text{Ca}^{2+}$  w wewnętrznych magazynach może powodować otworzenie połączenia typu nekus (jest to miejsce, w którym zachodzi wymiana metaboliczna i jonowa pomiędzy sąsiadującymi komórkami), a wówczas  $\text{Ca}^{2+}$  z medium zewnątrzkomórkowego mogłyby napływać do magazynów, a stamtąd do cytoplazmy. Za tego typu hipotezą przemawiała obserwacja zmiany transmisji sygnału z opróżnionych magazynów wapniowych do błony plazmatycznej po podaniu cytochalazyny (czynnik wpływający na cytoskielet) [53].

W cztery lata później I r v i n e [54] zasugerował udział receptorów:  $\text{IP}_3$  i  $\text{IP}_4$  w pojemnościowym napływie wapnia. Przy zapełnieniu wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych, znajdujące się w ich świetle  $\text{Ca}^{2+}$  łączą się z receptorami  $\text{IP}_3$ . Zwiększa się wówczas powinowactwo receptora  $\text{IP}_3$  do receptora  $\text{IP}_4$  znajdującego się w błonie plazmatycznej. W chwili sprzężenia receptorów:  $\text{IP}_3$  i  $\text{IP}_4$  kanały wapniowe w błonie plazmatycznej przyjmują konformację zamkniętą. Sytuacja zmienia się po podaniu agonisty. Następuje wtedy rozprężenie receptorów  $\text{IP}_3$  i  $\text{IP}_4$ , a kanały wapniowe w błonie plazmatycznej otwierają się (Ryc. 1). Później jednak techniką *patch-clamp* wykazano, że  $\text{IP}_4$  jest bez wpływu na przepływ ładunków dodatnich przez kanał wapniowy aktywowany po uwolnieniu  $\text{Ca}^{2+}$  z wewnątrzkomórkowych magazynów [55]. Wyszło też hipotezę, że transmisja sygnału wapniowego związana jest ze zlaniem się wyspecjalizowanych pęcherzyków zawierających kanały wapniowe z błoną plazmatyczną. Przypuszczenie takie wysunięto na podstawie przeprowadzonego doświadczenia z kwasem okadejowym. Jest on inhibitorem transportu pęcherzykowego. Podany komórkom HeLa powodował zahamowanie napływu  $\text{Ca}^{2+}$  indukowanego tapsigarginą [56, 57]. Wydaje się, że aktywacja napływu  $\text{Ca}^{2+}$  przez błonę plazmatyczną



Ryc. 1. Udział receptorów IP<sub>3</sub> oraz IP<sub>4</sub> w pojemnościowym napływie wapnia.

a) Wewnątrzkomórkowe magazyny wapniowe wypełnione, sprzężenie receptorów IP<sub>3</sub> oraz IP<sub>4</sub>, kanały wapniowe w błonie plazmatycznej zamknięte.

b) Wewnątrzkomórkowe magazyny wapniowe opróżnione, rozprężenie receptorów IP<sub>3</sub> oraz IP<sub>4</sub>, kanały wapniowe w błonie plazmatycznej otwarte.

A — agonista, p.z. — przestrzeń zewnątrzkomórkowa, b.p. — błona plazmatyczna, w.k.m.w. — wewnątrzkomórkowe magazyny wapniowe, IP<sub>3</sub>, IP<sub>4</sub> — receptory IP<sub>3</sub> oraz IP<sub>4</sub>.

nie jest wywołana przez bezpośrednie działanie IP<sub>3</sub> na kanały wapniowe w błonie plazmatycznej [58], ani też nie jest modulowana przez [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [48, 59, 60].

#### IV-2. Charakterystyka pojemnościowego napływu Ca<sup>2+</sup> i I<sub>KWUM</sub>

Metodami biochemicznymi stwierdzono, że aktywacja napływu Ca<sup>2+</sup> przez błonę plazmatyczną:

1. nie wymaga udziału receptorów w błonie plazmatycznej,
2. może być wywołana przez różne procedury eksperymentalne, których cechą wspólną jest, doprowadzenie do opróżnienia wewnętrznych magazynów wapniowych,
3. ma miejsce tak długo, jak długo magazyny wapniowe pozostają opróżnione i zachodzi nawet po ustaniu stymulacji przez agonistę,
4. jest niewrażliwa na klasyczne inhibitory kanałów wapniowych zależnych od potencjału, takich jak: werapamil, nifedypina
5. jest hamowana przez dwu- i trójwartościowe kationy, tj. Cd<sup>2+</sup> i La<sup>3+</sup>, pochodne imidazolowe typu SK&F96365 oraz przez liczne inhibitory cytochromu P450, jak: CO, ekonazol, mikonazol, klotrimazol, α-naftoflawon, metyrapon [48, 61].
6. występuje powszechnie, we wszystkich do tej pory przebadanych komórkach [48, 61].

Badając mastocyty metodą *patch-clamp* wykryto przepływ ładunków dodatnich przez błonę plazmatyczną — I<sub>KWUM</sub> [55]. Przepływ ten odpowiadał napływowi Ca<sup>2+</sup> do wnętrza komórki przez kanał KWUM o następujących właściwościach:

1. bardzo niska przewodność elektryczna (ok. 20 fS) [58],

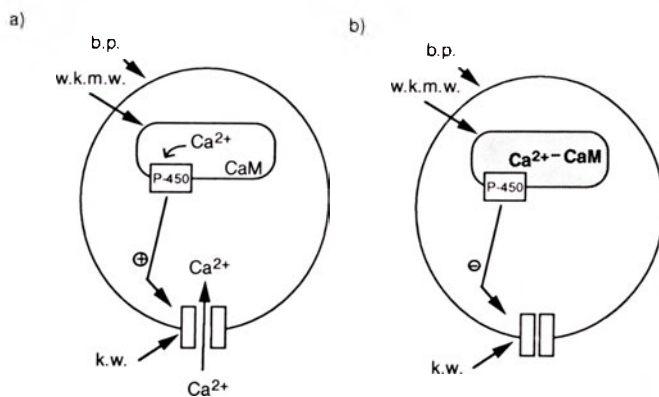
2. wysoka selektywność w stosunku do Ca<sup>2+</sup> [55, 58],
  3. brak zauważalnego wpływu potencjału elektrycznego błony komórkowej na aktywność kanału [55, 58].
- Obserwowane jest opóźnienie (rzędu 1 minuty) pomiędzy opróżnieniem wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych przez chelatory wapniowe, takie jak: EGTA, czy BAPTA a przepływem I<sub>KWUM</sub>. Zjawisko to nie jest do końca wyjaśnione [49, 62-74].

#### IV-3. Czynniki uczestniczące w procesie pojemnościowego napływu Ca<sup>2+</sup>

##### IV-3.1. Cytochrom P450

Badania Montera i wsp. [48] zasugerowały udział mikrosomalnego cytochromu P450 w regulacji przepuszczalności błony plazmatycznej dla Ca<sup>2+</sup>. Inhibitory cytochromu P450, takie jak: CO, antyoksydanty, imidazolowe związki przeciwrzybcie, inhibitory lipooksygenazy hamowały następującą po opróżnieniu wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych aktywację kanałów wapniowych w tymocytach szczurzych [48]. Sugeruje się, że cytochrom P450 moduluje proces pojemnościowego napływu wapnia poprzez mechanizm zależny od kalmoduliny (Ryc. 2). Związki antagonistyczne w stosunku do kalmoduliny, zarówno pochodne fenotiazynowe (trifluoroperazyna, flufenazyna, chloropromazyna), jak i pochodne dibenzodiazepiny (np. klozapina) znoszą działanie inhibitorów cytochromu P450 [48].

Opierając się na powyższych obserwacjach przedstawiono mechanizm kontrolujący przepuszczalność błony plazmatycznej w stosunku do Ca<sup>2+</sup>. Zgodnie z nim obniżenie się stężenia Ca<sup>2+</sup> w wewnątrzkomórkowych kompartmentach magazynujących powinno prowadzić do następujących zmian:



Ryc. 2. Model regulacji przepuszczalności błony plazmatycznej dla Ca<sup>2+</sup> w zależności od stopnia zapelnienia wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych.

a) wewnątrzkomórkowe magazyny wapniowe opróżnione, aktywacja P450,

b) wewnątrzkomórkowe magazyny wapniowe wypełnione, zahamowanie aktywności P450, CaM — kalmodulina, P450 — cytochrom P450, w.k.m.w. — wewnątrzkomórkowe magazyny wapniowe, b.p. — błona plazmatyczna, k.w. — kanał wapniowy.



- oddysocjowania  $\text{Ca}^{2+}$  z kompleksu  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulina, znajdującego się w tychże kompartmentach,
- przywrócenia aktywności mikrosomalnego cytochromu P450,
- otwarcia kanałów wapniowych w błonie plazmatycznej [48].

Wyjaśnienie udziału cytochromu P450 w transmisji sygnału wapniowego w komórkach niepobudliwych przyniosły przeprowadzone w ostatnim czasie badania komórek śródbłonna naczyniowego (Ryc. 3). Najważniejszym ich rezultatem było odkrycie wtórnego przekaźnika koniecznego do aktywacji pojemnościowego napływu wapnia. Tym wtórnym przekaźnikiem jest kwas 5,6-epoksyseikozatrienowy (5,6-EET). Powstaje on z kwasu arachidonowego przy zaangażowaniu mikrosomalnego cytochromu P450. Wykazano, że induktor cytochromu P450- $\beta$ -naftoflawon zwiększa tempo napływu  $\text{Ca}^{2+}$  do komórek z opróżnionymi magazynami wapniowymi. Gdy pozostawały one w stanie spoczynkowym napływ ten stymulowany był przez 5,6-EET.

Na podstawie powyższych obserwacji zaproponowano przebieg zdarzeń po obniżeniu się stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w wewnątrzkomórkowych przestrzeniach magazynujących ten kation:

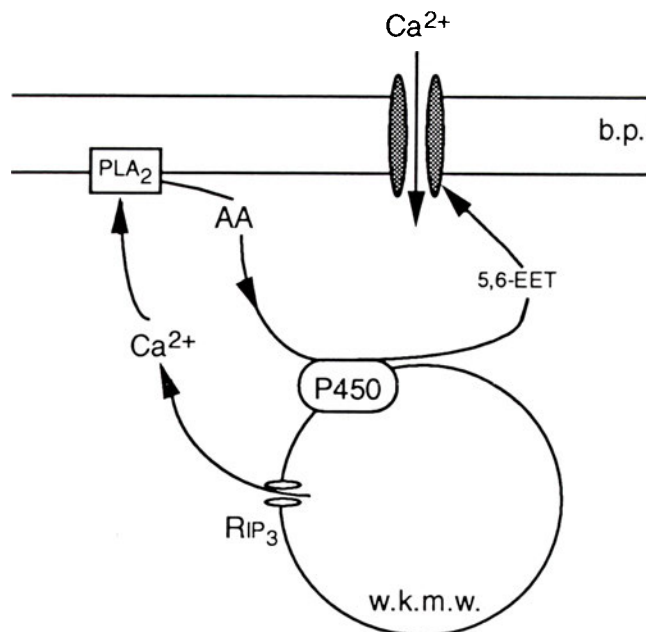
- aktywacja mikrosomalnego cytochromu P450,
- synteza 5,6-EET z kwasu arachidonowego uwolnionego z błony plazmatycznej katalizowana przez cytochrom P450,
- pośrednia lub bezpośrednia aktywacja kanału wapniowego w błonie plazmatycznej przez 5,6-EET lub jego metabolit [79].

Jednakże, udział cytochromu P450 w procesie pojemnościowego napływu wapnia jest kwestionowany przez szereg danych doświadczalnych, z których wysnuto następujące wnioski:

1. ekonazol, inhibitor cytochromu P450, być może hamuje aktywność, a nie produkcję czynnika napływu wapnia [69],
2. brak jest korelacji pomiędzy ekspresją genów cytochromu P450 i  $I_{\text{KWUM}}$  [61],
3. brak jest zależności pomiędzy stałą inhibitorową ( $K_i$ ) wielu związków w stosunku do cytochromu P450, a przebiegiem procesu pojemnościowego napływu wapnia [61],
4. inhibitory cytochromu P450 są niespecyficznymi inhibitorami kanałów jonowych, np. mogą hamować kanały  $\text{K}^+$  aktywowane przez  $\text{Ca}^{2+}$  i kanały  $\text{Ca}^{2+}$  zależne od potencjału [70].

#### IV-3.2. Czynniki indukujący napływ $\text{Ca}^{2+}$

Współcześnie najbardziej akceptowana hipoteza tłumacząca pojemnościowy napływ wapnia zakłada tworzenie wtórnego przekaźnika, który byłby uwalniany do cytoplazmy z wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych, gdy zmniejszy się w ich świetle



Ryc. 3. Udział cytochromu P450 w procesie pojemnościowego napływu wapnia.

P450 — cytochrom P450, 5,6-EET — kwas 5,6-epoksyseikozatrienowy, AA — kwas arachidonowy,  $\text{PLA}_2$  — fosfolipaza  $A_2$ ,  $\text{RIP}_3$  — receptor  $\text{IP}_3$ , b.p. — błona plazmatyczna, w.k.m.w. — wewnątrzkomórkowe magazyny wapniowe.

stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  [46]. Czynnikiem indukujący napływ wapnia, w skrócie CNW (w literaturze anglojęzycznej CIF — *calcium influx factor*), bo tak przyjęło się określać ten związek, został wyizolowany z komórek linii Jurkat [69]. Czynnikiem napływu wapnia jest małym ufosforylowanym anionem (jego ciężar cząsteczkowy nie przekracza 500 D). Najprawdopodobniej nie jest peptydem (podwyższona temperatura i działanie proteaz nie wpływa na jego aktywność). Stwierdzono, że zawiera grupy — hydroksylową lub też hydroksylową i aminową. Wykazano również, że penetruje on przez błony plazmatyczne. Wydaje się, że głównym krótkoterminowym efektem opróżnienia magazynów wapniowych nie jest synteza CNW, ale raczej jego wyrzucenie z organelli do cytoplazmy. Prawdopodobnie CNW jest nieustannie produkowany w wewnętrznych magazynach i uwalniany do cytoplazmy w chwili aktywacji komórki [69].

Niezależne elektrofizjologiczne badania potwierdziły opisane wcześniej właściwości nowego, rozpuszczalnego przekaźnika. Badając oocyty *Xenopus laevis* wykazano, że kwas okadejowy — będący inhibitorem fosfatazy serynowo/treoninowej nasila pojemnościowy napływ wapnia. Stąd wnioskuje się, że przekaźnik ten jest wrażliwy na fosfatazy, a więc jest ufosforylowany [74].

#### IV-3.3. Małe białko G

Wstrzyknięcie analogu  $\text{GTP-GTP}(\gamma)\text{S}$  do uprzednio stymulowanych agonistą komórek gruczołów łzowych powodowało zahamowanie napływu do cytoplazmy  $\text{Ca}^{2+}$  ze środowiska zewnątrzkomórkowego [75]. Taki efekt mógł być wywołany działaniem  $\text{GTP}(\gamma)\text{S}$  na

małe białko G. GTP( $\gamma$ )S hamuje napływ  $\text{Ca}^{2+}$  tylko, gdy zostaje wstrzyknięte przed aktywacją komórki przez  $\text{IP}_3$ , która następuje tuż po podaniu agonisty [56]. Opierając się na tych obserwacjach zaproponowano 3 hipotezy tłumaczące sposób, w jaki małe białko G aktywuje napływ  $\text{Ca}^{2+}$ . Być może małe białko G:

- bezpośrednio aktywuje kanał wapniowy w błonie plazmatycznej,
- pośrednio, uczestnicząc w syntezie czynnika zdolnego do dyfuzji do błony plazmatycznej, aktywuje w niej kanał wapniowy,
- indukuje włączenie do błony plazmatycznej wyspecjalizowanych pęcherzyków zawierających w swej błonie kanały wapniowe [56].

#### IV-4. Regulacja napływu $\text{Ca}^{2+}$ przez fosforylację/defosforylację

Wyniki badań przeprowadzonych na neutrofilach, płytkach, komórkach HeLa przemawiają za udziałem etapu fosforylacji/defosforylacji w procesie pojemnościowego napływu wapnia. Fosforylacja/defosforylacja kontroluje aktywność białka regulatorowego w ten sposób, że defosforylacja tego białka stymuluje napływ  $\text{Ca}^{2+}$  [76]. Z kolei inhibitory fosfataz 1 i 2A typu takie, jak: kalykulina A, tautomycyna, czy kwas okadejowy hamują pojemnościowy napływ wapnia [77]. W płytkach — fosforylacja/defosforylacja wydaje się odgrywać ważną rolę w regulacji napływu  $\text{Ca}^{2+}$  wynikającego z opróżnienia kompartmentów wrażliwych na agonistę i mniejszą rolę w przekazywaniu sygnału powstającego w wyniku opróżnienia kompartmentów magazynujących wapń, wrażliwych na tasparginę [78].

#### V. Podsumowanie

Właściwa regulacja  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  jest podstawowym warunkiem działania  $\text{Ca}^{2+}$  jako wtórnego przekaźnika informacji w komórce. W utrzymaniu prawidłowego  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  biorą udział błonowe układy transportujące  $\text{Ca}^{2+}$ , a także związki i organelle buforujące i wiążące ten kation. Podwyższone  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  obserwowane w stymulowanej komórce jest wynikiem, z jednej strony, napływania  $\text{Ca}^{2+}$  ze środowiska zewnątrzkomórkowego, z drugiej zaś uwalniania ich z wewnątrzkomórkowych przestrzeni magazynujących. Kolejność przebiegu tych dwóch procesów (napływu i uwalniania) w komórkach niebudliwych jest ściśle określona. Wzrost przepuszczalności błony plazmatycznej dla  $\text{Ca}^{2+}$  następuje dopiero po rozpoczęciu mobilizacji  $\text{Ca}^{2+}$  z ich komórkowych magazynów. Powstaje pytanie — w jaki sposób informacja o stanie zapelnienia tychże magazynów jest przesyłana do błony plazmatycznej? Prowadzone w ostatnich latach badania przyniosły częściowe wyjaśnienie. Zostało udokumentowane mianowicie, że niezbędnym czynnikiem w przekazywaniu tego sygnału jest związek o charakterze wtórnego przekaźnika. W jednym z eks-

perymentów [79] badacze stwierdzili, że przekaźnikiem takim jest kwas 5,6-epoksyekoziatrienowy. Nie wiadomo jednak, czy kanały wapniowe w błonie plazmatycznej aktywowane są bezpośrednio przez 5,6-EET, czy przez jego metabolit. Powstaje także pytanie, czy 5,6-EET jest jedynym możliwym wtórnym przekaźnikiem informacji o stanie zapelnienia magazynów wapniowych. Rysują się zatem dalsze perspektywy badań regulacji kanałów wapniowych w komórkach niebudliwych.

#### Podziękowania

Autorka niniejszego tekstu wyraża swoją wdzięczność panu prof. dr hab. Jerzemu Duszyńskiemu i pani prof. dr hab. Zofii Zielińskiej za okazaną pomoc.

Artykuł otrzymano 10 maja 1995 r.

Zaakceptowano do druku 11 września 1995 r.

#### Piśmiennictwo

1. Carafoli E (1982) W: Carafoli E (red) Membrane Transport of Calcium, Academic Press, London str 109
2. Blaustein MP (1984) W: Blaustein MP, Lieberman M (red) Electrogenic Transport: Fundamental Principles and Physiological Implications, Raven Press, New York, 129
3. Baker PF (1986) W: Ritchie MJ, Keynes RD, Bolis L (red) Ion Channels in Neuronal Membranes, A. R. Liss, New York, 177
4. Berridge MJ, Irvine R (1984) *Nature* (Lond) **312**: 315-320
5. Borle AB (1981) *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **90**: 13-153
6. Alonso GL, Bazerque DM, Arrigo DM, Tumilasci OR (1971) *J Gen Physiol* **58**: 340-350
7. Clemente F, Meldolesi J (1975) *J Cell Biol* **65**: 88-102
8. Fujimoto T (1992) *J Cell Biol* **120**: 1147-1157
9. Bygrave FL (1978) *Biol Rev* **53**: 43-80
10. Himpens B, De Smedt H, Droogmans G, Castells R (1992) *Am J Physiol* **263**: C95-C105
11. Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J (1994) *Physiol Rev* **74**,3: 595-636
12. Fasolato C, Zottini M, Clementi E, Zacchetti D, Meldolesi J, Pozzan T (1991) *J Biol Chem* **266**: 20159-20167
13. Vasington FD, Murphy JV (1962) *J Biol Chem* **237**: 2670-2677
14. Spamer C, Heilmann C, Gerok W (1987) *J Biol Chem* **262**: 7782-7789
15. Berridge MJ (1993) *Nature* (Lond) **361**: 315-325
16. Fill M, Coronado R (1988) *Trends Neurosci* **11**: 453-457
17. Mc Pherson PS, Campbell (1993) *J Biol Chem* **268**: 13765-13768
18. Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K (1989) *Nature* (Lond) **339**: 439-445
19. Marks AR, Tempst P, Hwang K S, Taubman MB, Inui M (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 8683-8687
20. Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki K, Wada K, Maeda N, Mikishiba K (1989) *Nature* (Lond) **342**: 32-38
21. Khan AA, Steiner JP, Klein MG, Schneider MF, Snyder SH (1992) *Science* **257**: 815-818
22. Galione A, Mc Dougall A, Busa WB, Willmott N, Gillot J, Whitaker M (1993) *Science* **261**: 348-352
23. Mc Pherson SM, Mc Pherson PS, Mathews L, Campbell KP, Longo FJ (1992) *J Cell Biol* **116**: 1111-1121
24. Teraoka H, Nakazato Y, Ohga A (1991) *J Neurochem* **57**: 1884-1890
25. Giannini G, Clementi E, Ceci R, Marziali G, Sorrentino V (1992) *Science* **257**: 91-94
26. Mc Pherson PS, Campbell KP (1993) *J Biol Chem* **268**: 13765-13768
27. Barańska J, Czarny M (1991) *Post Biochem* **37**: 129-132

28. Marks AR, Taubman MB, Saito A, Dai Y, Fleischer S (1991) *J Cell Biol* **114**: 303-312
29. Fleischer S, Inui M (1989) *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **18**: 333-364
30. Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H, Imoto K (1992) *FEBS Lett* **312**: 229-235
31. Sorrentino V, Volpe P (1993) *Trends Pharmacol Sci* **14**: 98-103
32. Majerus PW, Connolly TM, Bansal VS, Inhorn RC, Ross TS, Lips DL (1988) *J Biol Chem* **263**: 3051-3054
33. Majerus PW, Connolly TM, Deckmyn H, Ross T, Bross TE (1986) *Science* **234**: 1519-1527
34. Galione A, White A (1994) *Trends in Cell Biol* **4**: 431-436
35. Dargie PJ, Agre MC, Lee HC (1990) *Cell Regul* **1**: 279-290
36. Galione A (1993) *Science Wash DC* **259**: 325-326
37. Lee HC (1991) *J Biol Chem* **266**: 2276-2281
38. Lee HC (1993) *J Biol Chem* **268**: 293-299
39. Li G, Milani D, Dunne MJ, Pralong WF, Theler JM, Petersen OH, Wollheim CB (1991) *J Biol Chem* **266**: 3449-3457
40. Meszaros LG, Bak J, Chu A (1993) *Nature (Lond)* **364**: 76-78
41. Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabo J, Zoratti M (1992) *J Biol Chem* **267**: 2934-2939
42. Nicholls DG, Akerman K (1982) *Biochim Biophys Acta* **683**: 57-88
43. Berridge MJ (1993) *Nature (Lond)* **361**: 315-325
44. Tsien RW, Tsien RY (1990) *Rev Cell Biol* **6**: 715-760
45. Irvine RF (1990) *FEBS Lett* **263**: 5-9
46. Putney JW (1990) *Jr Cell Calcium* **11**: 611-624
47. Hoth M, Penner R (1992) *Nature (Lond)* **355**: 353-356
48. Alvarez J, Montero M, Garcia-Sancho (1991) *Biochem J* **274**: 193-197
49. Bahnson TD, Pandol SJ, Dionne VE (1993) *J Biol Chem* **268**: 10808-10812
50. Putney JW, Bird GS (1993) *Cell* **75**: 199-201
51. Llopis J, Chow SB, Kass GE, Gahm A, Orrenius S (1991) *Biochem J* **277**: 553-556
52. Takemura H, Hughes AR, Thastrup O, Putney JW (1989) *J Biol Chem* **264**: 12266-12272
53. Putney JW (1986) *Cell Calcium* **7**: 1-12
54. Irvine RF (1990) *FEBS* **263**: 5-9
55. Hoth M, Penner R (1992) *Nature (Lond)* **355**: 353-356
56. Fasolato C, Hoth M, Penner R (1993) *J Biol Chem* **268**: 20737-20740
57. Berlin RD, Preston SF (1993) *Cell Calcium* **14**: 379-386
58. Zweifach A, Lewis RS (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 6295-6299
59. Miledi R, Parker (1984) *J Physiol London* **357**: 173-183
60. Montero M, Alvarez J, Garcia-Sancho J (1991) *Biochem J* **277**: 73-79
61. Fasolato C, Innocenti B, Pozzan T (1994) *Trends Pharmacol Sci* **15**: 77-83
62. Hoth M, Penner R (1993) *J Physiol* **465**: 359-386
63. Mc Donald TV, Premack BA, Gardner P (1993) *J Biol Chem* **268**: 3889-3896
64. Hoth M, Fasolato C, Penner R (1993) *Ann NY Acad Sci* **707**: 198-209
65. Penner R, Fasolato C, Hoth M (1993) *Curr Opin Neurobiol* **3**: 368-374
66. Vaca L, Kunze DL (1993) *Am J Physiol* **264**: H1319-H1322
67. Parekh AB, Foguet M, Lubbert H, Stuhmer W (1993) *J Physiol* **469**: 653-671
68. Sargeant P, Clarkson WD, Sage SO, Heemskerck JW (1992) *Cell Calcium* **13**: 553-564
69. Randriamampita C, Tsien RY (1993) *Nature (Lond)* **364**: 809-814
70. Brugnara C, Defranceschi L, Alpe SL (1993) *J Clin Invest* **92**: 520-526
71. Stauffer PL, Zhao H, Luby-Phelps K, Moss RL, Star RA, Muallem S (1993) *J Biol Chem* **268**: 19769-19775
72. Xu X, Star RA, Tortorici G, Muallem S (1994) *J Biol Chem* **269**: 12645-12653
73. White KA, Marletta MA (1992) *Biochemistry* **31**: 6627-6631
74. Parekh AB, Terlau H, Stuhmer W (1993) *Nature (Lond)* **364**: 814-818
75. Bird GSJ, Putney JW (1993) *J Biol Chem* **266**: 21486-21488
76. Montero M, Garcia-Sancho J, Alvarez J (1993) *J Biol Chem* **268**: 13055-13061
77. Montero M, Garcia-Sancho J, Alvarez J (1994) *J Biol Chem* **269**: 3963-3967
78. Koike Y, Ozaki Y, Qi R, Satoh K, Kurota K, Yatomi Y, Kume S (1994) *Cell Calcium* **15**: 381-390
79. Graier WF, Simecek S, Sturek M (1995) *J Physiol* **482**: 259-274

## Roczny spis treści tom 41, nr 1, 2, 3, 4, 1995

### ARTYKUŁY

- |  |    |
|--|----|
| <b>Anna Kurlandzka, Jan Fronk</b> — Nobel 1994 za białka G . . . . .   | 3  |
| <b>Jan Barciszewski</b> — Twórcy podstaw biologii molekularnej:<br>Emil Fischer, Erwin Schrödinger i Oswald T. Avery . . . . . | 4  |
| <b>Antonina Harłodzińska-Szmyrka</b> — Nowotwory jako choroba genów . . . . .  | 7  |
| <b>Jolanta Kwiatkowska, Tomasz Trzeciak, Ryszard Słomski</b> — Powtórzenia DNA . . . . .                                       | 15 |
| <b>Grzegorz Węgrzyn</b> — Czterofosforan gwanozyny ppGpp, jako czynnik ścisłej kontroli replikacji DNA . . . . .               | 23 |
| <b>Cezary Żekanowski</b> — Peptydowe kwasy nukleinowe — nowa grupa analogów DNA . . . . .                                      | 32 |
| <b>Piotr Kupczyk, Piotr Sawiński, Wiesław Trzeciak</b> — Podłoże molekularne niedoboru 21-hydroksylazy steroidowej . . . . .   | 38 |
| <b>Elżbieta Rębas, Lilla Lachowicz</b> — Neurosteroidy — synteza i metabolizm . . . . .  | 47 |
| <b>Ewa Świeżewska</b> — Prenylacja białek . . . . .  | 51 |
| <b>Artur Osyczka, Bohdan Turyna</b> — Konformacja cytochromu C i jego oddziaływania z oksydazą cytochromową . . . . .          | 59 |

<b>Magdalena Wiktorek, Aleksandra Rojek, Małgorzata Czarny, Jolanta Barańska</b> — Rola cyklu inozytowego w przekazywaniu informacji w jądrze . . . . .	67	<b>Karolina Michalczyk-Janitz, Michał Witt, Jadwiga Jaruzelska</b> — Gen SRY — pierwotny „włącznik” determinacji płci człowieka? . . . . .	212
<b>Barbara Grzelakowska-Sztabert</b> — Regulacja cyklu komórkowego — udział białkowych inhibitorów kinaz cyklino-zależnych . . . . .	80	<b>Ryszard Słomski, Jolanta Kwiatkowska</b> — Diagnostyka molekularna: amplifikacja sekwencji czy wzmacnianie sygnału? . . . . .	220
<b>Krzysztof Liberek</b> — Regulacja odpowiedzi szoku termicznego <i>Escherichia coli</i> . . . . .	94	<b>Łukasz Huminiecki</b> — Terapia genowa — wektory i strategie . . . . .	230
<b>Eliza Wyszko, Mirosława Barciszewska</b> — Struktura i właściwości czynnika transkrypcyjnego IIIA <i>Xenopus laevis</i> . . . . .	102	<b>Waldemar Marczewski</b> — Markery molekularne w genetyce i hodowli roślin . . . . .	237
<b>Michał Dąbrowski</b> — Szukanie igły w stogu siana. Identyfikacja genów ulegających różnicowej ekspresji . . . . .	110	<b>Roman Gondko</b> — Czy przemiany rodników tlenowych w organizmie przebiegają cyklicznie? . . . . .	243
<b>Elżbieta Pluskota, Czesław S. Cierniewski</b> — Regulacja syntezy cząsteczki fibrynogenu . . . . .	115	<b>Joanna Bandorowicz-Pikuła</b> — Domeny w błonach biologicznych i ich znaczenie fizjologiczne . . . . .	247
<b>Iwona Żak</b> — Białka mozaikowe . . . . .	120	<b>Andrzej Wierzbicki</b> — Rola allosterycznej RNazy L w indukowanym przez interferon układzie obronnym komórki . . . . .	257
<b>Łukasz Pułaski</b> — Flipazy — białka transportujące fosfolipidy . . . . .	131	<b>Mirosława Siatecka, Jan Barciszewski</b> — Struktura i funkcja syntetaz aminoacylotRNA . . . . .	266
<b>Andrzej Głowacki, Ewa Maria Koźma, Krystyna Olczyk, Eugeniusz J. Kucharz</b> — Glikozoaminoglikany — struktura i funkcja . . . . .	139	<b>Ludmiła Żylińska, Lilla Lachowicz</b> — Serynowo/treoninowe fosfatazy fosfoproteinowe w tkance mózgowej . . . . .	276
<b>Anna Moczarska</b> — Niektóre biochemiczne aspekty patogenezy serca ogłuszonego . . . . .	158	<b>Barbara Niewczas</b> — Regulacja wewnątrzkomórkowego stężenia $Ca^{2+}$ w komórkach niepobudliwych . . . . .	283
<b>Renata Dąbrowska, Maria A. Grązewicz</b> — Cytoskielet komórek mięśniowych . . . . .	165		
<b>Barbara Majewska</b> — Białko MAP-2 i jego rola w wielu przejawach plastyczności i stanach patologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym . . . . .	175		
<b>Krzystian Kaletha, Manfred Gross</b> — Wrodzony niedobór deaminazy AMP — podłoże molekularne defektu . . . . .	183		
<b>Urszula Kralisz</b> — Receptory kolagenu płytek krwi . . . . .	188		
<b>Piotr Widlak</b> — Oddziaływanie białek z uszkodzonym DNA . . . . .	195		
<b>Hanna Wehr</b> — Biologiczne skutki modyfikacji lipoprotein . . . . .	201		
<b>Ewa Sikora</b> — Czy znamy już gen śmierci . . . . .	210		

## WSPOMNIENIA

**Przyjaciele i uczniowie** — Profesor Irena Borkowska — Wspomnienia . . . . . 2

**Uczniowie i współpracownicy** — Profesor Stanisław Marian Józkiwicz — Wspomnienia . . . . . 78

**Prenumerata „Postępów Biochemii” w 1996 r.**

**Prenumerata dla instytucji — 60 zł  
Indywidualna — 28 zł  
50% zniżki dla członków PTBioch.**

# Indeks autorów prac przeglądowych, tom 41, 1995

## B

**Bandorowicz-Pikuła J** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Barańska J** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

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

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

## C

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

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

## D

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

**Dąbrowski M** — Pracownia Hodowli Komórek i Tkank, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

## F

**Fronk J** — Instytut Biochemii UW, ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

## G

**Głowacki A** — Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

**Gondko R** — Katedra Biofizyki Ogólnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Babacha 12/16, 90-237 Łódź

**Grażewicz MA** — Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

**Gross M** — Medizinische Poliklinik der Universität München, Pettenkofersstrasse 8a, 80336 München, Germany

**Grzelakowska-Sztabert B** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

## H

**Harłodzińska-Szmyrka A** — Zakład Immunologii Nowotworów AM, ul. Mikulicza-Radeckiego 7, 50-368 Wrocław

**Huminiński Ł** — Wydział Biologii, Uniwersytet A. Mickiewicza, Pracownia Biochemii Stosowanej, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

## J

**Jaruzelska J** — Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

## K

**Kaletha K** — Katedra i Zakład Biochemii AM, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

**Koźma EM** — Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

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

**Kucharz EJ** — IV Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Śląska Akademia Medyczna, ul. Edukacji 102, 43-100 Tychy

**Kupczyk P** — Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej AM, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

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

**Kwiatkowska J** — Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

## L

**Lachowicz L** — II Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii AM, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

**Liberek K** — Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

## M

**Majewska B** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Marczewski W** — Zakład Genetyki i Syntezy Materiałów Wyjściowych, Instytut Ziemiaka, Młochów, 05-832 Rozalin 7

**Michalczyk-Janitz K** — Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

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

## N

**Niewczas B** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

## O

**Osyczka A** — Zakład Biofizyki, Instytut Biologii Molekularnej UJ, al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

**Olczyk K** — Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

**P**

- Pluskota E** — Zakład Biofizyki, Instytut Fizjologii i Biochemii AM, ul. Lindleya 3, 90-131 Łódź  
**Pułaski Ł** — Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, Łódź

**R**

- Rębas E** — II Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii AM, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź  
**Rojek A** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**S**

- Sawiński P** — Katedra i Zakład Histologii i Embriologii AM, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań  
**Siatecka B** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań  
**Sikora E** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa  
**Słomski R** — Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań  
**Świeżewska E** — Zakład Biochemii Lipidów, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

**T**

- Trzeciak T** — Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań  
**Trzeciak HT** — Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań  
**Turyna B** — Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej UJ, al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

**W**

- Wehr H** — Instytut Psychiatrii i Neurologii, Zakład Genetyki, al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa  
**Węgrzyn G** — Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk  
**Widlak P** — Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, 44-100 Gliwice  
**Witt M** — Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań  
**Wierzbicki A** — Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej AM, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań  
**Wiktorek M** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa  
**Wyszko E** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań

**Ż**

- Żak I** — Katedra Biochemii i Chemii, Śląska Akademia Medyczna, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice  
**Żekanowski C** — Zakład Genetyki, Instytut Matki i Dziecka, ul. Kasprzyka 17A, 01-211 Warszawa  
**Żylińska L** — II Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii AM, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

## Podręcznik laboratoryjny

Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk opracował podręcznik laboratoryjny pt. „Inżynieria Genetyczna i Biologia Molekularna. Metody”, w którym zawarto na 170 stronach 67 metod sprawdzonych i stosowanych w IBB PAN. Wydawcą książki jest „TECHGEN” spółka z o.o. ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, tel./fax 658-47-89, u którego można zamawiać i nabywać podręcznik.

# **XXXII ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO**

Zarząd Krakowskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego pragnie poinformować, że w dniach **18—21 września 1996 roku w Krakowie odbędzie się XXXII Zjazd PTBioch**. Komitet Organizacyjny ma zaszczyt i przyjemność zaprosić wszystkich Członków Towarzystwa i Osoby zainteresowane do udziału w Zjeździe.

Obrady Zjazdu odbywać się będą na terenie Centrum Kongresowego Akademii Rolniczej w Krakowie przy ulicy 29 Listopada 46-54. Przewidujemy zakwaterowanie Uczestników Zjazdu w Domach Akademickich w pobliżu Centrum Kongresowego oraz w hotelach. Serdecznie zapraszamy!

**Komunikat nr 1 wraz z kartą zgłoszenia ukaże się w październiku 1995 r.**

## **KOMITET NAUKOWO-ORGANIZACYJNY**

A. Dubin, F. Dubert, J. Frendo, M. Gumińska, T. Kędryna, A. Klein, P. Laidler, M. Leja, A. Lityńska, J. Naskalski, W. Ostrowski, J. Potempa, H. Rokita, T. Sarna, Z. Szafran, T. Stelmazyńska-Zgliczyńska, Z. Wasylewski, Z. Zak

## **PROGRAM NAUKOWY ZJAZDU**

1. Genetyka molekularna człowieka.
2. Zależność struktury i funkcji białek oraz kwasów nukleinowych.
3. Potranslacyjna modyfikacja białek.
4. Rodniki tlenowe i ich znaczenie w biologii i w medycynie.
5. Proteiny i ich inhibitory.
6. Biotechnologia w medycynie i rolnictwie.
7. Biochemia i środowisko.
8. Biochemia kliniczna.
9. Nauczanie biochemii.
10. Doniesienia różne.

## **KONTAKT Z ORGANIZATORAMI**

KOMITET ORGANIZACYJNY  
XXXII ZJAZDU P.T. BIOCHEMICZNEGO

Instytut Biochemii Lekarskiej CM UJ  
31-034 Kraków, ul. Kopernika 7  
tel: (012) 22-74-00, 18-85-05,  
fax: (012) 33-69-07

Dr hab. Piotr Laidler e-mail: [mblaidle@kinga.cyf-kr.edu.pl](mailto:mblaidle@kinga.cyf-kr.edu.pl)  
Dr Teresa Kędryna e-mail: [mbkedryn@kinga.cyf-kr.edu.pl](mailto:mbkedryn@kinga.cyf-kr.edu.pl)

**Recenzja książki pt. „Podstawy genetyki dla studentów i lekarzy”, pod redakcją prof. G. Drewy, wydawca — Volumed, Wrocław**

Ze względu na niesłychanie szybki rozwój genetyki człowieka w ciągu ostatnich 10 lat studenci medycyny muszą obecnie zapoznawać się z pojęciami, które 20 lat temu nie tylko nie wchodziły do programu nauczania ale nawet nie istniały (PCR, cyklina itp.).

Dwa lata temu Komisja Genetyki Człowieka Komitetu Patofizjologii PAN przedstawiła „Uwagi ogólne dotyczące nauczania genetyki w Akademiach Medycznych”, w których nauczanie podzielone jest na dwa etapy. Program pierwszego z nich ma na celu „rozwińnięcie wiadomości z zakresu genetyki ze szkoły średniej, ze szczególnym uwzględnieniem współczesnych osiągnięć genetyki ogólnej, molekularnej i człowieka”. Drugi etap obejmuje genetykę kliniczną i nie jest związany z zakresem tej recenzji.

Recenzowana książka została przygotowana jako podręcznik właśnie dla podstawowego etapu nauczania genetyki na Akademiach Medycznych. We wstępie redaktor pisze „podręcznik... nie wyczerpuje wiedzy ostatnich lat, zaznajamia jednak z problemami genetyki nie tylko w aspekcie współczesnej biologii molekularnej ale i genetyki człowieka”. Pisze też, że zakres podręcznika odpowiada ogólnym treściom programowym przedmiotu „biologia z genetyką” na wydziałach lekarskich.

O ile to drugie twierdzenie jest prawdziwe (w rozdziałach poruszane są hasła podane w uwagach ogólnych Komisji Genetyki Człowieka PAN) o tyle pierwsze twierdzenie w znacznym stopniu nadużywa znaczenia słowa współczesne.

Główną wadą recenzowanego podręcznika jest właśnie jego absolutna niewspółczesność. Drugą jest poważna liczba błędów. Rozdziały o genetyce klasycznej są w miarę poprawne ale jednak nie do końca. Na pierwszej stronie wprowadzone są pojęcia mutonu i rekonu, które w zasadzie nie pojawiają się już od ponad 20 lat w podręcznikach genetyki (jako że jednostką mutacji czy rekombinacji nie jest przecież gen). Podział genów na trzy grupy (takie, które nie kodują nic, kodują RNA i kodują białka) jest też dość unikatowy, szczególnie, że nie jest przyjęte nazywanie genami sekwencji, które są odpowiedzialne za początek replikacji chromosomu. Enzymy restrykcyjne występują w tym rozdziale wpasowane pomiędzy denaturację DNA i sekwencje repetytywne, co może nie jest błędem, ale nie jest też logiczne. Na str. 11 podane jest, że mitochondrialny DNA koduje białka rybosomów (to nieprawda, z jednym wyjątkiem genu *var* u drożdży). Na str. 20 o snRNA podane jest, że „jest to jedyny znany przypadek, gdy funkcje enzymu spełnia RNA nie białko” co znowu nie jest prawdą. I w końcu rozdziału podaje się, że wirusy RNA nazywane są retrowirusami, choć istnieje np. wirus grypy, wirus mozaiki tytoniu i wiele, wiele innych, które choć mają genomy zbudowane z RNA na pewno nie są retrowirusami.

W rozdziale 2 podane jest, że gen może mieć kilka do kilkunastu eksonów, wiadomo, że może być ich znacznie więcej, i tu znowu podane jest, że wycinanie tych intronów jest katalizowane przez RNA. Podpisy pod rysunkami 7 i 8 są znowu błędne — na rysunku 7 ITS (internal transcribed sequence) podana jest jako intron, a ETS — external transcribed sequence jako ekson, obie sekwencje nie są w zasadzie, ani tym, ani tym, bo są usuwane w procesie dojrzewania pre-rRNA, ale znajdujące się po ich obu stronach odcinki nie są łączone. Na rys. 8 w podpisie jest mowa o dojrzewaniu rybosomów w komórkach ludzkich HeLa, ale wielkości rRNA wyraźnie dotyczą *E. coli*.

Tego typu analizę można zrobić dla każdego rozdziału, ale kilka jest szczególnie niepoprawnych — 3. o regulacji funkcji genu, 6. o dziedziczeniu monogenowym, 15. o genetycznych podstawach onkogenezy, 17. — Inżynieria genetyczna, 19. — Genetyka zachowania, 20. — Podstawy poradnictwa genetycznego, 21. — Mapowanie chromosomów. Nie znaczy to, że pozostałe są dobre (są błędy w rozdziałach o starzeniu, o immunologii, o cytogenetyce), ale nie jest możliwa szczegółowa ich krytyka ze względu na brak miejsca.

Zrozumienie regulacji działania genów jest bardzo ważne, ponieważ zaburzenia ekspresji genów prowadzą do wielu różnych chorób u człowieka. Zarówno rozdział o regulacji funkcji genu jak i rozdział o genetycznych podstawach onkogenezy w żaden sposób nie przedstawiają współczesnego stanu wiedzy na ten temat. Nie są omówione ani czynniki transkrypcyjne ani cykl komórkowy. Zrozumienie powiązań cyklu komórkowego z procesem powstawania nowotworów jest jednym z najważniejszych osiągnięć ostatnich kilku lat. W opisie genomu retrowirusów znowu promotory i enhancery są nazywane genami, co jest błędem. W opisie genetycznych predyspozycji do choroby nowotworowej brak opisu zespołu Li-Fraumeni, który jest świetnym przykładem — właśnie dla studentów — jak ważny jest p53.

Rozdział 6 — o dziedziczeniu monogenowym źle koresponduje z rozdziałem o raku, np. na str. 281 podano, że gen NF1 leży w chromosomie 17 (nie wspomina się co koduje ten gen, choć obecnie to wiadomo), a na str. 82, że nie ma diagnostyki prenatalnej dla zespołu von Recklinghausena, wywoływanego przez mutacje w tym genie, choć była ona możliwa już przed 1993 r. Na str. 283 gen RB jest zlokalizowany w 13q14, ale na str. 83 przy opisie siatkówczaka jego powstanie wywołane jest przez delecję „ramienia długiego chromosomu 13 najczęściej prążka 14”. Bardziej



logiczne jest omówienie najpierw podstaw molekularnych a potem chorób, ale na pewno nie można podawać poszatkowanych i rozrzuconych danych. Podobnie jest z chorobą Alzheimer'a — na str. 358 na rysunku związany z nią gen jest zlokalizowany w chromosomie 14, zaś w opisie na str. 86—87 mowa jest o genach w chromosomach 21 i 19. Opis mukowiscydozy mógłby być pisany 10 lat temu, a opis dystrofii mięśniowej Duchenne'a nie wspomina o dystrofii mięśniowej Beckera, wynikającej z mutacji w tym samym genie.

W rozdziale o podstawach poradnictwa genetycznego brakuje istotnych informacji. Wiadomo, że studenci medycyny nie przepadają za matematyką, ale jednak w rozdziale tym należało przynajmniej wspomnieć o twierdzeniu Bayesa, bo bez niego pewne rzeczy trudno jest wyliczyć. Z drugiej strony, może w tym momencie przyszli lekarze powinni dowiedzieć się jak powinna być traktowana osoba zgłaszająca się po poradę genetyczną, jaki jest sens udzielania takiej informacji i jak należy interpretować ryzyko genetyczne. Podane przykłady interpretacji ryzyka genetycznego są zaprzeczeniem zasad stosowanych w poradnictwie genetycznym. Świadczą też o braku wiedzy i doświadczenia w tej dziedzinie autora rozdziału.

Rozdziały o cytogenetyce i mapowaniu chromosomów nie uwzględniają osiągnięć ostatnich lat, a powinny. Rozdział o inżynierii genetycznej — który obejmuje też pewne aspekty terapii genowej, zwanej nie wiadomo dlaczego genoterapią — zawiera bardzo wiele błędów. Na ogół nie podaje się studentom informacji o enzymach klasy III, EcoRI nie tnie w odległości 25—27 bp od rozpoznawanej sekwencji tylko w jej obrębie. Plazmidy z serii colE1 nie zawsze posiadają geny oporności na tetracyklinę i ampicylinę. Opis wektorów opartych o faga lambda nie uwzględnia wektorów, w których klonowany fragment zastępuje fragment DNA bakteriofaga, stąd też niewłaściwie podana jest wielkość fragmentu, który można klonować w tym wektorze. Wektory służące do klonowania w pro- i eukariota są przemieszane. Część dotycząca terapii genowej miesza teoretyczne możliwości z realnymi dokonaniem tak, że po jej przeczytaniu bardzo trudno wiedzieć co zrobiono, o czym się myśli i jakie są perspektywy tej niesłychanie ciekawej dziedziny.

W książce brak też pewnych podstawowych definicji, koniecznych dla zrozumienia podstaw genetyki człowieka takich jak np. allel, genotyp, fenotyp, penetracja i ekspresja. Nie są też omówione choroby wywoływane przez priony ani przez mutacje w mitochondrialnym DNA.

Reasumując, sądzimy, że książka ta jest nieodpowiednia zarówno dla studentów jak i dla lekarzy z powodu wielu błędów oraz ze względu na bardzo niewspółczesne podejście do wielu zagadnień.

*prof. dr hab. Ewa Bartnik, Zakład Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego*

*doc. dr hab. Tadeusz Mazurczak, Zakład Genetyki Instytutu Matki i Dziecka*

*prof. dr hab. Andrzej Paszewski, Zakład Genetyki Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN*

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii” w 1996 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** napi-

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

**Prenumerata krajowa dla instytucji:**  
**60.00 zł**

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

<http://rcin.org.pl>

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

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

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
<u>na rachunek</u>	<u>na rachunek</u>	<u>na rachunek</u>
Polskie Towarzystwo Biochemiczne 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3 P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie 37 00 44-1225-139-11	Polskie Towarzystwo Biochemiczne 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3 P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie 37 00 44-1225-139-11	Polskie Towarzystwo Biochemiczne 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3 P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie 37 00 44-1225-139-11
stempel	stempel	stempel
<div data-bbox="357 1888 520 2039" style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">Pobrano opłatę  zł. ....</div>	<div data-bbox="862 1888 1025 2039" style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">Pobrano opłatę  zł. ....</div>	<div data-bbox="1351 1888 1484 2039" style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">Pobrano opłatę  zł. ....</div>
..... podpis przyjmującego	..... podpis przyjmującego	..... podpis przyjmującego

# Wskazówki dla autorów

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

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

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

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

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

## Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

